



(12)发明专利



(10)授权公告号 CN 103562390 B

(45)授权公告日 2017.07.18

(21)申请号 201280026763.2

C12R 1/46(2006.01)

(22)申请日 2012.06.01

(56)对比文件

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 103562390 A

US 20100080774 A1,2010.04.01,

WO 0162944 A2,2001.08.30,

CN 10605900 A,2009.12.16,

(43)申请公布日 2014.02.05

US 20100080774 A1,2010.04.01,

(30)优先权数据

11168495.7 2011.06.01 EP

11173588.2 2011.07.12 EP

Thomas Schirrmann 等.Production

systems for recombinant antibodies.

《Frontiers in Bioscience》.2008,4576—

4595.

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2013.11.29

Sabine Dobinsky 等.Influence of Tn917

Insertion on Transcription of the icaADBC

Operon in Six Biofilm-Negative Transposon

Mutants of Staphylococcus epidermidis.

《Plasmid》.2002,第47卷(第1期),10—17.

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2012/060431 2012.06.01

(87)PCT国际申请的公布数据

WO2012/164083 EN 2012.12.06

LUI´S JAIME MOTA 等.Control of the

Arabinose Regulon in Bacillus subtilis by

AraR In Vivo: Crucial Roles of Operators,

Cooperativity, and DNA Looping.《JOURNAL

OF BACTERIOLOGY》.2001,第183卷(第14期),

4190—4201.

(73)专利权人 英特瑞克斯顿阿克图比奥帝克斯
有限公司

地址 比利时茨维兰德

Brückner R..Gene replacement in

Staphylococcus carnosus and

Staphylococcus xylosus..《FEMS Microbiol

Lett.》.1997,第151卷(第1期),1—8.

(72)发明人 克拉斯·万登布鲁克

卡罗利安·万于伊内盖姆

洛塔尔·施泰德勒

审查员 张林

(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227

代理人 彭鲲鹏 卢蓓

(51)Int.Cl.

C12N 15/63(2006.01)

C12N 15/90(2006.01)

权利要求书2页 说明书53页

序列表3页 附图19页

(54)发明名称

用于细菌的多顺反子表达系统

(57)摘要

本发明涉及革兰氏阳性菌中的多顺反子表达,并且特别地涉及多顺反子表达单元,所述多顺反子表达单元包含与对革兰氏阳性菌外源的一个或多个基因转录偶联的对所述细菌内源的一个或多个基因。

1. 包含多顺反子表达单元的乳酸菌, 所述多顺反子表达单元包含内源基因和一个或多个外源基因, 其中所述内源基因和所述一个或多个外源基因被对所述乳酸菌而言内源的启动子转录控制, 其中所述启动子选自所述乳酸菌的eno启动子、usp45启动子、gap启动子、pyk启动子、rpmB启动子和rplS启动子, 其中所述启动子是所述内源基因的天然启动子, 并且所述启动子和所述内源基因位于其在所述乳酸菌中的天然染色体基因座, 并且其中通过将所述一个或多个外源基因染色体整合至所述基因座中所述内源基因的3'末端来将所述一个或多个外源基因与所述内源基因3'末端转录偶联, 其中所述内源基因与所述一个或多个外源基因通过在所述乳酸菌中有活性的一个或多个基因间区域转录偶联, 并且其中所述一个或多个基因间区域选自在rplW、rplP、rpmD、rplB、rpsG、rpsE、rplN、rplM、rplE和rplF之前的基因间区域。

2. 根据权利要求1所述的乳酸菌, 其中所述一个或多个外源基因是所述多顺反子表达单元的最3'末端基因。

3. 根据权利要求1所述的乳酸菌, 其中所述一个或多个基因间区域对于所述乳酸菌而言是内源的。

4. 根据权利要求1所述的乳酸菌, 其中所述一个或多个外源基因编码在对象中具有治疗性或预防性作用的一种或更多种多肽。

5. 根据权利要求4所述的乳酸菌, 其中所述多肽为用于诱导所述对象中免疫或免疫耐受的抗原。

6. 根据权利要求4所述的乳酸菌, 其用作药物。

7. 根据权利要求1所述的乳酸菌, 其中一个外源基因编码抗体的轻链(V_L)或其功能性片段, 并且另一个外源基因编码所述抗体的重链(V_H)或其功能性片段。

8. 根据权利要求7所述的乳酸菌, 其中编码V_L或其功能性片段的所述外源基因与编码V_H或其功能性片段的所述外源基因的3'末端转录偶联。

9. 根据权利要求1所述的乳酸菌, 其中所述乳酸菌是乳球菌(Lactococcus)种、乳杆菌(Lactobacillus)种或肠球菌(Enterococcus)种。

10. 根据权利要求4所述的乳酸菌, 其中所述一种或更多种多肽为非致疫苗作用的治疗活性多肽。

11. 根据权利要求4所述的乳酸菌, 其中所述一种或更多种多肽为抗体或其功能性片段。

12. 根据权利要求11所述的乳酸菌, 其中所述功能性片段是Fab片段。

13. 根据权利要求11所述的乳酸菌, 其中所述抗体为单结构域抗体。

14. 根据权利要求4所述的乳酸菌, 其中所述一种或更多种多肽是融合蛋白或多聚体蛋白。

15. 根据权利要求6所述的乳酸菌, 其用于将所述一种或更多种多肽施用或递送至对象。

16. 根据权利要求9所述的乳酸菌, 其中所述乳球菌种是乳酸乳球菌(Lactococcus lactis)。

17. 根据权利要求9所述的乳酸菌, 其中所述肠球菌种是屎肠球菌(Enterococcus faecium)。

18. 药物组合物,其包含根据权利要求1至9中任一项所述的乳酸菌。

用于细菌的多顺反子表达系统

技术领域

[0001] 本发明属于生物学和医学的领域,更特别地属于分子和细胞生物学的领域,并且涉及通过微生物重组改造和表达产物,例如肽、多肽或蛋白质。更特别地,本发明涉及用于通过微生物表达这样的产物的多顺反子表达构建体或盒,并且还涉及载体、经转化宿主、用途和应用,例如向患者递送(尤其是治疗性递送)如此表达的产物。

背景技术

[0002] 迄今为止,已开发了重组蛋白的多种表达系统用于多种生物技术应用。在原核生物、酵母和真菌中并且在哺乳动物细胞中已建立了用于异源或同源基因表达的系统。

[0003] 使用酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)作为宿主系统表达了酵母中产生的大多数重组蛋白。尽管如此,还是在酿酒酵母系统中发现了一些限制。例如产率通常低和分泌效率低(发现许多酿酒酵母蛋白质在培养基中不是游离的,而是保留在周质空间中或者与细胞壁缔合)(Dominguez等.*Int.Microbiol.*,1998,vol.1(2),131-142)。由于在酵母中进行生产的限制,对于在细菌中表达蛋白质产生了很大的兴趣,细菌易于在廉价培养液中生长并经常用于生产重组蛋白。在原核系统中,使用大肠杆菌(*E.coli*)中的重组表达通常得到最高的蛋白质水平(Jana&Deb.*Appl.Microbiol.Biotechnol.*,2005,vol.67(3),289-298)。但是,在大肠杆菌中,最常用的生产策略是细胞内的(在周质或胞质中),因此涉及昂贵且经常产生问题的下游纯化过程。

[0004] 作为用于在体外重组表达异源多肽(例如,US 5,559,007)以及用于在体内或原位表达并递送抗原和/或治疗相关多肽(例如,WO 97/14806)的宿主,乳酸菌(*Lactic Acid Bacteria*,LAB)变得越来越重要。这些革兰氏阳性菌宿主中产生的异源蛋白质可容易地分泌到培养基中,从而有助于其纯化以及其向对象的直接递送。

[0005] 大多数表达系统可非常好地处理单一蛋白质的表达(由单一基因序列引起)。但是,在一些情况下期望存在这样的表达系统,其能够表达多种蛋白质或多基因蛋白质复合体,例如,不仅在体外表达抗体或蛋白质复合体,而且在体内或原位表达并递送对具体疾病具有协同效应的两种或更多种蛋白质,或者在体内或原位表达并递送抗体或其功能性(多基因)片段。在这些情况下,由于必须严格共同调控多个基因,所以期望存在在一个启动子控制下编码期望蛋白质或抗体的多个基因。

[0006] 产生重组蛋白质复合体的两种最常见途径是使单独表达并纯化的亚基进行体外重组,或者通过在适当宿主中共表达亚基来实施体内重组(Selleck&Tan,“Recombinant protein complex expression in *E.coli*”,*Curr.Protoc.Protein Sci.*,2008,第5章:第5单元,21)。虽然体外重组已被成功使用,但是该方法是繁琐的(必须表达并纯化每个亚基,并且在重组之后必须进一步纯化复合体)并且重组产率通常较低。相比之下,通过共表达进行体内重组提供了效率的益处(仅一轮表达和纯化)以及期望复合体的潜在较高产率和质量(复合体的再折叠和装配在细胞环境中在蛋白质折叠酶存在下发生)(Selleck&Tan2008,见上)。通过用表达各蛋白质亚基的杆状病毒共感染昆虫细胞(Tirode等.*Mol.Cell*,1999,

vol.3 (1), 87-95), 以及在细菌中由多个质粒 (Johnston等.Protein Expr.Purif., 2000, vol.20 (3), 435-443; McNally等.Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 1988, vol.85 (19), 7270-7273) 或专门化的多顺反子质粒 (Henricksen等.J.Biol.Chem., 1994, vol.269 (15), 11121-11132; Ishiai等.J.Biol.Chem. 1996, vol.271 (34), 20868-20878; Li等.Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 1997, vol.94 (6), 2278-2283) 成功进行了体内重组。

[0007] 已描述了用于在大肠杆菌中产生蛋白质复合体的一般多顺反子表达系统 (Selleck&Tan2008, 见上; Tan.Protein.Expr.Purif., 2001, vol.21 (1), 224-234; Tan等.Protein Expr.Purif., 2005, vol.40 (2), 385-395)。这些系统利用了翻译盒的概念, 所述翻译盒由具有需要的起始密码子和终止密码子的编码区以及之前的翻译起始信号例如夏因-达尔加诺 (Shine-Dalgarno (SD)) 序列和翻译增强子 (Tan2001, Tan等. 2005, 见上) 构成。当转录成mRNA时, 翻译盒包含使大肠杆菌翻译机构启动并维持mRNA翻译成期望多肽的必需且足够的信息 (Selleck&Tan2008, 见上)。

[0008] 虽然在大肠杆菌中已描述了用于白细胞介素18的双顺反子表达载体, 但是两个基因之间的基因间区域由合成接头组成, 并且其具有明显的基因特异性因为胱天蛋白酶-4的表达比ICE的表达高得多。Smolke等之前证实了可使用合成基因间区域序列来差异性控制由操纵子的两种或更多种基因编码的蛋白质水平 (Smolke等.Appl.Environ.Microbiol., 2000, vol.66 (12), 5399-5405; Smolke&Keasling.Biotechnol.Bioeng., 2002, vol.80 (7), 762-776)。但是, 该途径依赖于随机组合, 并且需要将合成序列引入表达宿主中。

[0009] 近些年来对新的改良抗体生产系统的需求增加。在原核生物、酵母和真菌中并且在哺乳动物细胞中已建立了用于抗体表达的系统。虽然由细菌更容易产生单链抗体和单结构域抗体, 但是全尺寸抗体一般具有更高的结合亲和力和更小的在注射时形成中和抗体的风险。

[0010] 可由细菌产生全尺寸抗体 (Mazor等.Nat.Biotechnol., 2007, vol.25 (5), 563-565; Simmons等.J.Immunol.Methods, 2002, vol.263 (1-2), 133-147)。关于重组原核表达的大多数报道描述了抗体片段的产生, 虽然几乎仅由大肠杆菌产生。虽然多种经改造LAB能够发生正确的二硫键连接, 但是文献仅包含由LAB产生的抗体样分子的有限个数的实例 (Kruger等.Nature Biotechnology, 2002, vol.20 (7), 702-706; Beninati等.Nature Biotechnology, 2000, vol.18 (10), 1060-1064; Chancey等.J.Immunol., 2006, vol.176 (9), 5627-5636; Hultberg等.BMC Biotechnol., 2007, vol.7, 58; Yuvarai等.Mol.Nutr.Food.Res., 2008, vol.52 (8), 913-920)。这些报道仅描述了在乳杆菌 (*Lactobacillus*) 物种、乳酸乳球菌 (*Lactococcus lactis*) 和格氏链球菌 (*Streptococcus gordonii*) 中表达的单链抗体片段, 而没有描述多基因的双链抗体片段或全尺寸抗体。

[0011] 多顺反子表达系统在得到复杂蛋白质如抗体的有效原核合成和表达中可以是至关重要的。自从FDA在1986年批准了莫罗单抗-CD3 (Muromonab-CD3) (仍然是可用于控制移植排斥的最有效免疫抑制药之一) (Hooks等.Pharmacotherapy, 1991, vol.11 (1), 26-37) 以来, 全尺寸抗体和抗体片段成为了医药中越来越重要和通用的工具。

[0012] 虽然现有技术水平揭示了细菌细胞中多顺反子表达系统的几个实例, 但是这些是相当有限的, 突出了对用于引入和表达多个基因的更有效系统的需要。因此, 有需要提供可有利地用于蛋白质表达, 优选异源蛋白质表达, 并且甚至更优选地多种异源蛋白质表达的

另外的序列。

[0013] 除以上之外,产生更高量的重组蛋白(对于通过重组微生物的直接蛋白质递送以及大量(bulk)蛋白质生产和下游纯化二者)的尝试代表了大的技术努力方向。增加异源蛋白质产量的一种现有途径是使用所选择的强启动子(参见例如W0 2008/084115)。在这种途径中,进行蛋白质组学分析以鉴定由微生物表达的最丰富的内源蛋白质。通过使用基因组序列,可鉴定和分离各基因和启动子。这些强启动子(例如,乳酸乳球菌h11A基因启动子,Ph11A)可定位在异源基因之前,并且通过这种方式可实现高表达。但是,损害宿主生理机能的表达水平可对宿主构成生长负担并导致反选择(counter-selection)。这固有地将表达宿主中任意给定异源蛋白质的最高可能表达限制在某一特定水平。这是染色体定位表达单元的开发中特别麻烦的障碍。

[0014] 传统地通过提供选择标志物来解决反选择的问题。的确,阳性选择或阴性选择(例如,通过提供抗生素抗性基因)可防止引入的异源基因丢失。可替代地或者除使用选择标志物之外,可采用诱导型基因表达系统,其允许使宿主繁殖与异源蛋白质的表达的解偶联,从而在异源基因不表达时防止繁殖期期间可能的反选择。在该背景下,EP0569604描述了嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*)中的诱导型表达系统,其中异源基因强制性定位在LacZ基因的5'。通过这种方式,异源基因的表达不仅是诱导型的,而且另外通过使细菌在其自然栖息地乳中以乳糖作为碳源生长(这需要表达LacZ基因)来选择异源基因的保持。

[0015] 清楚的是,以上描述的用于异源基因表达的系统在应用中受到限制。例如,使用选择标志物例如抗生素抗性基因不太容易为食品生产中的应用或药剂应用所接受。此外,在自然栖息地生长或使用来自生长自然栖息的碳源生长的限制显著减少了用于异源基因表达的任意系统的多功能性。另外,诱导型系统的使用固有地取决于宿主的生长条件,使得需要应添加诱导物的限定培养基以确保异源蛋白质的表达。

[0016] 因此,本领域中还存在对增加异源蛋白质表达的需要,并且需要可实现高表达水平的序列、克隆系统和策略,以得到工业和/或治疗环境下以足够量表达并且同时在多种不同条件下是通用的并且可广泛使用的异源蛋白质。在这些环境中,还特别有用的是得到多种蛋白质的表达,每一种具有其自身的生物学活性和治疗性作用。

发明内容

[0017] 本发明的方面和实施方案解决了以上所讨论的本领域需要中的至少一些需要,例如一种或更多种需要。

[0018] 本发明人出乎意料地发现,革兰氏阳性菌可通过也包含这些细菌的内源基因的多顺反子表达单元有效地表达外源或异源基因。因此,当外源或异源基因与革兰氏阳性菌的内源基因转录或翻译偶联时,这些细菌可由多顺反子表达单元有效地表达所述外源或异源基因。出乎意料地,本发明人发现,多顺反子表达单元中内源基因与外源基因的转录和/或翻译偶联(transcriptional and/or translational coupling)导致了革兰氏阳性菌中外源基因的高表达水平。特别地,发现跟不与革兰氏阳性菌内源基因转录或翻译偶联的外源基因的表达水平相比,与革兰氏阳性菌内源基因转录和/或翻译偶联的外源基因的表达水平至少与其相当并且有利地更高。

[0019] 因此,在本发明的一方面涉及包含多顺反子表达单元的革兰氏阳性菌,所述多顺

反子表达单元包含一个或更多个内源基因和一个或更多个外源基因。因此,多顺反子表达单元也可表示为包含内源基因(例如但不限于一个内源基因)和一个或更多个外源基因。优选地,多顺反子表达单元连续地包含一个或更多个内源基因和一个或更多个外源基因。因此,这样的多顺反子表达单元也可表示为连续地包含内源基因(例如但不限于一个内源基因)和一个或更多个外源基因。多顺反子表达单元被构造成实现一个或更多个内源基因和一个或更多个外源基因转录为多顺反子mRNA。因此,本发明革兰氏阳性菌可另外地表示为包含与一个或更多个外源基因转录或翻译偶联的一个或更多个内源基因。因此,还提供了包含与一个或更多个外源基因转录或翻译偶联的一个或更多个内源基因的革兰氏阳性菌。

[0020] 另一个方面提供了包含多顺反子表达单元的重组核酸,所述多顺反子表达单元包含对革兰氏阳性菌内源的基因和一个或更多个对革兰氏阳性菌外源的基因。优选地,多顺反子表达单元连续地包含一个或更多个内源基因和一个或更多个外源基因。因此,还提供了包含多顺反子表达单元的的重组核酸,所述多顺反子表达单元包含与一个或更多个对革兰氏阳性菌外源的基因转录和/或翻译偶联的一个或更多个对革兰氏阳性菌内源的基因。

[0021] 优选地,如本说明书全文所意图的,所述一个或更多个外源基因可与所述一个或更多个内源基因的3'末端转录或翻译偶联。本发明人出乎意料地发现,这样的构造在异源蛋白质表达水平,多顺反子表达单元的维持和/或基因组稳定性方面是有益的。而且发现其他的下游基因组布置的重要性较小或不重要。

[0022] 转录或翻译偶联的一个或更多个内源基因和一个或更多个外源基因的转录可被能够在革兰氏阳性菌中实现转录的启动子合适地调节或控制,并且优选地可被所述革兰氏阳性菌的内源启动子调节或控制。因此,还提供了这样的革兰氏阳性菌,其包含与位于其天然染色体基因座的一个或更多个内源基因转录或翻译偶联的一个或更多个外源基因。因此,优选地,这些转录或翻译偶联的一个或更多个内源基因和一个或更多个外源基因的转录被所述一个或更多个内源基因的天然启动子控制或调节。合适地,转录或翻译偶联可通过将一个或更多个外源基因染色体整合到所述基因座来实现,例如通过将一个或更多个外源基因染色体整合到所述基因座中所述一个或更多个内源基因的3'来实现。

[0023] 因此,在一个方面中,本发明涉及包含多顺反子表达单元的重组核酸或革兰氏阳性菌,所述多顺反子表达单元连续地包含内源基因和与所述一个或更多个内源基因3'末端转录偶联的一个或更多个外源基因,优选地,其中所述一个或更多个外源基因是多顺反子表达单元的最3'基因。

[0024] 本发明人出乎意料地发现,转录偶联到天然基因(其自身可以是多顺反子基因,例如操纵子)3'的外源或异源基因(或多个异源基因)的染色体整合产生稳定的表达单元,其中针对(一个或更多个)外源基因的反选择不存在或最小,这与预期的相反。

[0025] 本发明人出乎意料地发现,当在某些条件下(特别是通过某些类型的启动子)实现多顺反子表达单元的表达时,更加体现出本文描述的优点。本发明人出乎意料地发现,本文所述的多顺反子表达系统(其中通过常规方法例如使用选择标志物或通过使用诱导型系统没有解决针对异源蛋白质的反选择)可以仍稳定维持并以高水平表达,从而在不需要选择剂或诱导物的多种不同条件下广泛应用。如本文所述的多顺反子表达模块因此允许使用非选择性(non-selectable)内源基因和/或外源基因。

[0026] 在一个方面中,本发明涉及包含多顺反子表达单元的重组核酸或革兰氏阳性菌,

所述多顺反子表达单元连续地包含内源基因和与所述内源基因3'末端转录偶联的一个或更多个外源基因,其中所述多顺反子表达单元的表达通过组成型启动子实现。

[0027] 在另一个方面中,本发明涉及包含多顺反子表达单元的重组核酸或革兰氏阳性菌,所述多顺反子表达单元连续地包含内源基因和与所述内源基因3'末端转录偶联的一个或更多个外源基因,其中所述多顺反子表达单元的表达通过中心代谢基因启动子(central metabolism gene promoter)实现。

[0028] 在另一个方面中,本发明涉及包含多顺反子表达单元的重组核酸或革兰氏阳性菌,所述多顺反子表达单元连续地包含内源基因和与所述内源基因3'末端转录偶联的一个或更多个外源基因,其中所述多顺反子表达单元的表达通过管家基因启动子实现。

[0029] 在另一个方面中,本发明涉及包含多顺反子表达单元的重组核酸或革兰氏阳性菌,所述多顺反子表达单元连续地包含内源基因和与所述内源基因3'末端转录偶联的一个或更多个外源基因,其中所述多顺反子表达单元的表达通过必需基因启动子(essential gene promoter)实现。

[0030] 在另一个方面中,本发明涉及包含多顺反子表达单元的重组核酸或革兰氏阳性菌,所述多顺反子表达单元连续地包含内源基因和与所述内源基因3'末端转录偶联的一个或更多个外源基因,其中所述多顺反子表达单元的表达不通过诱导型基因启动子实现。

[0031] 在另一个方面中,本发明涉及包含多顺反子表达单元的重组核酸或革兰氏阳性菌,所述多顺反子表达单元连续地包含内源基因和与所述内源基因3'末端转录偶联的一个或更多个外源基因,其中所述多顺反子表达单元的表达通过核糖体基因启动子实现。

[0032] 在另一个方面中,本发明涉及包含多顺反子表达单元的重组核酸或革兰氏阳性菌,所述多顺反子表达单元连续地包含内源基因和与所述内源基因3'末端转录偶联的一个或更多个外源基因,其中所述多顺反子表达单元的表达通过糖酵解基因启动子实现。

[0033] 如以上所示的,在一个优选实施方案中,如上所述的启动子是内源基因启动子。如以下进一步详细描述,优选地,本文使用的启动子是强启动子。优选地但非限制地,所述内源启动子可选自eno、usp45、gapB、pyk、rpmB和rplS的启动子。非常优选地,翻译偶联的内源基因和一个或更多个外源基因的转录可被所述内源基因(之一)的天然启动子调节或控制。

[0034] 应理解,本文所述启动子的特征可根据本发明进行组合。因此,在一些实施方案中,本发明涉及包含多顺反子表达单元的重组核酸或革兰氏阳性菌,所述多顺反子表达单元连续地包含内源基因和与所述内源基因3'末端转录偶联的一个或更多个外源基因,其中所述多顺反子表达单元的表达通过例如以下来实现:(内源)组成型管家基因启动子、(内源)组成型中心代谢基因启动子、(内源)组成型必需基因启动子、(内源)组成型核糖体基因启动子、(内源)组成型糖酵解基因启动子、(内源)中心代谢管家基因启动子、(内源)必需中心代谢基因启动子、(内源)必需中心代谢管家基因启动子、(内源)必需管家基因启动子、(内源)组成型中心代谢管家基因启动子、(内源)组成型必需中心代谢管家基因启动子、(内源)必需核糖体基因启动子、(内源)必需糖酵解基因启动子、(内源)组成型必需核糖体基因启动子、(内源)组成型必需糖酵解基因启动子。

[0035] 优选地,如贯穿本说明书所意图的,所述一个或更多个外源基因可与所述一个或更多个内源基因的3'末端转录或翻译偶联,其中所述一个或更多个内源基因存在于其细菌

染色体上的天然位置处。在这种构造中,一个或更多个内源基因5'末端的序列(最少包含内源基因启动子)与野生型菌株中的相同,并且一个或更多个外源基因3'末端之后的区域与野生型菌株中一个或更多个内源基因3'区域的序列相同。

[0036] 外源蛋白质表达的许多应用例如通过重组微生物递送治疗性蛋白质可得益于在具体选择的宿主微生物中表达所述治疗性蛋白质。可基于其定殖能力进行选择这些微生物,例如选择来源于人或动物微生物群(microbiota)的菌株。也可基于加强任何具体递送的治疗性蛋白质的活性的能力选择微生物,例如因其细胞壁、细胞表面或细胞内容物与宿主免疫系统的相互作用,例如通过与toll样受体、Ig家族成员、补体、细胞因子等的相互作用。可根据坚持在具体的严苛递送位点(例如肿瘤内、皮肤、具有高胆汁含量的位点,pH低的位点等)中或其上的其稳健性来选择具体的微生物。贯穿本说明书所引述的革兰氏阳性菌可优选是乳酸菌(LAB),更优选是乳球菌属(*Lactococcus* sp.)、甚至更优选是乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)或其亚种或菌株。可替代地,所述LAB可优选是肠球菌属(*Enterococcus* sp.),更优选是屎肠球菌或粪肠球菌(*Enterococcus faecium*或*Enterococcus faecalis*)或其亚种或菌株。

[0037] 为了避免侧向基因转移(lateral gene transfer)至内源生物群落(microflora),由嵌入染色体的表达单元进行表达对于将重组微生物群落用作医药中治疗性蛋白质的递送工具是高度有利的。另外,可证明位于染色体上的表达单元在后代中更为稳定地遗传,因此位于染色体上的表达单元可以是用于大量蛋白质生产的生产菌株的期望结构。在现有技术水平下,通过使用条件性非复制并且在允许同源重组的侧翼区之间包含异源基因的敲入(KI)型载体进行染色体插入。在常规途径(参见,例如W02008/084115)中,在同源宿主中构建KI质粒(用于乳酸乳球菌的KI质粒在乳酸乳球菌中建立)。对于需要蛋白质分泌的异源表达尤其是如此,原因是许多分泌信号不适用于其他宿主。表达构建体中旨在放置在细菌染色体上的强启动子的使用被来自KI质粒中间体的异源基因的表达阻碍。异源基因之前紧接强启动子,使得来自KI质粒的表达(虽然不是所意图的也不是需要的)固有地限制了最强启动子的使用,在许多情况下,KI质粒的拷贝数是宿主中染色体数目的多倍,使得整合后表达将减少几倍。因此,染色体表达单元本质上比可实现的最高的弱。通过本文所述的本发明避免了这个问题。在该途径中,异源基因定位在细菌染色体上(强表达)内源基因的下游并且与其转录和/或翻译偶联。该策略不需要KI质粒上存在内源(强)启动子。相反地,(强表达)内源基因的不含启动子的3'末端定位在异源基因的上游。这种类型的KI质粒是沉默的并且不限制强启动子的使用。

[0038] 如本文所述的一个或更多个外源基因与一种或更多种其他基因的转录或翻译偶联可借助在革兰氏阳性菌中有活性(即,功能性、有效)的基因间区域(优选地借助革兰氏阳性菌中的内源基因间区域)来实现。因此,另一个方面提供了这样的重组核酸,其包含与对革兰氏阳性菌外源之基因可操作连接的在所述革兰氏阳性菌中有活性的基因间区域,优选革兰氏阳性菌的内源基因间区域。可操作连接确保了与外源基因转录物一起存在于mRNA上的基因间区域转录物能够在革兰氏阳性菌中提供外源基因的翻译起始位点。优选地,基因间区域可设置在外源基因的5'。核酸可包含以多顺反子布置的两种或更多种外源基因,每个外源基因的前面具有基因间区域。基因间区域可相同或不同。例如,当基因间区域不同时,其可对应于来源于相同或不同物种之不同基因或者来源于不同物种之相同基因的基因

间区域。这些核酸可用于构建包含一个或更多个外源基因的多顺反子表达单元,其中一个或更多个其他基因与一个或更多个外源基因通过基因间区域转录或翻译偶联。例如,这些核酸可用于构建如本文教导的多顺反子表达单元,其中一个或更多个内源基因与一个或更多个外源基因通过基因间区域转录或翻译偶联。优选地,多顺反子表达单元的第一顺反子是强表达的内源基因。

[0039] 本发明的重组核酸可包含在复制子上。因此,一个方面涉及包含如本文教导的核酸的复制子或载体。例如,载体可以是原核表达载体,优选是原核多顺反子表达载体。但是,开发这样的质粒表达系统可以是繁琐的,因为某些复制子与强启动子的组合可以是不稳定的。另外,因为天然质粒的存在,所以可能不能用重组质粒转化所选择的微生物并在微生物中稳定维持所述重组质粒,在表达质粒中不可包含抗生素选择标志物的情况下(如在用于治疗性蛋白质递送的应用中的情况)尤其可能不能。这个问题可通过将异源基因定位在细菌染色体上的(强表达)内源基因下游并与其转录或翻译偶联来避开。由于该策略不需要基于质粒的表达系统,所以其可用作适用于遗传改造任意类型的所选微生物群体的一般途径。所需的唯一菌株特异性信息可通过本领域现有技术水平快速建立。将高通量测序与丰富表达的蛋白质的蛋白质组学分析相组合将快速产生编码丰富存在之蛋白质的区域的核苷酸序列。因此,最优选地,如本文所述的载体可构造成实现革兰氏阳性菌中的同源重组,例如产生外源基因的染色体整合。

[0040] 还提供了如本文所述的重组核酸或载体在革兰氏阳性菌中多顺反子表达一个或更多个外源基因或者多顺反子表达一个或更多个内源基因和一个或更多个外源基因的用途。另外,公开了包含如本文所教导的重组核酸或载体(例如,用其转化)的革兰氏阳性菌,其中所述革兰氏阳性菌能够多顺反子表达一个或更多个外源基因或者多顺反子表达一个或更多个内源基因和一个或更多个外源基因。还提供了在革兰氏阳性菌中实现多顺反子表达一个或更多个外源基因或者实现多顺反子表达一个或更多个内源基因和一个或更多个外源基因的方法,其包括将如本文所教导的重组核酸或载体引入所述革兰氏阳性菌中的步骤。另外,提供了能够多顺反子表达一个或更多个外源基因或者能够多顺反子表达一个或更多个内源基因和一个或更多个外源基因的革兰氏阳性菌的产生方法,其包括将如本文所教导的重组核酸或载体引入所述革兰氏阳性菌中的步骤。

[0041] 本发明允许在革兰氏阴性菌中表达(优选强(高度)表达)单一外源基因或多个(例如,两个、三个或更多个)不同的外源基因。所述单一外源基因或多个外源基因可编码单一表达产物或多种表达产物,例如,有利地为蛋白质、多肽和/或肽。例如而非限制,这样的蛋白质、多肽和/或肽可涵盖抗原(例如,用于诱导免疫或免疫耐受性)、变应原、非致疫苗作用的(non-vaccinogenic)治疗性多肽(细胞因子、生长因子、创伤愈合因子……)、抗体或其功能性片段(例如,Fab片段)、融合蛋白、多聚蛋白等及其任意组合。

[0042] 多顺反子结构可使如本文所教导的表达单元特别适合于表达包含两条或更多条多肽链的蛋白质(例如,多聚蛋白、蛋白质复合体)。因此,如本说明书所意图的两个或更多个外源基因可优选地编码多聚体蛋白质的不同单体或亚基,借此使基因共转录为多顺反子mRNA并且由该mRNA翻译各单体或亚基。这可允许严格调控外源基因的共表达,例如以实现各单体或亚基至多聚体蛋白质的平衡且最优的组装。

[0043] 抗体或其功能性片段的表达特别有利地阐明了该原理。因此,如本文所教导的两

个或更多个外源基因可优选地编码抗体或其功能性片段的不同链。例如,一个外源基因可编码抗体的轻链(V_L)或其功能性片段,另一个外源基因可编码抗体的重链(V_H)或其功能性片段。优选地,抗体的功能性片段可以是Fab。在一些具体但非限制性的实施方案中,所述Fab可与细胞因子、细胞因子受体、趋化因子或免疫/炎性活化分子结合和/或抑制其生物作用。在一个优选实施方案中,Fab可与TNF α 结合和/或抑制其生物作用,例如但不限于,所述Fab可以是cA2抗TNF或CDP870抗TNF。

[0044] 因此,使编码抗体或其片段各链的外源基因转录或翻译偶联以在革兰氏阳性菌中进行多顺反子表达。优选地,编码V_L或其功能性片段的外源基因可与编码V_H或其功能性片段的外源基因的3'末端转录或翻译偶联。该基因结构产生了抗体或其功能性片段的特别有效的表达和组装。

[0045] 多顺反子结构还可使如本文所教导的表达单元特别适合于共表达这样的产物(例如蛋白质),所述产物在例如通过细菌原位递送时配合以实现协同效应,例如协同的治疗性或预防性作用。

[0046] 另一个方面提供了如本文所教导的革兰氏阳性菌,其中一个或更多个外源基因编码在对象中具有治疗性或预防性作用的一种或更多种产物,例如蛋白质、多肽或肽。特别地提供这样的细菌用作药剂,更特别地用于将所述一种或更多种产物施用或递送至对象,甚至更特别地用于治疗可得益于所述一种或更多种产物之施用或递送的疾病。因此,还提供了包含这样的革兰氏阳性菌的药物组合物。

[0047] 另外,提供了用于将一种或更多种产物(例如蛋白质、多肽或肽)递送至对象的方法,其包括向对象施用如本文所教导的革兰氏阳性菌,其中一个或更多个外源基因编码所述一种或更多种产物。优选地,所述一种或更多种产物在对象中可具有治疗性或预防性作用。

[0048] 为了将本发明革兰氏阳性菌原位递送至对象,有利的是通过除用于外源表达产物的序列之外不引入或引入更少的外源或甚至致病性序列使细菌更接近地保留其内源特征。从而,尽可能多地维持GRAS规则或“一般认为安全的(Generally Recognized As Safe)”状态,从而方便获得将改造菌株用于人或动物的临床批准或市场许可的过程。

[0049] 下文中的(i)至(xxii)项示出了根据本发明的另一些方面和实施方案。

[0050] (i) 包含多顺反子表达单元的革兰氏阳性菌,所述多顺反子表达单元连续地包含内源基因和与所述一个或更多个内源基因3'末端转录偶联的一个或更多个外源基因。

[0051] (ii) 包含多顺反子表达单元的重组核酸,所述多顺反子表达单元连续地包含对革兰氏阳性菌内源的基因和与所述一个或更多个内源基因3'末端转录偶联的一个或更多个对革兰氏阳性菌外源的基因。

[0052] (iii) 根据(i)的革兰氏阳性菌或者根据(ii)的重组核酸,其中所述一个或更多个外源基因编码在对象中具有治疗性或预防性作用的蛋白质、多肽和/或肽,或者用于诱导免疫或免疫耐受性的抗原,非致疫苗作用的治疗活性多肽,抗体或其功能性片段如Fab,融合蛋白或多聚体蛋白质。

[0053] (iv) 根据(i)的革兰氏阳性菌或者根据(ii)的重组核酸,其中所述一个或更多个外源基因编码产物,例如蛋白质、多肽或肽,所述产物在对象中具有治疗性或预防性作用,所述革兰氏阳性菌或重组核酸用作药物,优选地用于将所述产物施用或递送至所述对象。

[0054] (v) 根据 (i)、(iii) 或 (iv) 的革兰氏阳性菌或者根据 (ii) 至 (iv) 的重组核酸, 其中所述一个或更多个外源基因是多顺反子表达单元的最3' 基因。

[0055] (vi) 根据 (i)、(iii)、(iv) 或 (v) 中任一项的革兰氏阳性菌或者根据 (ii) 至 (v) 中任一项的重组核酸, 其中所述内源基因和所述一种或跟多种外源基因被对革兰氏阳性菌内源的启动子转录控制。

[0056] (vii) 根据 (vi) 的革兰氏阳性菌或重组核酸, 其中所述启动子是必需基因启动子、组成型启动子、中心代谢基因启动子和/或管家基因启动子。

[0057] (viii) 根据 (vi) 的革兰氏阳性菌或重组核酸, 其中所述启动子是核糖体基因启动子。

[0058] (ix) 根据 (vi) 的革兰氏阳性菌或重组核酸, 其中所述启动子是糖酵解基因启动子。

[0059] (x) 根据 (vi) 的革兰氏阳性菌或重组核酸, 其中所述启动子选自所述革兰氏阳性菌的 *eno*、*usp45*、*gap*、*pyk*、*rpmB* 和 *rplS* 的启动子。

[0060] (xi) 根据 (i) 或 (ii) 至 (x) 中任一项的革兰氏阳性菌, 其中所述内源基因位于革兰氏阳性菌的其天然染色体基因座中。

[0061] (xii) 根据 (xi) 的革兰氏阳性菌, 其中通过将一个或更多个外源基因染色体整合至所述基因座、优选地通过将一个或更多个外源基因染色体整合至所述基因座中内源基因的3' 来将所述内源基因与一个或更多个外源基因转录偶联。

[0062] (xiii) 根据 (i) 或 (iii) 至 (xii) 中任一项的革兰氏阳性菌或者根据 (ii) 至 (x) 中任一项的重组核酸, 其中所述内源基因与所述一个或更多个外源基因通过在革兰氏阳性菌中有活性的一个或更多个基因间区域转录偶联, 优选地, 其中所述一个或更多个基因间区域对于所述革兰氏阳性菌是内源的。

[0063] (xiv) 根据 (xiii) 的革兰氏阳性菌或重组核酸, 其中所述基因间区域选自在 *rplW*、*rplP*、*rpmD*、*rplB*、*rpsG*、*rpsE*、*rplN*、*rplM*、*rplE* 和 *rplF* 之前的基因间区域。

[0064] (xv) 重组核酸, 其包含与对革兰氏阳性菌外源的基因可操作连接的在所述革兰氏阳性菌中有活性的基因间区域, 优选地, 其中所述基因间区域是革兰氏阳性菌的内源基因间区域。

[0065] (xvi) 根据 (xiv) 的重组核酸, 其中所述基因间区域选自在 *rplW*、*rplP*、*rpmD*、*rplB*、*rpsG*、*rpsE*、*rplN*、*rplM*、*rplE* 和 *rplF* 之前的基因间区域。

[0066] (xvii) 根据 (i) 或 (iii) 至 (xiv) 中任一项的革兰氏阳性菌或者根据 (ii) 至 (x) 或 (xiii) 至 (xvi) 中任一项的重组核酸, 其中一个外源基因编码抗体的轻链 (V_L) 或其功能性片段, 另一个外源基因编码抗体的重链 (V_H) 或其功能性片段, 更优选地, 其中所述功能性片段是 Fab。

[0067] (xviii) 根据 (xvii) 的革兰氏阳性菌或重组核酸, 其中编码 V_L 或其功能性片段的外源基因与编码 V_H 或其功能性片段的外源基因的3' 末端转录偶联。

[0068] (xix) 根据 (i)、(iii) 至 (xiv)、(xvii) 或 (xviii) 中任一项的革兰氏阳性菌或者根据 (ii) 至 (x) 或 (xiii) 至 (xviii) 中任一项的重组核酸, 其中所述革兰氏阳性菌是乳酸菌, 优选乳球菌、乳杆菌或肠球菌, 更优选是乳酸乳球菌或屎肠球菌, 或者其中所述革兰氏阳性菌是双歧杆菌 (*Bifidobacterium*)。

[0069] (xx) 药物组合物,其包含根据(i)、(iii)至(xiv)或(xvii)至(xix)中任一项的革兰氏阳性菌。

[0070] (xxi) 根据(xx)的药物组合物,其中所述一个或多个外源基因编码产物,例如蛋白质、多肽或肽,所述产物在对象中具有治疗性或预防性作用。

[0071] (xxii) 载体,其包含根据(ii)至(x)或(xiii)至(xix)中任一项的重组核酸。

[0072] 在以下部分和所附权利要求书中描述了本发明的以上和另一些方面和优选实施方案。所附权利要求书的主题具体地引入本说明书中。

附图说明

[0073] 图1:乳酸乳球菌乳脂亚种(*Lactococcus lactis* ssp.*Cremoris*)菌株MG1363对数期结束(end-log)培养物的细胞蛋白质的考马斯亮蓝染色。主要的蛋白质带标示为1至12。

[0074] 图2:参照的单顺反子表达构建体(上图,sAGX0090)和根据本发明一个实施方案的多顺反子(双顺反子(bicistronic)、双重顺反子(dual cistron))构建体(下图)的图示,其中基因X表示内源基因。两种表达构建体旨在用于由大肠杆菌uidA基因表达β-葡萄糖醛酸酶,其在这里充当示例性外源基因。

[0075] 图3:在参照宿主(单顺反子:Ph11A>>uidA,sAGX0090)中和包含根据本发明一个实施方案的多顺反子(双顺反子)构建体(如图2所构造)的宿主(内源基因X>>rpmD>>uidA)中的相对β-葡萄糖醛酸酶(GUS)活性。在该实施例中,内源基因X是usp45、enoA、rplS、rpmB、pyk和gapB。在该实施例中,rpmD基因间区域提供了内源基因与外源基因的转录偶联。外源大肠杆菌uidA基因编码β-葡萄糖醛酸酶。所有的表达构建体都嵌在细菌染色体中。单顺反子构建体存在于thyA基因座中,双顺反子构建体嵌在基因X的天然位置处。数据表明所有的双顺反子构建体具有优于单顺反子Ph11A>>uidA构建体的b-半乳糖苷酶活性。

[0076] 图4:在参照宿主(sAGX0122)和根据本发明一个实施方案的宿主(sAGX0121和sAGX0164)中通过乳酸乳球菌的人胰岛素原(ins)分泌的定量。(A) ins表达模块的概述图。菌株sAGX0122携带单顺反子表达构建体,其中thyA启动子驱动分泌前导物(secretion leader)-人胰岛素原融合物(SS::ins)的表达,所述构建体在thyA基因座处嵌在乳酸乳球菌MG1363染色体中。sAGX0121和sAGX0164中的双顺反子表达构建体由内源usp45和enoA分别与SS::ins通过rpmD基因间区域转录偶联组成。这些构建体分别位于乳酸乳球菌MG1363染色体上usp45和enoA基因的天然位置处。(B)在多种菌株的上清液中检测到的胰岛素原水平。分别指示这些菌株的上清液中的人胰岛素原水平的柱下面标示出菌株代码(sAGX0122、sAGX0121和sAGX0164)。数据表明携带双顺反子构建体的两种菌株具有优于携带单顺反子PthyA>>ins构建体的菌株的人胰岛素原水平。

[0077] 图5:乳酸乳球菌中的cA2抗TNF Fab表达。编码VLCL(L)与VHCH1(H)片段的基因通过rpmD、rplB、rpsG、rpsE和rplN基因间区域转录偶联。制备了其中L或H定位为双顺反子构建体第一基因的构建体。所有的抗TNA表达构建体都是基于质粒的并且受PthyA启动子控制。在多种菌株的上清液中测量抗TNF活性。数据表明在H是双顺反子构建体第一基因的所有构建体中抗TNF活性较高。

[0078] 图6:乳酸乳球菌中的CDP870抗TNF Fab表达。(A)将与usp45分泌前导物编码序列融合的CDP870轻链和重链(SS::CDP870 VLCL和SS::CDP870 VHCH1)作为第二和第三顺反子

插入乳酸乳球菌MG1363染色体中usp45 (sAGX0219、sAGX0220) 的下游。在sAGX0219和sAGX0220中, rpmD用于偶联SS::CD870基因与usp45。为了避免遗传不稳定, 轻链与重链基因通过在rp1N前面的基因间区域偶联。在sAGX0219中, 轻链基因在重链基因之前, 而在sAGX0220中, 重链基因在轻链基因之前。(B) 粗制培养物上清液中抗人TNF活性的定量。双顺反子构建体高度表达了重链和轻链二者, 产生了高水平的功能性CDP870抗TNF Fab。当重链定位在轻链之前时CDP870抗TNF表达大幅度增加。

[0079] 图7: 在参照宿主 (sAGX0085) 和根据本发明一个实施方案的宿主 (sAGX0276) 中通过乳酸乳球菌的人三叶因子1 (hTFF1) 分泌的定量。(A) hTFF1表达模块的概述图。菌株sAGX0085携带单顺反子表达构建体, 其中Ph11A启动子驱动分泌前导物-hTFF1融合物 (SS::hTFF1) 的表达, 所述构建体嵌在乳酸乳球菌MG1363染色体中的thyA基因座处。sAGX0276中的双顺反子构建体由gapB与SS::hTFF1通过rpmD基因间区域的转录偶联组成。该构建体位于乳酸乳球菌MG1363染色体上gapB基因的天然位置处。(B) 在多种菌株的上清液中检测到的hTFF1的水平。分别指示这些菌株上清液中的人hTFF1水平的柱下面标示出菌株代码 (sAGX0085和sAGX0276)。数据表明携带双顺反子构建体的sAGX0276产生hTFF1的水平优于具有单顺反子构建体的sAGX0085。

[0080] 图8: 屎肠球菌菌株LMG 15709对数期结束培养物的细胞蛋白质的考马斯亮蓝染色。主要的蛋白质带标示为1至12。

[0081] 图9: 根据本发明一个实施方案的多顺反子 (双顺反子、双重顺反子) 构建体的图示, 其中基因X表示内源基因。表达构建体旨在用于由大肠杆菌uidA基因表达 β -葡萄糖醛酸酶, 其在这里充当示例性外源基因。Gap和eno是代表性的“第一”内源基因。

[0082] 图10: 在参照宿主 (单顺反子: Ph11A>>uidA, sAGX0090) 和包含根据本发明一个实施方案的多顺反子 (双顺反子) 构建体 (如图9所构造) 的宿主 (内源基因X>>rpmD>>uidA) 中的相对 β -葡萄糖醛酸酶 (GUS) 活性。在该实施例中, 内源基因X是gapB和eno。在该实施例中, rpmD基因间区域提供了内源基因与外源基因的转录偶联。外源大肠杆菌uidA基因编码 β -葡萄糖醛酸酶。所有的表达构建体均嵌在细菌染色体中。单顺反子构建体存在于thyA基因座中, 双顺反子构建体嵌在基因X的天然位置处。数据表明所有的双顺反子构建体具有优于单顺反子Ph11A>>uidA构建体的 β -半乳糖苷酶活性。

[0083] 图11: 在参照宿主 (sAGX0270) 和根据本发明一个实施方案的宿主 (sAGX0279) 中通过屎肠球菌的人白细胞介素10 (hIL-10) 分泌的定量。(A) hIL-10表达模块的概述图。sAGX0279中的双顺反子表达构建体由内源gap与SS::hIL10通过rpmD基因间区域的转录偶联组成。(B) 在多种菌株的上清液中检测到的hIL-10水平。

[0084] 图12: 在参照宿主 (sAGX0270) 和根据本发明一个实施方案的宿主 (sAGX0317) 中通过屎肠球菌的人白细胞介素27 (hIL-27) 分泌的定量。(A) hIL-27表达模块的概述图。sAGX0317中的双顺反子表达构建体由内源gap与SS::hIL27通过rpmD基因间区域的转录偶联组成。(B) 在多种菌株的上清液中检测到的hIL-27水平。

[0085] 图13: 屎肠球菌中的CDP870抗TNF Fab表达。(A) 将与usp45分泌前导物编码序列融合的CDP870轻链和重链 (SS::CDP870 VHCH1和SS::CDP870 VLCL) 作为第二和第三顺反子插入gap (sAGX0278) 的下游。为了避免遗传不稳定, 轻链与重链基因通过来自乳酸乳球菌 (LL) 的在rpmD前面的基因间区域偶联, 而来自屎肠球菌 (EF) 的rpmD用于偶联gap与重链基因。

(B)粗制培养物上清液中抗人TNF活性的定量。双顺反子构建体高度表达了重链和轻链二者,产生了高水平的功能性CDP870抗TNF Fab。

[0086] 图14:产生抗hTNF之乳酸乳球菌(sAGX0220)在A20^{IEC-KO}小鼠中对hTNF诱导毒性和炎性细胞因子产生的作用,(a)用载体、sAGX0220或MG1363将A20^{IEC-KO}小鼠(n=5/组)预处理1小时后注射2 μ g(左图)和6 μ g(右图)重组hTNF,并且随时间追踪体温。向一组A20^{IEC-KO}小鼠注射类克(Remicade)后注射6 μ g hTNF。(b)注射2 μ g hTNF5小时后回肠、近端结肠和血清中的MCP-1水平。(c)注射2 μ g hTNF5小时后回肠匀浆中的KC和IL-6水平。(d)注射6 μ g hTNF5小时后回肠、近端结肠和血清中的MCP-1水平。(e)注射6 μ g hTNF5小时后回肠匀浆中的KC和IL-6水平。误差线表示SEM。*,p<0.05。

[0087] 图15:根据本发明一个实施方案的菌株中的CDP870产生。(A)整合在usp45基因座、enoA基因座或gapB基因座中的CDP870重链和轻链。(B)表明在根据本发明一个实施方案的不同菌株中CDP870表达的Western印迹分析。(C)和(D)表明在根据本发明一个实施方案的不同菌株中CDP870表达的ELISA分析。(E)根据本发明一个实施方案的不同菌株的TNF中和活性。

[0088] 图16:与用野生型乳酸乳球菌菌株处理的小鼠和用Cimzia处理的小鼠相比,患有诱导型TNBS结肠炎的Tg1278小鼠用根据本发明一个实施方案的菌株(分泌抗hTNF的乳酸乳球菌菌株SAGX0309)处理后的存活。

[0089] 图17:与用野生型乳酸乳球菌菌株处理的小鼠和用Cimzia处理的小鼠相比,患有诱导型TNBS结肠炎的Tg1278小鼠用根据本发明一个实施方案的菌株(分泌抗hTNF的乳酸乳球菌菌株sAGX0309)处理后的体重演变。上图:绝对体重(g);下图:相对于初始体重的体重(%)。

[0090] 图18:与用野生型乳酸乳球菌菌株处理的小鼠和用Cimzia处理的小鼠相比,患有诱导型TNBS结肠炎的Tg1278小鼠用根据本发明一个实施方案的菌株(分泌抗hTNF的乳酸乳球菌菌株sAGX0309)处理后结肠组织的组织学评分。平均值示于条上。示出每组的存活率。

[0091] 图19:与健康小鼠、用野生型乳酸乳球菌菌株处理的小鼠和用Cimzia处理的小鼠相比,患有诱导型TNBS结肠炎的Tg1278小鼠用根据本发明一个实施方案的菌株(分泌抗hTNF的乳酸乳球菌菌株sAGX0309)处理后的促炎性细胞因子分泌。(A)、(B)和(C)分别表示远端结肠中的mIL6、mKC和mMCP1水平,以pg/mg为单位。

[0092] 发明详述

[0093] 除非上下文另有清楚规定,否则本文未使用数量词限定时包括单数和复数指示物二者。

[0094] 本文使用的术语“包含”和“含有”与“包括”同义,并且是包括性或开放式的,并且不排除另外的未叙述的成员、要素或方法步骤。应理解,本文使用的术语“包含”和“含有”包括术语“由……组成”以及术语“基本由……组成”。

[0095] 通过端点叙述的数值范围包括包括在各个范围内的所有数字和部分,以及所叙述的端点。

[0096] 本文使用的术语“约”当涉及可测量值例如参数、量、时距等时,意指涵盖给定值的+/-20%或更小,优选+/-10%或更小,更优选+/-5%或更小并且又更优选+/-1%或更小的变化,其程度为这些变化适用于在所公开的本发明中执行。应理解修饰词“约”涉及的值自

身也是具体的,并优选是公开的。

[0097] 虽然术语“一或更多”或“至少一”,例如一组成员的一个或更多个或至少一个成员自身通过进一步举例变得清楚,但是术语尤其涵盖涉及所述成员的任意一个或者所述成员的任意两个或更多个,例如,所述成员的任意 ≥ 3 、 ≥ 4 、 ≥ 5 、 ≥ 6 或 ≥ 7 等,并且多至所有的所述成员。

[0098] 本说明书引用的所有参考文献都通过引用整体并入本文。特别地,本文所具体引用的所有参考文献的教导通过引用并入本文。

[0099] 除非另有定义,否则用于公开本发明的所有术语,包括技术术语和科学术语,具有如本发明所属领域普通技术人员通常理解的意思。通过进一步的指导,包括术语定义以更好地理解本发明的教导。

[0100] 在下文中,更详细地定义了本发明的不同方面。除非明确指明有矛盾,否则如此定义的每个方面可与任意其他的一个或更多个方面组合。特别地,指示为优选的或有利的的任意特性可与指示为优选的或有利的的任意其他任意特性组合。

[0101] 贯穿本说明书,提及“一个实施方案”意指关于所述实施方案所描述的具体特性、结构或特征包括在本发明的至少一个实施方案中。因此,贯穿本说明书在不同地方短语“在一个实施方案中”的出现不一定都涉及相同的实施方案,而是可能涉及相同的实施方案。此外,如由本公开对于本领域技术人员显而易见的,在一个或更多个实施方案中,可以以任意合适方式组合具体特性、结构或特征。此外,如本领域技术人员所理解的,虽然本文所述的一些实施方案包括包括在另一些实施方案中的一些特性而不包括其另一些特征,但是不同实施方案的特性的组合意味着在本发明的范围内,并且构成不同的实施方案。例如,在所附权利要求中,可以以任意组合使用所要求保护的实施方案中的任意一个。

[0102] 在以下的本发明详述中,参照构成本发明一部分并且其中仅通过阐明本发明可实施的具体实施方案示出的附图。应理解,可利用另一些实施方案并且可作出结构或逻辑变化而不偏离本发明的范围。因此,以下的详细描述不应视为限制意义,并且本发明的范围由所附权利要求书限定。

[0103] 列出重组DNA技术一般原理的标准参考书包括Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第2版,第1-3卷,Sambrook等编,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.,1989;Current Protocols in Molecular Biology,Ausubel等编,Green Publishing and Wiley-Interscience,New York,1992(定期更新) (“Ausubel等.1992”);Innis等,PCR Protocols:A Guide to Methods and Applications,Academic Press:San Diego,1990。例如在Davis,B.D.等,Microbiology,第3版,Harper&Row,publishers,Philadelphia,Pa.(1980)中列出了微生物学的一般原则。

[0104] 如所指出的,本发明的一个方面涉及包含与一个或更多个外源基因转录或翻译偶联的内源基因的革兰氏阳性菌。优选地,一个或更多个外源基因在内源基因的下游(即,在3'末端)转录或翻译偶联。一个相关方面提供了包含多顺反子表达单元的革兰氏阳性菌,所述多顺反子表达单元包含内源基因和一个或更多个外源基因。优选地,多顺反子表达单元连续地包含一个或更多个内源基因和一个或更多个外源基因。另一个方面提供了包含多顺反子表达单元的重组核酸,所述多顺反子表达单元包含与一个或更多个对革兰氏阳性菌外源的基因转录或翻译偶联的对所述革兰氏阳性菌内源的基因。优选地,一个或更多个外源

基因在内源基因的下游(即,在3,末端)转录或翻译偶联。

[0105] 优选地,一个或多个外源基因是多顺反子表达单元的最3' 基因,即,一个或多个外源基因是多顺反子表达单元的最后的或最下游基因。例如,如果内源基因是单顺反子,则一个或多个外源基因位于所述基因开放阅读框之后或下游(即,3' 末端),并且与其转录偶联。类似地,如果内源基因自身是多顺反子的,例如操纵子(的一部分),则一个或多个外源基因位于内源多顺反子基因最后(即,最下游或最3') 的内源基因之后或下游(即,3' 末端)。

[0106] 最优选地,贯穿本说明书,本文所提及的内源基因是单顺反子。因此,内源基因优选地不构成内源操纵子的一部分。

[0107] 优选地,本文所述的多顺反子表达单元的表达通过可以是或可展现出以下特征的一种或更多种的启动子来实现:组成型启动子、中心代谢基因启动子、必需基因启动子、强启动子、管家基因启动子、核糖体基因启动子、糖酵解基因启动子。最优选地,启动子是组成型启动子。

[0108] 本文使用的术语“革兰氏阳性菌”具有其在本领域中已知的普通意思。对于进一步的指导,革兰氏阳性菌可通过革兰氏染色为保留结晶紫染色来鉴定。

[0109] 在一个优选实施方案中,根据本发明的革兰氏阳性菌是非致病性的,即其在施用于目的对象时不造成伤害或不引起有害作用。

[0110] 优选地,根据本发明的革兰氏阳性菌是乳酸菌(LAB),包括但不限于乳球菌属(*Lactococcus*)、乳杆菌属(*Lactobacillus*)、明串珠菌属(*Leuconostoc*)、片球菌属(*Pediococcus*)、链球菌属(*Streptococcus*)、气球菌属(*Aerococcus*)、肉食杆菌属(*Carnobacterium*)、肠球菌属(*Enterococcus*)、酒球菌属(*Oenococcus*)、芽孢乳杆菌属(*Sporolactobacillus*)、四体球菌属(*Tetragenococcus*)、漫游球菌属(*Vagococcus*)和魏斯氏菌属(*Weissella*)。更优选地,LAB是乳球菌物种例如但不限于乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)、格氏乳球菌(*Lactococcus garvieae*)、*Lactococcus piscium*、植物乳球菌(*Lactococcus plantarum*)和棉子糖乳球菌(*Lactococcus raffinolactis*)及其任意亚种和菌株。最优选地,乳球菌物种是乳酸乳球菌及其任意亚种和菌株,例如但不限于乳酸乳球菌乳脂亚种(*Lactococcus lactis* ssp.*cremoris*)、乳酸乳球菌霍氏亚种(*Lactococcus lactis* ssp.*hordniae*)、乳酸乳球菌乳酸亚种(*Lactococcus lactis* ssp.*lactis*)、乳酸乳球菌亚种双乙酰乳酸变种(*Lactococcus lactis* ssp.*bv.diacetylactis*)。在本发明的另一些优选实施方案中,乳酸乳球菌是乳酸乳球菌乳脂亚种或乳酸乳球菌乳酸亚种,更优选是乳酸乳球菌乳脂亚种,并且涵盖其任意菌株,例如,乳酸乳球菌乳脂亚种SK11、乳酸乳球菌乳脂亚种MG1363或乳酸乳球菌乳酸亚种IL1403。在另一个优选实施方案中,LAB是肠球菌物种优选粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)、屎肠球菌(*Enterococcus faecium*)及其任意亚种和菌株,例如但不限于屎肠球菌菌株LMG15709。

[0111] 在另一个优选实施方案中,根据本发明的革兰氏阳性菌是双歧杆菌。

[0112] 双歧杆菌是革兰氏阳性的,非运动性的,通常分支的厌氧细菌的属。本文使用的双歧杆菌可包括青春双歧杆菌(*B. adolescentis*)、有角双歧杆菌(*B. angulatum*)、动物双歧杆菌(*B. animalis*)、星形双歧杆菌(*B. asteroides*)、两歧双歧杆菌(*B. bifidum*)、波恩双歧杆菌(*B. bourn*)、短双歧杆菌(*B. breve*)、链状双歧杆菌(*B. catenulatum*)、小猪双歧杆菌

(*B.choerinum*)、棒状双歧杆菌(*B.coryneforme*)、兔双歧杆菌(*B.cuniculi*)、*B.denticolens*、齿双歧杆菌(*B.dentium*)、嘉利肯双歧杆菌(*B.gallicum*)、鸡双歧杆菌(*B.gallinarum*)、印度双歧杆菌(*B.indicum*)、婴儿双歧杆菌(*B.infantis*)、*B.inopinatum*、乳双歧杆菌(*B.lactis*)、长双歧杆菌(*B.longum*)、巨大双歧杆菌(*B.magnum*)、瘤胃双歧杆菌(*B.merycicum*)、微小双歧杆菌(*B.minimum*)、假链状双歧杆菌(*B.pseudocatenulatum*)、假长双歧杆菌(*B.pseudolongum*)、小鸡双歧杆菌(*B.pullorum*)、反刍双歧杆菌(*B.ruminantium*)、沙库来双歧杆菌(*B.saeculare*)、沙布提双歧杆菌(*B.subtile*)、猪双歧杆菌(*B.suis*)、嗜嗜酸性双歧杆菌(*B.thermacidophilum*)、嗜热双歧杆菌(*B.thermophilum*)。优选地,双歧杆菌是青春双歧杆菌、两歧双歧杆菌、短双歧杆菌、婴儿双歧杆菌、长双歧杆菌。应理解双歧杆菌的所有亚种和菌株也包括在内。

[0113] 如本文在内源和外源基因环境下使用的术语“连续”指多核酸、载体或染色体中各基因的5'至3'顺序。例如,连续地包含一个或更多个内源基因和一个或更多个外源基因的多顺反子表达单元是指其中一个或更多个内源基因定位在一个或更多个外源基因上游的单元。因此,一个或更多个外源基因定位在一个或更多个内源基因的3'末端之后。应理解,如本文所述的连续偶联或排序不一定意味着内源基因与外源基因直接偶联。在内源基因与外源基因之间可存在另外的序列。作为一个实例,如本文另外定义的基因间区域可存在于连续的内源基因与外源基因之间(即,内源基因的下游或3'与外源基因的上游或5')。本文使用的术语“内源基因”、“内源启动子”、“内源基因间区域”、“内源核糖体结合位点”分别指革兰氏阳性菌天然的或者在自然中可在革兰氏阳性菌中发现的基因、启动子、基因间区域或核糖体结合位点。因此,术语内源基因、启动子、基因间区域或核糖体结合位点涵盖革兰氏阳性菌不同属、种、亚种或菌株之间直系同源(orthologous)的基因、启动子、基因间区域和核糖体结合位点。特别地,认为分离自革兰氏阳性菌一个属、种、亚种或菌株的基因、启动子、基因间区域或核糖体结合位点对于革兰氏阳性菌所有的其他属、种、亚种或菌株是内源的(不考虑可能的多核酸序列差异),前提条件是革兰氏阳性菌的所述其他属、种、亚种或菌株也天然地包含这样的基因、启动子、基因间区域或核糖体结合位点。因此,这这种相异但天然存在的基因、启动子、基因间区域或核糖体结合位点序列被认为是内源的。例如并非限制,分离自乳酸乳球菌乳酸亚种的编码烯醇酶的基因 $enoA$ 也被认为对于乳酸乳球菌乳脂亚种是内源的。

[0114] 但是,优选地,如本文所意图的革兰氏阳性菌给定属、种、亚种或菌株的“内源”基因、启动子或基因间区域可分别指在革兰氏阳性菌同一属、种、亚种或菌株中天然的(即,对其为自然存在的或自身的)基因、启动子或基因间区域。例如并非限制,分离自乳酸乳球菌乳酸亚种的编码烯醇酶的基因 $enoA$ 可优选地被认为对于乳酸乳球菌乳酸亚种是“内源”的,而对于乳酸乳球菌乳脂亚种不是。

[0115] 本文使用的术语“外源基因”是指对于革兰氏阳性菌不是天然的或者不能在自然中在革兰氏阳性菌中发现的基因。术语外源基因与术语异源基因同义。外源基因可以是全长基因或者可替代地是截短基因或基因片段。例如,外源基因可来源于病毒,其他原核生物例如革兰氏阴性菌,或可替代地并且优选地可来源于真核生物,例如植物、动物、优选哺乳动物,最优选人。可替代地,外源基因可以是完全或部分合成或人造的,即其完全或部分不天然存在。此外,外源基因可以是嵌合的,即其可由来源于不同物种的序列或天然序列和合

成或人造序列的组合构成。还涵盖了由革兰氏阳性菌序列和对革兰氏阳性菌外源的序列构成的嵌合序列,例如,编码由革兰氏阳性菌分泌信号肽和外源蛋白质构成的融合蛋白的序列。

[0116] 因为真核基因在大多数情况下在外显子旁包含内含子,所以本领域技术人员应理解,根据本发明,外源基因的任何提及涉及这种基因的不含内含子的开放阅读框,即这种基因的蛋白质编码序列。术语“开放阅读框”或ORF指一连串的编码核苷酸三联体,以翻译起始密码子(例如,ATG或GTG)开始并且以翻译终止密码子(例如,TAA、TAG或TGA)结束并且编码单一多肽。

[0117] 原核基因(特别是来自革兰氏阳性菌的基因)不包含内含子。因此,原核基因的编码序列或开放阅读框对应于位于原核基因组(特别是细菌染色体)上的一连串编码核苷酸三联体,其以翻译起始密码子开始并以翻译终止密码子结束。

[0118] 因此,在一个方面中,本发明涉及包含与一个或更多个外源开放阅读框或编码序列转录或翻译偶联的内源开放阅读框或编码序列的革兰氏阳性菌。

[0119] 本领域技术人员应理解,虽然术语“基因”一般来说可以指对应于遗传单元的基因组序列的定位区(locatable region),其与转录和翻译调节区例如普里布诺盒(pribnow box)、夏因-达尔加诺序列、操纵基因、终止子、转录区和/或其他功能性序列区缔合,除非另有明确说明,否则在本文所述的外源序列环境中术语“基因”的任意提及优选地指所述基因的编码序列或开放阅读框。在本文所述的内源序列环境中术语“基因”的任意提及可以指对应于遗传单元的基因组序列的定位区,其与调节区、转录区和或其他功能性序列区缔合,但是可替代地,也可指所述基因的编码序列或开放阅读框。

[0120] 本文使用的术语“翻译偶联”与“翻译连接”同义。这些术语本质上与多顺反子表达系统或单元有关。当共有的调节元件(例如特别是共有的启动子)实现两个或更多个基因转录为编码所述两个或更多个基因、开放阅读框或编码序列的单一mRNA,然后可翻译为两个或更多个单独多肽序列时,所述两个或更多个基因、开放阅读框或编码序列认为是翻译偶联的。本领域技术人员应理解,细菌操纵子是其中两个或更多个基因翻译或转录偶联的天然多顺反子表达系统或单元。根据本发明,转录偶联是翻译偶联的基础。

[0121] 因此,在一个方面中,本发明涉及包含与一个或更多个外源基因、开放阅读框或编码序列转录偶联的内源基因的革兰氏阳性菌。优选地,革兰氏阳性菌连续地包含内源基因与一个或更多个外源基因、开放阅读框或编码序列转录偶联。本文使用的术语“转录偶联”与“转录连接”同义。这些术语一般是指包含共同转录为单一mRNA并且可翻译为两条或更多条单独多肽的两个或更多个开放阅读框或编码序列的多核酸序列。

[0122] 在另一些方面中,本发明涉及包含多顺反子表达单元的革兰氏阳性菌或重组核酸,所述多顺反子表达单元包含内源基因和一个或更多个外源基因、开放阅读框或编码序列。

[0123] 本文使用的术语“多顺反子表达单元”或“多顺反子表达系统”是指其中两个或更多个基因的表达受共同调节机制(例如启动子、操纵基因等)调节的单元。本文使用的术语多顺反子表达单元与多个顺反子表达单元同义。多顺反子表达单元的实例是但不限于双顺反子表达单元、三顺反子表达单元、四顺反子表达单元。包含编码单独表达产物例如蛋白质、多肽和/或肽的两个或更多个(例如3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个)开放阅读框或编码

区的任何mRNA涵盖在术语多顺反子中。

[0124] 在一个实施方案中,如本文所述翻译或转录偶联的一个或更多个内源基因与一个或更多个外源基因被对革兰氏阳性菌内源的启动子转录控制。在另一个实施方案中,如本文所述的多顺反子表达单元或系统被对革兰氏阳性菌内源的启动子转录控制。

[0125] “启动子”一般意指核酸分子(优选DNA分子)上的RNA聚合酶与之结合并使转录开始的区域。启动子优选地但不一定定位在其控制转录的序列的上游,即5’。

[0126] 在另一个实施方案中,如本文所述翻译或转录偶联的一个或更多个内源基因与一个或更多个外源基因受所述一个或更多个内源基因(之一)的天然启动子转录控制。在另一个实施方案中,如本文所述的多顺反子表达单元或系统受包含在所述多顺反子表达系统或单元中的所述一个或更多个内源基因(之一)的天然启动子转录控制。在另一个实施方案中,如本文所述的多顺反子表达单元或系统与革兰氏阳性内源启动子可操作性连接。

[0127] 本文使用的术语“可操作性连接的”或“可操作性连接”是这样的连接,其中调节DNA序列与试图表达的DNA序列以这种方式连接以允许表达。例如,如果连接或结合允许或实现了所述基因的表达,则认为启动子与基因、开放阅读框或编码序列可操作性连接。在另一个实例中,如果连接或结合允许或实现了至少3’基因的翻译,则认为5’和3’基因、顺反子、开放阅读框或编码序列在多顺反子表达单元中可操作性连接。

[0128] 例如,如果序列之间连接的性质不(1)导致引入移码突变,(2)干扰启动子指导开放阅读框转录的能力或(3)干扰开放阅读框通过启动子区序列转录的能力,则认为DNA序列(例如,优选启动子和开放阅读框)可操作性连接。

[0129] 在一个示例性的优选实施方案中,启动子可定位在其与之可操作性连接的开放阅读框的上游,即5’。

[0130] 本领域技术人员应理解,启动子可与另外的天然调节序列或区域(例如操纵基因)缔合。表达所需的调节区的精确性质可随生物体而改变,但是一般应包含启动子区,在原核生物中包含启动子(指导RNA转录的开始)以及在转录为RNA时发出开始蛋白质合成信号的DNA序列二者。这样的区域通常包含参与转录和翻译开始的那些5’非编码序列,例如普里布诺盒(参见,TATA盒)、夏因-达尔加诺序列等。

[0131] 在另一个实施方案中,启动子是多顺反子表达单元中最5’(即,最上游)内源基因的天然启动子。

[0132] 本文使用的在启动子环境(或引申至涉及内源基因的基因表达)下的术语“组成型”是指允许其缔合基因连续转录的启动子。特别地,在这种启动子控制下一种或更多种缔合基因的转录不依赖于任何诱导物或其他调节信号而发生。

[0133] 本文使用的术语“管家基因”或“管家启动子”是指维持基础细胞功能所需的基因或基因的启动子。虽然一些管家基因以相对恒定的水平表达,但是其他管家基因可根据外部条件或实验条件改变。管家基因可例如参与代谢、基因表达(例如,基础转录机制)、信号转导,但是也可以是结构基因。

[0134] 本文使用的“糖酵解基因”或“糖酵解启动子”是指参与糖酵解途径的基因或基因的启动子,并且包括编码糖酵解酶的基因的启动子,特别是编码己糖激酶、磷酸葡萄糖异构酶、磷酸果糖激酶、果糖二磷酸醛缩酶、磷酸丙糖异构酶、磷酸甘油醛脱氢酶、磷酸甘油酸激酶、磷酸甘油酸变位酶、烯醇酶和丙酮酸激酶的基因的启动子。

[0135] 本文使用的“核糖体基因”或“核糖体启动子”是指核糖体基因的基因或启动子,包括编码核糖体蛋白质的基因以及转录为核糖体RNA的基因。优选地,其可以指核糖体蛋白质的基因或启动子。

[0136] 本文使用的“中心代谢基因”或“中心代谢启动子”或者可替代地“基础代谢基因”或“基础代谢启动子”是指参与关键代谢途径的基因或基因的启动子,并且包括参与糖酵解、戊糖-磷酸途径和三羧酸(TCA)循环的基因。

[0137] 本文使用的在基因环境(或引申至涉及这些基因的启动子)下的术语“必需”涉及这样的基因,其天然表达产物的不存在对于宿主是不利的(例如,特别是致死的),或者可替代地改变、抑制或阻止正常生理或功能(例如,特别是增殖或生长)。应理解,本文使用的在基因或基因的启动子环境下的术语“必需”涉及组成型必需的,与条件性必需的是不同的。例如,几种革兰氏阳性菌(特别是乳酸菌例如乳球菌属)中的乳糖操纵子基因例如 β -半乳糖苷酶基因当在包含乳糖作为主要或唯一碳源的培养基中培养细菌时可以是必需的,当在包含替代性碳源的培养基中培养细菌时这些基因则是非必需的。因此,如本文所意图的,这些基因仅是条件性必需的,而不是组成型必需的。

[0138] 在一个优选实施方案中,如本文所述的内源启动子和/或内源基因选自包含对应于以下乳球菌启动子和/或基因(更优选乳酸乳球菌乳脂亚种菌株MG1363启动子和/或基因)的革兰氏阳性菌启动子和/或基因的组或者由其组成的组:1) DNA指导的RNA聚合酶, β' 亚基/160kD亚基(rpoC);2) DNA指导的RNA聚合酶, β 亚基/140kD亚基(rpb2或rpoB);3) DNA结合铁蛋白样蛋白(氧化性损伤保护蛋白)(dps);4) 丙酮酸激酶(pyk);5) 谷氨酰基和谷氨酰胺酰基tRNA合成酶(glnS或gltX);6) 烯醇酶(eno);7) 谷氨酰胺合成酶(glnA);8) HTH型转录调节子(glnR);9) Xaa-His二肽酶(argE或pepV);10) F₀F₁型ATP合酶 β 亚基(ATP合酶F₁ β 亚基)(atpD);11) 3-磷酸甘油酸激酶(pgk);12) 甘油醛-3-磷酸脱氢酶/赤藓糖-4-磷酸脱氢酶(gapA或gapB);13) 乙酸激酶(ackA);14) 3-氧酰基-(酰基-载体-蛋白)合酶(fabB或fabF);15) 3-氧酰基-(酰基-载体-蛋白)还原酶(fabG);16) DNA指导的RNA聚合酶, α 亚基/40kD亚基(rpoA);17) Xaa-Pro氨基酸肽酶(pepP);18) 果糖/塔格糖二磷酸醛缩酶(tbp或fbaA);19) 核糖体蛋白S4(rpsD);20) 超氧化物歧化酶(sodA);21) 核糖体蛋白S12(rpsL)和核糖体蛋白S7(rpsG);22) 核糖体蛋白L18(rplR)和核糖体蛋白S5(rpsE)和核糖体蛋白L30/L7E(rpmD);23) S-核糖基高半胱氨酸裂合酶(S-ribosylhomocysteine lyase)(luxS);24) 核糖体蛋白L19(rplS);25) 核糖体蛋白S11(rpsK);26) 核糖体蛋白L10(rplJ);27) 核糖体蛋白L7/L12(rplL);28) 细菌类核DNA结合蛋白/DNA结合蛋白HU(hup或h11A);29) 50S核糖体蛋白L28(rpmB);30) 磷酸转移酶系统纤维二糖特异性组分IIB(lace或ptcB);31) F₀F₁型ATP合酶 α 亚基(atpA);32) ABC型糖转运系统(ATP酶组分)(malK或msmK);33) 乙偶姻脱氢酶复合物E1组分 α 亚基(acoA或pdhA);34) 细胞分裂蛋白(difIVA或ftsA);35) UDP-吡喃半乳糖变位酶(glf);36) 谷氨酰基氨基酸肽酶(frvX或pepA);37) 预测的脱氢酶相关蛋白(mviM或llmg_0272);38) 核糖体蛋白S2(rpsB);39) 翻译起始因子3(IF-3)(infC);40) 核糖体蛋白L4(rplD)和核糖体蛋白L23(rplW)和核糖体蛋白L2(rplB);41) EMAP结构域(ydjD);42) 转录延伸因子(greA);43) ATP依赖性Clp蛋白酶的蛋白酶亚基(clpP);44) 核糖体蛋白L15(rpl0);45) 核糖体蛋白L11(rplK);46) 核糖体蛋白S8(rpsH);47) 核糖体蛋白L21(rplU);48) 核糖体蛋白S13(rpsM);49) 核糖体蛋白S19(rpsS)和核糖体蛋白L22(rplU或rplV)和核糖体蛋白

L16 (rp1P) 和核糖体蛋白 L14 (rp1N) ; 50) 核糖体蛋白 S10 (rpsJ) ; 51) 共伴侣蛋白 (co-chaperonin) GroES (Hsp10) (cpn10) ; 52) 核糖体蛋白 L24 (rp1X) ; 53) 假设蛋白 LACR_0137 (duf965) 和 54) 分泌的 45kDa 蛋白 (usp45)。优选地, 内源启动子和/或内源基因选自包含 enoA、usp45、gapB、pyk、rpmB 和 rp1S 的组或者由其组成的组。在例如 W02008/08411 (通过引用并入本文) 中公开了这些启动子及其序列, 例如表 1 及其图 1A 至 H。在一个实施方案中, 本发明涉及如本文所述的革兰氏阳性菌或重组核酸, 其中内源基因与一个或更多个外源基因受对革兰氏阳性菌而言内源的启动子、优选地通过选自所述革兰氏阳性菌的 eno、usp45、gap、pyk、rpmB 和 rp1S 启动子的内源启动子转录控制。在另一个实施方案中, 内源基因位于革兰氏阳性菌中其天然染色体基因座中。

[0139] 在一个优选实施方案中, 所述一个或更多个外源基因、开放阅读框或编码序列与所述一个或更多个内源基因、开放阅读框或编码序列的 3' 末端翻译或转录偶联。因此, 在一个实施方案中, 本发明提供了包含多顺反子表达单元的革兰氏阳性菌, 其中所述多顺反子表达单元包含一个或更多个 5' 内源基因和一个或更多个 3' 外源基因。优选地, 多顺反子表达单元的最 5' 基因是内源基因。例如并非限制, 多顺反子表达单元可从 5' 末端至 3' 末端包含内源基因、然后是一个或更多个内源基因、然后是一个或更多个外源基因, 或者基本由其组成。可替代地但非限制, 多顺反子表达单元可由 5' 末端至 3' 末端包含内源基因、然后是一个或更多个外源基因, 或者基本由其组成。可替代地, 多顺反子表达单元可由 5' 末端至 3' 末端包含内源基因、然后是一个或更多个外源基因, 然后是一个或更多个内源基因, 或者基本由其组成。

[0140] 如本文所述的翻译偶联或转录偶联的一个或更多个内源基因和一个或更多个外源基因或者多顺反子表达单元或系统可包含在复制子中, 所述复制子允许在如本文所述的根据本发明之革兰氏阳性菌中维持和/或增殖并表达内源基因和外源基因。

[0141] 在一个实施方案中, 如本文所述的翻译偶联或转录偶联的一个或更多个内源基因和一个或更多个外源基因 (任选地包含如本说明书其他地方所述的 (内源) 启动子) 或者多顺反子表达单元或系统可包含在载体中, 优选允许在革兰氏阳性菌中表达的载体中。因此, 本发明还涉及包含如本文所述的重组核酸的载体。

[0142] 本文使用的“载体”是指在其中可插入和克隆 (即, 增殖) 核酸片段的核酸分子, 通常是 DNA。因此, 载体通常包含一个或更多个独特的限制位点, 并且可以能够在限定宿主或运载生物体中自主复制使得克隆序列可再生。根据情况, 载体可包括但不限于质粒、噬菌粒、噬菌体、噬菌体源载体、PAC、BAC、线性核酸 (例如线性 DNA) 等 (参见, 例如 Sambrook 等, 1989; Ausubel 1992)。

[0143] 在具体载体 (例如质粒) 的选择中的重要因素尤其包括: 包含载体的受体细胞可不包含载体的那些受体细胞中被识别并选择的容易程度; 具体宿主中期望的载体的拷贝数; 以及是否期望能够使载体在不同物种的宿主细胞之间“穿梭”。优选的原核载体包括质粒, 例如能够在大肠杆菌中复制的那些 (例如, pBR322、ColE1, pSC101, puC19 等)。这样的质粒在例如 Sambrook 等, 1989; Ausubel 1992 中进行了描述。特别优选的载体可以是能够在大肠杆菌 (或其他革兰氏阴性菌) 中以及在另一种目的宿主细胞例如革兰氏阳性菌 (乳酸菌, 优选乳球菌, 更优选乳酸乳球菌) 中复制的那些载体 (参见, 例如 Kok 等 .Appl.Environ.Microbiol., 1984, vol.48 (4), 726-31)。另一些优选的载体可以是能够在

一种或更多种革兰氏阳性菌而不能在革兰氏阴性菌中复制和/或穿梭的那些载体。在一个优选实施方案中,载体是如Steidler等Appl.Environ.Microbiol.,1995,vol.61(4),1627-1629(通过引用具体地并入本文)所述的pT1NX。

[0144] 在另一个实施方案中,可将如本文所述的翻译偶联或转录偶联的一个或更多个内源基因和一个或更多个外源基因或者多顺反子表达单元或系统整合在革兰氏阳性菌基因组或染色体中,用于得到重组革兰氏阳性菌和随机以及同源重组的方法在本领域中是公知的,以及用于实现重组的载体也是公知的。通过进一步的指导,例如在Steidler等(2003, Nature Biotechnology,21:785-789)、Law等(1995,J Bacteriol,177(24):7011-7018)、Leenhouts等(1998,Methods in Cell Science,20:35-50)和WO2004/046346中描述了这样的方法和载体,其通过引用整体并入本文。优选地,通过经同源重组将需要序列定点整合在细菌染色体中来产生或引入如本文所述的多顺反子表达单元。

[0145] 在一个实施方案中,重组载体包含如本说明书其他地方所述的内源启动子和任选的另外的调节序列,以及如本文所述的多顺反子表达单元。优选地,内源启动子与多顺反子表达单元可操作性连接。可在预定基因座处实现同源重组。这样的系统是高度模块化的(modular),并且允许启动子、调节序列、内源基因和外源基因的单选选择和组合,以及插入位点的选择。

[0146] 在另一个实施方案中,根据本发明的革兰氏阳性菌在其天然基因座处(即,在细菌染色体上其天然基因组环境中)包含如本说明书其他地方所述的内源启动子,其与包含一个或更多个内源基因、开放阅读框或编码序列和一个或更多个外源基因、开放阅读框或编码序列的多顺反子表达单元可操作性连接。可操作性连接可通过包含启动子的基因座与包含多顺反子表达单元(两侧是构造成实现所述同源重组的序列)的重组载体之间的同源重组来实现。因此,在一个实施方案中,本发明涉及如本文所述的革兰氏阳性菌,其中内源基因与一个或更多个外源基因转录偶联,这通过将一个或更多个外源基因染色体整合至所述基因座,优选地通过将一个或更多个外源基因染色体整合至所述基因座的内源基因3'来进行。

[0147] 可选择载体设计使得仅内源基因和/或外源基因的开放阅读框或编码序列整合到目的染色体基因座中。在这种情况下,通过启动子的天然基因组基因座提供了实现转录和/或翻译的启动子自身旁边的调节序列(例如操纵基因、转录起始位点、夏因-达尔加诺序列、终止子序列等)。可替代地,可在包含多顺反子表达单元的重组载体上提供这样的序列。在后一种情况下,根据需要,与内源启动子缔合的天然调节序列可在同源重组期间移除。本文所述的系统关于内源基因、外源基因和可能的调节序列的单选选择是模块化的,但是其预定了所选择启动子的内源基因座处的插入位点。

[0148] 在另一个实施方案中,根据本发明的革兰氏阳性菌在其天然基因座处(即,在细菌染色体上其天然基因组环境中)包含均在本说明书其他地方描述的内源启动子和一个或更多个内源基因,所述内源启动子和一个或更多个内源基因与一个或更多个外源基因、开放阅读框或编码序列可操作性连接,使得实现了一个或更多个内源基因和一个或更多个外源基因的多顺反子表达。在该系统中,内源启动子和一个或更多个内源基因,以及实现所述一个或更多个内源基因转录和翻译的调节序列存在于其天然基因座中。这些的系统最大程度地保留了革兰氏阳性菌的天然特征。

[0149] 多顺反子表达单元包含至少两个基因、开放阅读框或编码序列。为了使所有基因开始翻译,这些基因的每一个一般都与实现核糖体结合的序列(即,核糖体结合位点)缔合。在原核生物中,核糖体结合位点表示为夏因-达尔加诺(SD)序列,其具有一般的共有序列5'-AGGAGG-3'。SD序列平均位于翻译开始密码子或起始密码子上游(即,5')的约8个碱基对处。根据5'基因终止密码子与3'基因起始密码子之间的距离(以核苷酸的量计),SD序列可通常定位在以下位置处:1)如果距离至少是SD序列的大小则在两种基因的基因间区域中;2)在5'基因与3'基因之间距离较小的情况下,在两种基因之间的基因间区域中,但是与5'基因终止密码子重叠;或者3)如果例如5'基因的终止密码子与3'基因的起始密码子非常接近或重叠,则在5'基因的终止密码子的5'。

[0150] 在一个实施方案中,本发明涉及如本文所述的革兰氏阳性菌或重组核酸,其还包含一条或更多条多核酸序列,所述一条或更多条多核酸序列包含构造成实现一个或更多个外源基因翻译的核糖体结合位点。在另一个实施方案中,本发明涉及如本文所述的革兰氏阳性菌或重组核酸,其还包含构造成实现一个或更多个外源基因翻译的一个或更多个核糖体结合位点。在另一个实施方案中,本发明涉及如本文所述的革兰氏阳性菌或重组核酸,其中所述一个或更多个内源基因与所述一个或更多个外源基因通过核糖体结合位点转录或翻译偶联。在又一个实施方案中,本发明涉及包含如本文所述的多顺反子表达单元的革兰氏阳性菌或重组核酸,其中任意的5'基因与3'基因通过包含核糖体结合位点或(基本)由核糖体结合位点组成的多核酸序列偶联。在一个优选实施方案中,所述核糖体结合位点对于革兰氏阳性菌是内源的。在另一个优选实施方案中,所述核糖体结合位点包含在基因间区域中,优选包含在操纵子基因间区域中。

[0151] 在另一个实施方案中,本发明涉及如本文所述的革兰氏阳性菌或重组核酸,其还包含一条或更多条多核酸序列,所述一条或更多条多核酸序列包含构造成实现一个或更多个外源基因翻译的基因间区域。在另一个实施方案中,本发明涉及如本文所述的革兰氏阳性菌或重组核酸,其还包含构造成实现一个或更多个外源基因翻译的一个或基因间区域。在另一个实施方案中,本发明涉及如本文所述的革兰氏阳性菌或重组核酸,其中所述一个或更多个内源基因与所述一个或更多个外源基因通过基因间区域转录或翻译偶联。在又一个实施方案中,本发明涉及包含如本文所述的多顺反子表达单元的革兰氏阳性菌或重组核酸,其中任意的5'基因与3'基因通过包含基因间区域或由基因间区域组成的多核酸序列偶联。在一个优选实施方案中,所述基因间区域对于革兰氏阳性菌是内源的。在另一个优选实施方案中,所述基因间区域是操纵子基因间区域。

[0152] 本文使用的术语“基因间区域”与“基因间接头”或“基因间间隔物”同义。基因间区域定义为毗连(即,位于相同多核酸序列上的)基因、开放阅读框、顺反子或编码序列之间的多核酸序列。引申开来,基因间区域可包含通过所述基因间区域连接的5'基因的终止密码子和/或3'基因的起始密码子。本文定义的术语基因间区域特别地涉及多顺反子表达单元中毗连基因之间的基因间区域。例如,本文定义的基因间区域可存在于操纵子中的毗连基因之间。因此,在一个实施方案中,本文定义的基因间区域是操纵子基因间区域。

[0153] 在一个实施方案中,基因间区域、接头或间隔物选自包含以下基因间区域的组或由以下基因间区域组成的组:在革兰氏阳性菌rplW、rplP、rpmD、rplB、rpsG、rpsE或rplN前面(即,在其5',更特别地紧邻其5')的基因间区域。在一个实施方案中,所述革兰氏阳性菌

是乳酸菌,优选是乳球菌物种,更优选是乳酸乳球菌,及其任意亚种或菌株。在一个实施方案中,所述基因间区域涵盖rplW、rplP、rpmD、rplB、rpsG、rpsE或rplN的起始密码子和/或其前面(即5')基因的终止密码子。在一个优选实施方案中,本发明涉及如本文所述的革兰氏阳性菌或重组核酸,其中内源基因与一个或多个外源基因通过革兰氏阳性菌中有活性的一个或多个基因间区域转录偶联,优选地其中一个或多个基因间区域对于所述革兰氏阳性菌是内源的,更优选地其中内源基因间区域选自在rplW、rplP、rpmD、rplB、rpsG、rpsE、rplN、rplM、rplE和rplF前面的基因间区域。

[0154] 技术人员应理解,如果基因间区域涵盖5'终止密码子和/或3'起始密码子,则这些各密码子优选地不存在于通过所述基因间区域连接的基因中,从而避免可影响正确的翻译起始和/或终止的双起始密码子和/或终止密码子。用于鉴定基因间区域的方法在本领域是已知的。通过进一步的指导,基因间区域可例如基于预测操纵子和相关启动子及开放阅读框来鉴定,在本领域已知并且可使用用于其的大量软件。

[0155] 在另一个实施方案中,所述基因间区域序列选自包含SEQ ID NO:1至7中任意一种的组或者基本由其组成的组或者由其组成的组:

[0156] SEQ ID NO:1 TAATG

[0157] SEQ ID NO:2 TAATCCATG

[0158] SEQ ID NO:3 TAAGGAGGAAAAAATG

[0159] SEQ ID NO:4 TAATAGAGGAGGAAAAATCGTG

[0160] SEQ ID NO:5 TAAGAAGGGAGATAAGTAAGAATG

[0161] SEQ ID NO:6 TAAGGAAAGGGTAATTAAACATG

[0162] SEQ ID NO:7 TAAGCAAACTAGGAGGAATATAGCATG。

[0163] 在另一个实施方案中,所述基因间区域选自包含以下序列的组或者基本由其组成的组或者由其组成的组:相对于SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2表现出一个错配或者一个核苷酸的缺失或插入的序列,相对于SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:4表现出一个、两个或三个错配或者一个、两个或三个核苷酸的缺失或插入的序列,以及相对于SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:7表现出一个、两个、三个或四个错配或者一个、两个、三个或四个核苷酸的缺失或插入的序列。

[0164] SEQ ID NO:1至7都包含5'终止密码子和3'起始密码子。SEQ ID NO:1至7分别对应于在乳酸乳球菌乳脂亚种菌株MG1363(基因库登录号AM406671.1)的rplW、rplP、rpmD、rplB、rpsG、rpsE或rplN前面的基因间区域。这些序列与乳酸乳球菌乳脂亚种菌株CV56(基因库登录号CP002365.1)、乳酸乳球菌乳脂亚种菌株NZ9000(基因库登录号CP002094.1)、乳酸乳球菌乳脂亚种菌株KF147(基因库登录号CP001834.1)、乳酸乳球菌乳脂亚种菌株IL1403(基因库登录号AE005176.1)和乳酸乳球菌乳脂亚种菌株SK11(基因库登录号CP000425.1)等的对应序列相同。

[0165] 在另一个实施方案中,基因间区域、接头或间隔物选自包含以下基因间区域或由以下基因间区域组成的组:在革兰氏阳性菌的rplP、rpmD、rplM、rpsE、rplE或rplF前面(即,在其5',更特别地紧邻其5')的基因间区域。在一个实施方案中,所述革兰氏阳性菌是乳酸菌,优选是肠球菌物种,更优选是屎肠球菌,及其任意亚种或菌株。在一个实施方案中,所述基因间区域涵盖rplP、rpmD、rplM、rpsE、rplE或rplF的起始密码子和/或其前面(即,5')基

因的终止密码子。技术人员应理解,如果基因间区域涵盖5'终止密码子和/或3'起始密码子,则这些各密码子优选地不存在于通过所述基因间区域连接的基因中,从而避免可影响正确的翻译起始和/或终止的双起始密码子和/或终止密码子。用于鉴定基因间区域的方法在本领域是已知的。通过进一步的指导,基因间区域可例如基于预测操纵子和相关启动子及开放阅读框来鉴定,在本领域已知并且可使用用于其的大量软件。

[0166] 在另一个实施方案中,所述基因间区域序列选自包含SEQ ID NO:8至13中任意一种的组或者基本由其组成的组或者由其组成的组:

[0167] SEQ ID NO:8 TAATC

[0168] SEQ ID NO:9 TAAGGAGGACAACAATA

[0169] SEQ ID NO:10 TAATAGGAGGGAATTTCA

[0170] SEQ ID NO:11 TTAGAAGAAGGAGGAATACCATTTC

[0171] SEQ ID NO:12 TAAAAGTTTAAGGAAGGAGGGTCTTACTGA

[0172] SEQ ID NO:13 TAATCAAGTAGAATCTACAAGGAGGTGTCTTTAA。

[0173] 在另一个实施方案中,所述基因间区域选自包含以下序列的组或者基本由其组成的组或者由其组成的组:相对于SEQ ID NO:8表现出一个错配或者一个核苷酸的缺失或插入的序列,相对于SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:10表现出一个、两个或三个错配或者一个、两个或三个核苷酸的缺失或插入的序列,以及相对于SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:13表现出一个、两个、三个或四个错配或者一个、两个、三个或四个核苷酸的缺失或插入的序列。SEQ ID NO:8至13分别对应于在屎肠球菌菌株LMG15709的rp1P、rpmD、rp1M、rpsE、rp1E和rp1F前面的基因间区域。

[0174] 在一个实施方案中,如本文所述的基因间区域(不包含任意之前的终止密码子并且不包含任意后续的起始密码子)可包含多于1个核苷酸或者由其组成,例如2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25或更多个核苷酸,优选多于5个核苷酸,甚至更优选10个或更多个核苷酸。在另一个实施方案中,基因间区域可包含1至50个核苷酸,例如1至40个、1至30个、1至25个、1至20个、1至15个或1至10个,优选5至50个、5至40个、5至30个、5至25个、5至20个、5至15个或5至10个核苷酸,甚至更优选10至50个、10至40个、10至30个、10至25个、10至20个或10至15个核苷酸。

[0175] 表1和表2描述了如本文所述的包含多顺反子表达单元之革兰氏阳性菌的一些特别优选的实施方案,其中所述革兰氏阳性菌包含内源启动子,在其3'内源基因与如表1和2所述的基因间区域连接,在其3'一个或更多个外源基因、开放阅读框或编码序列与基因间区域连接。在一个优选实施方案中,表1和2所述的每个基因受其天然启动子和任选的调节序列转录控制。在另一个优选实施方案中,所述多顺反子表达单元整合在细菌染色体中。在又一个优选实施方案中,所述内源启动子和/或内源基因存在于细菌基因组或染色体上其天然基因座处。优选地,起始密码子和终止密码子(如果存在的话)分别替换所述外源基因和所述内源基因的起始密码子和终止密码子。

[0176] 表1:示例性多顺反子表达单元可包含内源启动子>>内源基因>>基因间区域>>外源基因或者基本由其组成,其中所述内源基因和基因间区域选自以下组合。

[0177]

内源基因	基因间区域
------	-------

eno	rplW
eno	rplP
eno	rpmD
eno	rplB
eno	rpsG
eno	rpsE
eno	rplN
eno	rplM
eno	rplE

[0178]

eno	rplF
usp45	rplW
usp45	rplP
usp45	rpmD
usp45	rplB
usp45	rpsG
usp45	rpsE
usp45	rplN
usp45	rplM
usp45	rplE
usp45	rplF
gap	rplW
gap	rplP
gap	rpmD
gap	rplB
gap	rpsG
gap	rpsE
gap	rplN
gap	rplM
gap	rplE
gap	rplF
pyk	rplW
pyk	rplP
pyk	rpmD
pyk	rplB
pyk	rpsG
pyk	rpsE
pyk	rplN
pyk	rplM

pyk	rplE
pyk	rplF
rpmB	rplW
rpmB	rplP
rpmB	rpmD
rpmB	rplB
rpmB	rpsG
rpmB	rpsE
rpmB	rplN
rpmB	rplM
rpmB	rplE
rpmB	rplF
rplS	rplW
rplS	rplP
rplS	rpmD
rplS	rplB
rplS	rpsG
rplS	rpsE
rplS	rplN
rplS	rplM
rplS	rplE
rplS	rplF

[0179] 优选地,基因间区域rplW、rplB、rpsG和rplN源自乳球菌物种、亚种或菌株,优选乳酸乳球菌,优选地,基因间区域rplP、rplM和rplE源自肠球菌物种、亚种或菌株,优选粪肠球菌或屎肠球菌,优选地基因间区域rplP、rpmD和rpsE源自乳球菌物种、亚种或菌株,优选乳酸乳球菌;或者源自肠球菌物种、亚种或菌株,优选粪肠球菌或屎肠球菌。

[0180] 例如但非限制,在多顺反子表达单元包含两个外源基因的情况下,表示为内源启动子>>内源基因>>基因间区域>>外源基因>>基因间区域>>外源基因的结构可以如下:usp45>>usp45>>rpmD>>外源基因1>>rplN>>外源基因2;enoA>>enoA>>rpmD>>外源基因1>>rplN>>外源基因2;gapB>>gapB>>rpmD>>外源基因1>>rplN>>外源基因2。例如,这样的布置可特别适合于表达抗体的重链和轻链(优选以所述顺序),例如如本文所教导的抗TNF α 抗体。

[0181] 表2:示例性多顺反子表达单元可包含内源启动子>>内源基因>>基因间区域>>外源基因或者由其组成,其中所述内源基因和基因间区域选自以下组合。

[0182]

内源基因	基因间区域
eno	SEQ ID NO:1
eno	SEQ ID NO:2
eno	SEQ ID NO:3

eno	SEQ ID NO:4
eno	SEQ ID NO:5
eno	SEQ ID NO:6
eno	SEQ ID NO:7
eno	SEQ ID NO:8
eno	SEQ ID NO:9
eno	SEQ ID NO:10
eno	SEQ ID NO:11
eno	SEQ ID NO:12
eno	SEQ ID NO:13
usp45	SEQ ID NO:1
usp45	SEQ ID NO:2
usp45	SEQ ID NO:3
usp45	SEQ ID NO:4

[0183]

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

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

[0184]

rplS	SEQ ID NO:4
rplS	SEQ ID NO:5
rplS	SEQ ID NO:6
rplS	SEQ ID NO:7
rplS	SEQ ID NO:8
rplS	SEQ ID NO:9
rplS	SEQ ID NO:10
rplS	SEQ ID NO:11
rplS	SEQ ID NO:12
rplS	SEQ ID NO:13

[0185] 优选地,具有包含SEQ ID NO:1至7中任意一种的多顺反子表达单元的革兰氏阳性

菌是乳球菌物种、亚种或菌株,优选乳酸乳球菌。优选地,具有包含SEQ ID NO:8至13中任意一种的多顺反子表达单元的革兰氏阳性菌是肠球菌物种、亚种或菌株,优选粪肠球菌或屎肠球菌。

[0186] 技术人员应理解,根据本发明的外源基因、开放阅读框或编码序列可与另外的序列偶联,所述另外的序列实现特殊的目的。例如,为了增加外源基因的分泌,基因可与编码分泌信号肽的核酸序列偶联。在一个特别优选的实施方案中,根据本发明的外源基因、开放阅读框或编码序列在其5'末端与编码Usp45分泌信号的多核酸序列偶联,其优选地源自乳球菌物种,更优选乳酸乳球菌及其亚种和菌株。

[0187] 通常,分泌信号序列是约16至约35个氨基酸的区段,通常包含待包埋在双层脂膜中的疏水氨基酸,从而允许由宿主细胞分泌伴随蛋白或肽序列,其通常从所述蛋白质或肽上切割下来。优选地,分泌信号序列在宿主细胞中可也是有活性的以与包含所述信号序列的核酸一起使用。

[0188] 在合适宿主细胞中具有活性的分泌信号序列在本领域是已知的;示例性乳球菌信号序列包括usp45(参见,US 5,559,007)等(参见,例如,Perez-Martinez等.Mol.Gen.Genet,1992,vol.234,401-11;Sibakov等,Appl.Environ.Microbiol.,1991,vol.57(2),341-8)的那些。优选地,信号序列位于启动子序列与ORF之间,即,信号序列位于启动子序列的3'并且在目的多肽的ORF前面。在一个优选实施方案中,信号序列编码氨基酸序列MKKKIISAILMSTVILSAAAPLSGVYA(usp45)。可替代地,可使用突变的usp45信号序列(usp45N),这导致了进一步可控的目的多肽的生产和分泌。特别地,突变体在4位包含包含代替赖氨酸(K)的天冬酰胺(N),或K4N突变。在一个优选实施方案中,信号序列编码氨基酸序列MKKNIISAILMSTVILSAAA PLSGVYADTN。

[0189] 本发明还涉及包含如本文所述的根据本发明的多顺反子表达单元的多核酸序列。特别地,在一个方面中,本发明涉及包含如本文所述的根据本发明的多顺反子表达单元的多核酸序列,其中所述多顺反子单元包含一个或更多个对革兰氏阳性菌而言内源的基因和一个或更多个对革兰氏阳性菌而言外源的基因、开放阅读框或编码序列,其中所述一个或更多个内源基因与所述一个或更多个外源基因以如本文所述的方式翻译或转录偶联。优选地,一个或更多个内源基因与一个或更多个外源基因的5'末端连接。优选地,一个或更多个内源基因与一个或更多个外源基因通过如本文所述的基因间区域连接,所述基因间区域优选是如本文其他地方所述的在rp1W、rp1P、rpmD、rp1B、rpsG、rpsE和rp1N前面的基因间区域或对应于SEQ ID NO:1至7中任意一种的基因间区域或者如本文其他地方所述的在rp1P、rpmD、rp1M、rpsE、rp1E或rp1F前面的基因间区域或对应于SEQ ID NO:8至13中任意一种的基因间区域或者如以上所述的相关序列。在一个实施方案中,多核酸序列还包含启动子,优选对革兰氏阳性菌内源的启动子。在另一个实施方案中,多核酸序列还包含调节序列,例如操纵基因、终止子等。在一个优选实施方案中,启动子是内源基因的天然启动子。

[0190] 在另一个方面中,本发明涉及包含如本文所述的多核酸序列的复制子。优选地,所述复制子是如本文其他地方所述的载体。在一个实施方案中,所述载体适合于原核表达。在另一个实施方案中,所述载体适合于革兰氏阳性菌中的同源重组。

[0191] 在另一个方面中,本发明涉及包含革兰氏阳性菌的核糖体结合位点和对所述细菌而言外源的基因、开放阅读框或编码序列的多核酸序列,其中构造所述核糖体结合位点以

实现外源基因、开放阅读框或编码序列的翻译。在一个实施方案中,多核酸序列包含革兰氏阳性菌的核糖体结合位点和对所述细菌而言外源的基因、开放阅读框或编码序列,其中所述核糖体结合位点连接在所述外源基因、开放阅读框或编码序列的5'末端。

[0192] 在另一个方面中,本发明涉及包含革兰氏阳性菌的基因间区域(优选操纵子基因间区域)和对所述细菌而言外源的基因、开放阅读框或编码序列的多核酸序列,其中构造所述基因间区域以实现外源基因、开放阅读框或编码序列的翻译。在一个实施方案中,多核酸序列包含革兰氏阳性菌的基因间区域(优选操纵子基因间区域)和对所述细菌而言外源的基因、开放阅读框或编码序列的多核酸序列,其中所述基因间区域连接在所述外源基因、开放阅读框或编码序列的5'末端。优选地,基因间区域是如本文其他地方所述的在rplW、rplP、rpmD、rplB、rpsG、rpsE或rplN前面的基因间区域或对应于SEQ ID NO:1至7中任意一种的基因间区域或者如本文其他地方所述的在rplP、rpmD、rplM、rpsE、rplE或rplF前面的基因间区域或对应于SEQ ID NO:8至13中任意一种的基因间区域或者如以上所述的相关序列。

[0193] 在另一个方面中,本发明涉及这样的多顺反子表达载体,其包含如本文其他地方所述的在rplW、rplP、rpmD、rplB、rpsG、rpsE或rplN前面的基因间区域或对应于SEQ ID NO:1至7中任意一种的基因间区域或者如本文其他地方所述的在rplP、rpmD、rplM、rpsE、rplE或rplF前面的基因间区域或对应于SEQ ID NO:8至13中任意一种的基因间区域或者如以上所述的相关序列。在一个实施方案中,所述载体适合于克隆所述基因间区域3'末端的基因、开放阅读框或编码序列,优选对革兰氏阳性菌而言外源的基因。在一个实施方案中,所述载体适合于在革兰氏阳性菌中复制。在另一个实施方案中,所述载体适合于在革兰氏阳性菌中实现同源重组,特别地适合于染色体整合所述基因间区域与在所述基因间区域3'末端的基因、开放阅读框或编码序列。在一个实施方案中,所述载体还包含一个或更多个启动子,优选革兰氏阳性菌启动子。在另一个实施方案中,所述载体还包含调节序列,例如操纵基因、终止子等。在又一个实施方案中,所述载体还包含一种或更多种选择标志物,例如抗生素抗性基因。

[0194] 在另一个方面中,本发明涉及用于在革兰氏阳性菌中进行外源基因表达的方法,其包括用载体转化所述革兰氏阳性菌的步骤,所述载体包含外源基因、开放阅读框或编码序列,任选地还包含如本文所述的(内源)启动子。

[0195] 在又一个方面中,本发明涉及包含如本文所述之革兰氏阳性菌基因间区域的多核酸序列用于多顺反子表达一个或更多个对所述革兰氏阳性菌而言外源的基因、开放阅读框或编码序列的用途。在一个实施方案中,本发明涉及包含如本文所述之革兰氏阳性菌基因间区域的多核酸序列用于多顺反子表达一个或更多个对所述革兰氏阳性菌而言外源的基因、开放阅读框或编码序列和一个或更多个对所述革兰氏阳性菌而言内源的基因、开放阅读框或编码序列的用途。在一个实施方案中,所述一个或更多个对所述革兰氏阳性菌而言外源的基因与所述内源基因的3'末端偶联。优选地,基因间区域是如本文其他地方所述的在rplW、rplP、rpmD、rplB、rpsG、rpsE或rplN前面的基因间区域或对应于SEQ ID NO:1至7中任意一种的基因间区域或者如本文其他地方所述的在rplP、rpmD、rplM、rpsE、rplE或rplF前面的基因间区域或对应于SEQ ID NO:8至13中任意一种的基因间区域或者如以上所述的相关序列。

[0196] 在另一个方面中,本发明涉及在革兰氏阳性菌中表达一种或更多种外源蛋白质的方法,其包括将如本文所述的编码所述一种或更多种外源蛋白质的多核酸序列或载体引入到所述革兰氏阳性菌中使得转录为多顺反子mRNA的步骤。

[0197] 在又一个方面中,本发明涉及生成能够表达一种或更多种外源蛋白质的革兰氏阳性菌的方法,其包括将如本文所述的编码一种或更多种外源蛋白质的多核酸序列或载体引入到所述革兰氏阳性菌中以转录为多顺反子mRNA的步骤。

[0198] 根据本发明,一个或更多个外源基因、开放阅读框或编码序列可以是任意种类或来源的。在一个实施方案中,一个或更多个外源基因编码蛋白质、多肽和/或肽,优选在对象中具有治疗性或预防性作用的蛋白质、多肽和/或肽,或者优选抗原(例如用于诱导免疫或免疫耐受性的抗原),非致疫苗作用的治疗活性多肽,抗体或其功能性片段(例如Fab),融合蛋白或多聚体蛋白。在一个优选实施方案中,一个或更多个外源基因编码抗体或功能性抗体片段。本文使用的术语“功能性”是指可仍然发挥其预期功能(即,抗体结合)的抗体片段。本文使用的术语抗体包括但不限于,常规抗体、嵌合抗体、dAb、双特异性抗体、三特异性抗体、多特异性抗体、二价抗体、三价抗体、多价抗体、VHH、纳米抗体、Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv、Fv、dAb、Fd、双抗体、三抗体、单链抗体、单结构域抗体、单抗体可变结构域。

[0199] 在本发明上下文中,术语“抗体”用于描述天然的或者部分或全部改造的免疫球蛋白。因为抗体可通过多种方式进行修饰,所以“抗体”应理解为包括具有对成对分子的另一成员(即,如之前定义的靶分子)的所需结合特异性的结合结构域的任意特异性结合分子或物质。因此,该术语包括抗体的抗体片段、衍生物、功能性等价物和同系物,以及单链抗体、双功能抗体、二价抗体、VHH、纳米抗体、Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv、Fv、dAb、Fd、双抗体、三抗体和骆驼科抗体(camelid antibody),包括含有天然的或者全部或部分改造的免疫球蛋白结合结构域的任意多肽。因此,包含与另一种多肽融合的免疫球蛋白结合结构域或等价物的嵌合分子包括在内。术语还包括具有为抗体结合结构域或与抗体结合结构域同源之结合结构域的任意多肽或蛋白质,例如,抗体模拟物。抗体的实例是免疫球蛋白同种型及其同种型亚类,包括IgG(IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、IgG4)、IgA、IgD、IgM和IgE。本领域技术人员因此应理解,本发明还涉及包含抗原结合结构域的抗体片段,所述抗原结合结构域例如VHH、纳米抗体、Fab、scFv、Fv、dAb、Fd、双抗体(diabodies)和三抗体(triabodies)。在一个实施方案中,本发明涉及如本文所述的革兰氏阳性菌或重组核酸,其中一个外源基因编码抗体的轻链(V_L)或其功能性片段,并且另一个外源基因编码抗体的重链(V_H)或其功能性片段,更优选地其中功能性片段是Fab。在一个实施方案中,编码V_L或其功能性片段的外源基因与编码V_H或其功能性片段的外源基因的3'末端转录偶联。

[0200] 在一个实施方案中,如本文所述的抗体至少部分地或完全阻断、抑制或中和靶分子(例如,细胞因子或趋化因子)的生物活性。本文使用的表达“中和”意指如通过本领域已知(例如实施例中详细描述的方法)在体内或在体外测量的细胞因子生物活性抑制或减少。特别地,抑制或减少可通过确定结肠炎评分或通过确定组织或血液样品中的靶分子进行确定。本文使用的表达“中和”意指如在体内或在体外测量的细胞因子生物活性被抑制或减少至少10%或更多,优选至少20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%并且甚至更优选100%。

[0201] 优选地,所述结合分子与选自以下列表的细胞因子结合并抑制其生物效应:IL-1

β 、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-12 (或其亚基IL-12p35和IL12p40), IL-13、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、IL-21、IL-23 (或其亚基IL-23p19), IL-27、IL-32 (及其剪接变体), IFN(α 、 β 、 γ) 和TNF α 。优选地,所述结合分子是可溶性细胞因子受体例如Ig130,或者与所述细胞因子的受体结合例如IL-2R (CD25、CD122、CD132)、IL-12R (β 1、 β 2)、IL15R、IL-17R、IL-23R或IL-6R,而不引发炎症信号。优选地,所述结合分子中和选自以下列表的趋化因子:MIF、MIP-1 α 、MCP-1、RANTES和嗜酸性粒细胞趋化因子(Eotaxin)。优选地,所述结合分子通过与选自以下列表的共刺激分子结合解决了免疫激活的阻断:CD3/CD28、HVEM、B7.1/B7.2、CD40/CD40L (CD154)、ICOS/ICOSL、OX40/X40L、CD27/CD27L (CD70)、CD30/CD30L (CD153) 和41BB/41BBL。优选地,所述结合分子通过与来自列表I-CAM1、 α 4整合素和 α 4 β 7整合素的粘附分子结合解决了炎症的阻断。优选地,所述结合分子对CD3、CTLA4和/或PD1具有共刺激和激动作用。优选地,所述结合分子通过靶向CD25、CD20、CD52、CD95、BAFF、APRIL和/或IgE中和T细胞或B细胞活性。优选地,所述结合分子通过与来自MMP家族的酶结合解决了炎症的阻断。优选地,所述结合分子表现出抗血管生成作用,例如中和 α v β 3/ α 5 β 1和IL-8活性。在另一个优选实施方案中,所述结合分子能够中和TNF α 、IL-12、IFN γ 、IL-23或IL-17的生物作用。优选地,所述结合分子选自:

[0202] -抗TNF α 抗体、抗TNF α 抗体片段、抗TNF α 单抗体可变结构域、可溶性TNF受体或TNF α 的显性阴性变体;

[0203] -抗IL-12抗体、抗IL-12抗体片段、抗IL-12单抗体可变结构域、可溶性IL-12受体、IL-12的显性阴性变体或IL-12dAb;

[0204] -抗IL-12p35抗体、抗IL-12p35抗体片段、抗IL-12p35单抗体可变结构域、可溶性IL-12p35受体、IL-12p35的显性阴性变体或IL-12p35dAb;

[0205] -抗IL-12p40抗体、抗IL-12p40抗体片段、抗IL-12p40单抗体可变结构域、可溶性IL-12p40受体、IL-12p40的显性阴性变体或IL-12p40dAb;

[0206] -抗IL-23抗体、抗IL-23抗体片段、抗IL-23单抗体可变结构域、可溶性IL-23受体、IL-23的显性阴性变体或IL-23dAb;

[0207] -抗IL-23p19抗体、抗IL-23p19抗体片段、抗IL-23p19单抗体可变结构域、可溶性IL-23p19受体、IL-23p19的显性阴性变体或IL-23p19dAb;

[0208] -抗IFN γ 抗体、抗IFN γ 抗体片段、抗IFN γ 单抗体可变结构域、可溶性IFN γ 受体或IFN γ 的显性阴性变体;

[0209] -抗IL-17抗体、抗IL-17抗体片段、抗IL-17单抗体可变结构域、可溶性IL-17受体、IL-17的显性阴性变体或IL-17dAb;以及

[0210] -抗MCP-1抗体、抗MCP-1抗体片段、抗MCP-1单抗体可变结构域、可溶性IL-17受体、MCP-1的显性阴性变体或MCP-1dAb。

[0211] 在一个优选实施方案中,所述抗体是Fab片段(fragment antigen-binding,抗原结合的片段)。Fab片段在本领域是公知的。通过进一步的指导,Fab片段是抗体上与抗原结合的区域。其由每条重链和轻链的一个恒定结构域和一个可变结构域构成。

[0212] 在一个实施方案中,Fab是cA2抗TNF Fab (US 6,790,444中公开了其重链和轻链可变结构域的多核苷酸和多肽序列,分别是SEQ ID NO:4和5(重链)以及SEQ ID NO:2和3(轻链))或CDP870抗TNF Fab (WO01/94585中公开了其重链和轻链可变域的多核苷酸和多肽序

列,分别是SEQ ID NO:114和115(重链)以及SEQ ID NO:112和113(轻链))。

[0213] 技术人员应理解,因为抗体(同样对于功能性抗体片段并且特别是Fab片段)由可通过二硫桥共价连接的不同多肽构成。特别地,重链和轻链由独立的不同编码序列编码。

[0214] 因此,重链和轻链的编码区可各自包含在如本文所述的多顺反子表达单元中。编码重链和轻链的多核酸序列可整合在不同的多顺反子表达单元中。优选地,编码重链和轻链的多核酸序列整合在相同的多顺反子表达单元中。因此,在一个实施方案中,本发明涉及如本文所述的革兰氏阳性菌,其包含翻译或转录偶联的一个或更多个内源基因,编码抗体重链或其片段(优选其功能性片段)的一个或更多个多核酸序列,以及编码抗体轻链或其片段(优选其功能性片段)的一个或更多个多核酸序列。在另一个实施方案中,本发明涉及包含多顺反子表达单元的革兰氏阳性菌,其中所述多顺反子表达单元包含一个或更多个内源基因,编码抗体重链或其片段(优选其功能性片段)的一个或更多个多核酸序列,以及编码抗体轻链或其片段(优选其功能性片段)的一个或更多个多核酸序列。在又一个实施方案中,编码轻链的多核酸序列与编码重链的多核酸序列的3'末端转录或翻译偶联。有利地,这样的偶联进一步增加了重链和轻链二者的表达。

[0215] 本发明还涉及如本文所述的根据本发明之革兰氏阳性菌用于治疗的用途。本发明还涉及包含如本文所述的根据本发明之革兰氏阳性菌的药物组合物。

[0216] 因此,在一个方面中,本发明涉及如本文所述的根据本发明的革兰氏阳性菌或包含革兰氏阳性菌的药物组合物用作药物。在另一个方面中,本发明涉及如本文所述的根据本发明之革兰氏阳性菌或包含革兰氏阳性菌的药物组合物用于疗法或治疗。在又一个方面中,本发明涉及如本文所述的根据本发明之革兰氏阳性菌或包含革兰氏阳性菌的药物组合物用于制造药物的用途。在再一个方面中,本发明涉及治疗的方法,其包括施用如本文所述的根据本发明之革兰氏阳性菌或包含革兰氏阳性菌的药物组合物。在一个实施方案中,本发明涉及如本文所述的根据本发明之革兰氏阳性菌或包含革兰氏阳性菌的药物组合物,其中一个或更多个外源基因编码产物,如蛋白质、多肽或肽,所述产物在对象中具有治疗性或预防性作用,所述革兰氏阳性菌或药物组合物优选地用作药物,优选地用于将所述产物施用或递送至对象。

[0217] 在一个相关方面中,本发明提供了用于向有此需要的人或动物递送由本发明革兰氏阳性菌中所包含的一个或更多个外源基因、开放阅读框或编码序列编码的多肽的方法,其包括向所述人或动物施用治疗有效量的如本文所述的根据本发明之革兰氏阳性菌。动物可优选是哺乳动物,例如家养动物、农场动物、动物园动物、运动动物、宠物和实验动物,例如狗、猫、豚鼠、兔、大鼠、小鼠、马、牛、乳牛;灵长类动物,例如猿、猴子、猩猩(orang-utans)和黑猩猩;犬科动物,例如狗和狼;猫科动物,例如猫、狮子和老虎;马科动物,例如马、驴和斑马;食用动物,例如乳牛、猪和绵羊;有蹄动物,例如鹿和长颈鹿;啮齿动物,例如小鼠、大鼠、仓鼠和豚鼠;等等。

[0218] 本文使用的术语“治疗”是指治疗性治疗和防御性或预防性措施二者,其中目的是预防或减慢(减少)不期望的生理变化或疾病。“需要治疗的人或动物”包括将得益于给定病症的治疗的人或动物。

[0219] 术语“治疗有效量”是指治疗性物质或组合物对于在对象(例如,人或动物)中治疗疾病或病症有效(即,得到期望的局部或全身作用和表现)的量。通过举例,治疗有效量的细

菌可在例如单剂量或重复剂量中包含至少1个细菌、或至少10个细菌、或至少 10^2 个细菌、或至少 10^3 个细菌、或至少 10^4 个细菌、或至少 10^5 个细菌、或至少 10^6 个细菌、或至少 10^7 个细菌、或至少 10^8 个细菌、或至少 10^9 个、或至少 10^{10} 个、或至少 10^{11} 个、或至少 10^{12} 个、或至少 10^{13} 个、或至少 10^{14} 个、或至少 10^{15} 个或者更多个革兰氏阳性菌。

[0220] 本发明的革兰氏阳性菌可单独施用或者与一种或更多种活性化合物组合施用。活性化合物可在施用革兰氏阳性菌之前、之后或与其同时施用。

[0221] 存在许多关于递送抗原和/或治疗活性多肽的现有技术公开,并且应理解,这些公开可用本发明革兰氏阳性菌进行进一步有利的修饰。通过举例而非限制,细菌递送白细胞介素特别是IL-10以治疗结肠炎(例如,WO 00/23471)、IL-27以调节炎性应答(WO 2004/069177);递送抗原作为疫苗(例如,WO 97/14806);递送GLP-2和相关类似物可用于治疗短肠病、克罗恩病、骨质疏松症,并且在癌症化疗等期间用作辅助治疗。此外,细菌递送三叶肽可用于治疗消化道的疾病(例如,WO 01/02570)。特别地,WO 97/38712和WO 92/14837中描述了三叶蛋白或肽用于治疗消化道(包括嘴、食道、胃以及大肠和小肠)的疾病和损伤的用途,以及用于保护和治疗位于消化道外侧的组织的用途。这些蛋白质可用于治疗这些区域中的病变或者抑制病变形成。这些病变可由以下原因造成:癌症治疗的放射治疗或化学治疗,损害消化道的任何其他药物(包括醇),偶然暴露于辐射或腐蚀性物质,感染,消化失调包括但不限于口腔粘膜炎症、肠黏膜炎、食管炎、直肠炎、非溃疡性消化不良、胃炎、胃或十二指肠溃疡,胃癌,结肠癌,MALT淋巴瘤,Menetier综合症,胃食管反流病,克罗恩病,溃疡性结肠炎和化学、细菌或模糊来源的急性结肠炎。三叶肽可特别的用于治疗急性结肠炎、口腔粘膜炎症、肠黏膜炎、食管炎、直肠炎。使用本发明的启动子和宿主细胞设想了另外的治疗应用。

[0222] 人或动物中可通过递送根据本发明之治疗性多肽治疗的疾病类型的另一些非限制性实例包括但不限于,例如,炎性肠病,包括克罗恩病和溃疡性结肠炎(可用例如IL-1ra、IL-10、IL-27或三叶肽治疗);自身免疫病,包括但不限于银屑病、类风湿性关节炎、红斑狼疮(可用例如IL-1ra、IL-27、IL-10或相关自身抗原治疗);变应性疾病,包括但不限于哮喘、食物过敏(可用相关变应原治疗);乳糜泻(可用麸质变应原治疗);神经障碍,包括但不限于阿尔兹海默病、帕金森病和肌萎缩性侧索硬化症(可用例如脑源性神经营养因子和睫状神经营养因子治疗);癌症(可用例如IL-1、集落刺激因子或干扰素 γ 治疗);骨质疏松症(可用例如转化生长因子 β 3治疗);糖尿病(可用例如胰岛素治疗);心血管疾病(可用例如组织纤溶酶原激活物治疗);动脉粥样硬化(可用例如细胞因子和细胞因子拮抗剂治疗);血友病(可用例如凝血因子治疗);退行性肝病(可用例如肝细胞生长因子或干扰素 α 治疗);肺病如囊性纤维化(可用例如 α 抗胰蛋白酶治疗);肥胖症;病原体感染例如病毒或细菌感染(可用任意数目的上述组合物或抗原治疗)等等。

[0223] 根据本发明的革兰氏阳性菌也可用于治疗传染病。在一个实施方案中,可得到由根据本发明之革兰氏阳性菌局部产生并分泌的毒素中和抗体针对梭菌(*Clostridium*)相关疾病,优选艰难梭菌(*Clostridium difficile*)相关疾病(CDAD)的被动免疫接种。优选地,所述革兰氏阳性菌是乳球菌物种,更优选乳酸乳球菌或其亚种或菌株。

[0224] CDAD由两种外毒素介导:毒素A(肠毒素;参见例如对于DNA序列Genbank NC_009089.1,区域:795843..803975或者对于蛋白质序列为YP_001087137.1)和毒素B(细胞毒素;参见例如对于DNA序列Genbank NC_009089.1,区域787393..794493或者对于蛋白质序列

为YP_001087135.1)。两种毒素是与肠上皮细胞表面结合的高分子量蛋白质,其中它们被内化并催化胞质rho蛋白的葡糖基化,导致细胞死亡、炎症和腹泻。它们还与促进艰难梭菌毒力、定殖以及中性粒细胞趋化性和激活有关。细菌自身是非侵入性的并且不造成组织损伤。通过用抗体中和艰难梭菌毒素,阻断了病原体的致病机制,可减小其在内脏中繁殖的能力,并且可使对微生物生态的影响最小化,允许恢复正常的微生物群落。该途径的医学优点可包括更快速的恢复、更少的复发和减缓正常肠道菌群中抗生素耐性的选择压力。

[0225] 因此,在一个实施方案中,本发明涉及如本文所述的革兰氏阳性菌,其中多顺反子表达单元包含针对梭菌毒素A和/或毒素B的如本文其他地方所述的抗体或其片段,优选Fab。最优选地,所述抗体或其片段是中和抗体。在另一个实施方案中,本发明涉及包含多顺反子表达单元(优选地整合在细菌染色体中)的革兰氏阳性菌,优选乳球菌物种(例如乳酸乳球菌)或肠球菌物种(例如粪肠球菌或屎肠球菌),所述多顺反子表达单元包含内源基因和一个或多个外源基因,所述内源基因优选选自eno、usp45、gap、pyk、rpmB和rplS,优选地来源于乳球菌物种或肠球菌物种;所述外源基因编码对抗梭菌(优选艰难梭菌)的毒素A和/或毒素B的中和抗体或抗体片段(优选Fab),所述多顺反子表达单元优选地染色体整合在所述内源基因的天然基因座处,并且所述毒素A和/或毒素B抗体(片段)基因优选地与所述内源基因3'末端转录偶联,所述转录偶联优选地通过基因间区域实现,所述基因间区域优选选自在革兰氏阳性菌(优选乳球菌物种或肠球菌物种)的rplW、rplP、rpmD、rplB、rpsG、rpsE、rplN、rplM、rplE和rplF前面的基因间区域。如本文所述的梭菌毒素A和毒素B抗体在本领域中是已知的(参见,例如,Leung等,J Pediatr 1991;118(4Pt 1):633-637;Wilcox.J Antimicrob Chemother 2004;53(5):882-884;Sougioultzis等,Gastroenterology 2005;128(3):764-770;Kyne等,N Engl J Med 2000;342(6):390-397;Lowy等,N Engl J Med;362(3):197-205)。两种抗体或其片段可位于相同或不同革兰氏阳性菌的不同多顺反子表达单元上,但是优选地位于单个多顺反子表达单元上。本发明还涉及用于预防和/或治疗CDAD的方法,其包括施用这样的革兰氏阳性菌。

[0226] 本领域读者应理解,本文具体叙述的疾病仅是示例性的并且其叙述决不旨在以任何方式将本发明提供的试剂(例如本发明的启动子、核酸、载体和宿主细胞)限制用于这些具体的疾病。相反地,本领域读者应理解,本发明的试剂原则上可用于表达任何目的的表达产物,优选多肽,其不仅在所叙述疾病中而且在人和动物的多种其他疾病或病症中可以是治疗相关的。因此,一旦对于给定病痛选择或确定了合适的表达产物,优选多肽,例如抗原、抗体(片段)和/或非致疫苗作用的治疗活性多肽,技术人员就能够使用本发明的试剂实现其表达、分离和/或递送。

[0227] 本发明还考虑了其他动物(包括狗、马、猫和鸟)中疾病的治疗。狗的疾病包括但不限于犬瘟病(副粘病毒)、犬型肝炎(腺病毒Cav-1)、犬窝咳或喉气管炎(腺病毒Cav-2)、传染性犬性肠炎(冠状病毒)和出血性肠炎(细小病毒)。

[0228] 猫的疾病包括但不限于病毒性鼻气管炎(疱疹病毒)、猫杯状病毒疾病(杯状病毒)、猫传染性腹膜炎(细小病毒)和猫白血病(猫白血病病毒)。也考虑了可使用本发明方法和组合物治疗的马和鸟的另一些病毒性疾病。为此目的,特别优选使用表达重组干扰素的微生物。

[0229] 本文使用的药物组合物优选地包含治疗有效量的本发明革兰氏阳性菌以及可药

用载体,即,一种或更多种可药用载体物质和/或添加剂,例如,缓冲剂、载体、赋形剂、稳定剂等。

[0230] 本文使用的术语“可药用”与本领域是一致的,意指与药物组合物的其他成分相容并且对其接受者无害。

[0231] 可将本发明的革兰氏阳性菌悬于药物制剂中用以施用于患待治疗疾病的人或动物。这样的药物制剂包括但不限于活的革兰氏阳性菌和适合于施用的介质。可在常见赋形剂存在下冻干革兰氏阳性菌,所述赋形剂例如乳糖、其他糖、碱金属和/或碱土金属硬脂酸盐、碳酸盐和/或硫酸盐(例如,硬脂酸镁、碳酸钠和硫酸钠)、高岭土、硅土、调味剂和芳香剂。如此冻干的革兰氏阳性菌可制备成胶囊、片剂、颗粒剂和粉末剂(例如,口腔清洗粉末)的形式,其每一种都可通过口服路径施用。或者,可将一些革兰氏阳性菌制备为合适介质中的水性悬液,或者冻干细菌可在临使用前悬于合适介质中,这样的介质包括本文提及的赋形剂和其他赋形剂,例如葡萄糖、甘氨酸和糖精钠。

[0232] 对于口服施用,可配制胃抵抗性(gastroresistant)口服剂型,所述剂型也可包含提供革兰氏阳性菌控制释放并从而提供其中所编码之期望蛋白质控制释放的化合物。例如,口服剂型(包括胶囊、片剂、丸剂、颗粒剂、粉末剂)可包被有赋形剂(通常是聚合物、纤维素衍生物和/或亲脂材料)的薄层,所述薄层抵抗胃中的溶解或破坏,而不抵抗肠中的溶解或破坏,从而允许运输通过胃,有利于在肠中分解、溶解和吸收。

[0233] 口服剂型可设计成允许缓慢释放革兰氏阳性菌和产生的外源蛋白质,例如设计为控制释放、持续释放、延长释放、持续作用的片剂或胶囊剂。这些剂型通常包含常规的并且公知的赋形剂,例如亲脂赋形剂、聚合物赋形剂、纤维素赋形剂、不溶性赋形剂、可膨胀赋形剂。控制释放制剂也可用于任何其他的递送位点,包括肠递送、结肠递送、生物粘附递送或舌下递送(即,牙粘膜递送)和支气管递送。当本发明组合物经直肠或经阴道施用时,药物组合物可包括软膏、栓剂和乳膏。在这种情况下,将革兰氏阳性菌悬于常见赋形剂(还包括脂质)的混合物中。每一种上述制剂在本领域中是公知的,并且例如在以下参考文献中进行了描述:Hansel等,Pharmaceutical dosage forms and drug delivery systems,第5版,William and Wilkins,1990;Chien1992,Novel drug delivery system,第2版,M.Dekker;Prescott等(1989,Novel drug delivery,J.Wiley&Sons);Cazzaniga等,(1994,Oral delayed release system for colonic specific delivery,Int.J.Pharm.108:7)。

[0234] 优选地,灌肠剂制剂可用于直肠施用。术语“灌肠剂”用于包括用于直肠施用的液体制备物。灌肠剂可通常以单剂量容器供应并且包含溶解或分散于水、甘油或聚乙二醇或其他合适溶剂中的一种或更多种活性物质。

[0235] 因此,根据本发明,在一个优选实施方案中,通过粘膜,例如口服、鼻、直肠、阴道或支气管路径,通过适用于具体路径的现有技术水平制剂的任意一种可将如本文所述的编码期望外源基因的根据本发明之革兰氏阳性菌施用于动物或人。用于施用的革兰氏阳性菌的剂量将根据任意多种因素而不同,所述因素包括细菌类型和由其编码的基因、待治疗疾病的类型和严重程度以及待使用的施用路径。

[0236] 因此,对于本发明的各个和每个实施方案不能限定精确剂量,但是根据本发明对于本领域技术人员将是非常显而易见的。无论如何,可基于具体问题具体分析的方式,通过使用公知方法例如已知的那些方法如ELISA或Biacore(参见实施例)测量施用预定数目细

胞之后重组蛋白的血清浓度水平来确定剂量。递送重组蛋白之动力学特征和半衰期的分析提供了允许确定转化宿主细胞的有效剂量范围的足够信息。

[0237] 在一个实施方案中,当如本文所述的根据本发明之革兰氏阳性菌表达抗原时,则本发明也可提供疫苗。

[0238] 术语“疫苗”为当以有效量施用于动物或人对象时能够对包含在疫苗中的免疫原诱导抗体和/或在对象中引起保护性免疫的可药用组合物。

[0239] 本发明疫苗包含如本文所述的根据本发明之革兰氏阳性菌和另外任选的赋形剂。这样的疫苗还可包含佐剂,即增强对抗原的免疫应答的化合物或组合物。佐剂包括但不限于完全弗氏佐剂、不完全弗氏佐剂、皂素、矿物胶如氢氧化铝、表面活性物质如溶血卵磷脂、pluronic多元醇、多阴离子、肽、油或烃乳剂以及可能有用的可药用人佐剂,例如BCG(卡介苗,bacille Calmette-Guerin)和短小棒状杆菌(*Corynebacterium parvum*)。

[0240] 因此根据本发明提供的内容显而易见的是,提供了在诊断、预测、预后和/或监测受损骨折愈合中非常有利的生物标志物、用途和方法。虽然结合其具体实施方案描述了本发明,但是明显的是,根据以上描述许多改变、修饰和变化对于本领域技术人员是显而易见的。因此,所附权利要求书的精神和范围中旨在涵盖如下所有的这种改变、修饰和变化。

[0241] 通过以下非限制性实施例进一步支持本发明的方面和实施方案。

实施例

[0242] 实施例1:从乳酸乳球菌基因组中选择基因间区域

[0243] 如图1所示,在进行考马斯亮蓝染色的蛋白质凝胶上观察乳酸乳球菌乳脂亚种菌株MG1363的对数期结束培养物的细胞蛋白质。泳道A和B分别包含29 μ g和58 μ g MG1363蛋白质。从凝胶中分离泳道A中的12个确定的蛋白质带。分离蛋白质并通过以下方法鉴定基因间区域:

[0244] 1) 通过部分肽测序(MALDI-TOF/TOF)和使用组合的肽质量和序列信息的数据库检索鉴定片段中丰富表达的蛋白质,

[0245] 2) 使用乳酸乳球菌乳脂亚种菌株MG1363的染色体序列(Wegmann等)鉴定编码丰富表达之蛋白质(1)的基因,所述基因存在于操纵子中但不是“第一基因”,

[0246] 3) 鉴定在这些丰富表达的基因前面的基因间区域。

[0247] 因此表3列出了经鉴定的基因间区域。下划线序列表示核糖体结合位点。

[0248] 表3

[0249]

基因间区域	第二基因	功能第二基因
TAATG (SEQ ID NO: 1)	rplW	50 S 核糖体蛋白质 L23
TAATCCATG (SEQ ID NO: 2)	rplP	50 S 核糖体蛋白质 L16
TAAGGAGGAAAAAATG (SEQ ID NO: 3)	rpmD	50 S 核糖体蛋白质 L30
TAATAGAGGAGGAAAATCGTG (SEQ ID NO: 4)	rplB	50 S 核糖体蛋白质 L2
TAAGAAGGGAGATAAGTAAGAATG (SEQ ID NO: 5)	rpsG	30 S 核糖体蛋白质 S7
TAAGGAAAGGGGTAATTAAACATG (SEQ ID NO: 6)	rpsE	30 S 核糖体蛋白质 S5
TAAGCAAACTAGGAGGAATATAGCATG (SEQ ID NO: 7)	rplN	50 S 核糖体蛋白质 L14

[0250] 实施例2:选择用于双顺反子表达的位点

[0251] 表4列出了实施例1中鉴定为驱动高水平表达的靶启动子。这些启动子可用于作用于多顺反子表达外源基因的靶位点。

[0252] 表4

带	MG1363 中所注释的基因	名称
1	DNA 指导的 RNA 聚合酶, β' 亚基/160 kD 亚基	<i>rpoC</i>
	DNA 指导的 RNA 聚合酶, β 亚基/140 kD 亚基	<i>rpoB</i>
	非血铁结合铁蛋白	<i>dpsA</i>
2	丙酮酸激酶	<i>pyk</i>
	谷氨酰基 tRNA 合成酶	<i>gltX</i>
3	磷酸丙酮酸水合酶	<i>eno</i>
	谷氨酰胺合成酶	<i>glnA</i>
	谷氨酰胺合成酶阻遏物	<i>glnR</i>
	二肽酶 PepV	<i>pepV</i>
	F0F1 型 ATP 合酶 β 亚基 (ATP 合酶 F1 β 亚基)	<i>atpD</i>
	F0F1 型 ATP 合酶 α 亚基	<i>atpA</i>

[0253]

[0254]

4	多糖结合转运 ATP 结合蛋白	<i>msmK</i>
	乙偶姻脱氢酶复合物 E1 组分 α 亚基 (<i>acoA</i>)	<i>pdhA</i>
	细胞分裂蛋白	<i>ftsA</i>
	UDP-吡喃半乳糖变位酶	<i>glfI</i>
	3-磷酸甘油酸激酶	<i>pgk</i>
	甘油醛-3-磷酸脱氢酶	<i>gapB</i>
	乙酸激酶	<i>ackA1</i>
	3-氧酰基-(酰基-载体-蛋白)合酶 II	<i>fabF</i>
5	3-酮酰基-(酰基-载体-蛋白)还原酶	<i>fabG</i>
	DNA 指导的 RNA 聚合酶, α 亚基/40 kD 亚基	<i>rpoA</i>
	脯氨酸二肽酶	<i>pepQ</i>
	谷氨酰基氨基肽酶	<i>pepA</i>
	预测的脱氢酶相关蛋白	<i>llmg_0272</i>
6	30S 核糖体蛋白质 S2	<i>rpsB</i>
	50S 核糖体蛋白质 L4 (<i>rplD</i>)	<i>rplD</i>
	50S 核糖体蛋白质 L23	<i>rplW</i>
	50S 核糖体蛋白质 L2	<i>rplB</i>
	苯丙氨酰基 tRNA 合成酶 β 链	<i>pheT</i>
	果糖-二磷酸醛缩酶	<i>fbaA</i>
7	30S 核糖体蛋白质 S4	<i>rpsD</i>
	翻译起始因子 3 (IF-3)	<i>infC</i>
	转录延伸因子 GreA	<i>greA</i>
	ATP 依赖性 Clp 蛋白酶的蛋白酶亚基	<i>clpP</i>
	超氧化物歧化酶	<i>sodA</i>
8	30S 核糖体蛋白质 S12	<i>rpsL</i>
	30S 核糖体蛋白质 S7	<i>rpsG</i>

[0255]		50S 核糖体蛋白质 L18	<i>rplR</i>
		30S 核糖体蛋白质 S5	<i>rpsE</i>
		50S 核糖体蛋白质 L30/L7E	<i>rpmD</i>
		S-核糖基高半胱氨酸酶	<i>luxS</i>
		50S 核糖体蛋白质 L15	<i>rplO</i>
		50S 核糖体蛋白质 L11	<i>rplK</i>
	9	30S 核糖体蛋白质 S8	<i>rpsH</i>
		50S 核糖体蛋白质 L21	<i>rplU</i>
		30S 核糖体蛋白质 S13	<i>rpsM</i>
		30S 核糖体蛋白质 S19 (<i>rpsS</i>)	<i>rpsS</i>
		核糖体蛋白质 L22 (<i>rplV</i>)	<i>rplV</i>
		核糖体蛋白质 L16 (<i>rplP</i>)	<i>rplP</i>
		核糖体蛋白质 L14 (<i>rplN</i>)	<i>rplN</i>
		30S 核糖体蛋白质 L19	<i>rplS</i>
		30S 核糖体蛋白质 S11	<i>rpsK</i>
	10	30S 核糖体蛋白质 S10	<i>rpsJ</i>
		共伴侣蛋白 GroES	<i>groES</i>
		50S 核糖体蛋白质 L24	<i>rplX</i>
		50S 核糖体蛋白质 L10	<i>rplJ</i>
		50S 核糖体蛋白质 L7/L12	<i>rplL</i>
	11	HU 样 DNA 结合蛋白	<i>hflA</i>
		50S 核糖体蛋白质 L28	<i>rpmB</i>
		磷酸转移酶系统 IIB 组分	<i>ptcB</i>

[0256] 将来自大肠杆菌的β-葡萄糖醛酸酶(*uidA*)基因作为报道基因引入到乳酸乳球菌MG1363中。*uidA*基因产物β-葡萄糖醛酸酶催化可商购的作为组织化学和光谱光度测量底物的多种β-葡糖苷酸的切割。菌株sAGX0090在*thyA*基因座处具有Ph11A>>*uidA*表达盒(图2)。该启动子也用于菌株sAGX0037和SAGX0085。

[0257] 如图2所描绘的,通过将*uidA*在几种内源基因(基因X)的3'末端插入乳酸乳球菌MG1363染色体中制备了双顺反子构建体。以此方式将*rpmD*用作表4的目的内源基因与*uidA*

之间的基因间序列,以鉴定与sAGX0090相比导致更高的 β -葡萄糖醛酸酶(GUS)活性的位点。

[0258] 在需要时补加有胸苷的GM17中在30℃使乳酸乳球菌培养物生长16小时。清洗1ml培养物的细胞并将其重悬于1ml去离子水中。用MP Biomedicals裂解基质B和Fasprep-24装置以6m/s破坏细胞40秒。将管离心并制备系列稀释的细胞上清液。通过添加对硝基苯基底物和 β -巯基乙醇得到在 β -葡萄糖醛酸酶存在下为黄色的溶液来测量GUS活性。在405nm下测量GUS活性并且相对于参照菌株sAGX0090进行表示。平行处理所有的菌株。

[0259] 图3示出了基因X>>rpmD>>uidA双顺反子构建体的相对GUS活性。GUS活性相对于携带有Ph11A>>uidA表达盒的参照菌株sAGX0090进行表示并且示于Y轴上。发现所有双顺反子菌株中的GUS活性高于参照菌株。特别地,发现当与sAGX0090相比时,sAGX0168(enoA>>rpmD>>uidA)和sAGX0222(gapB>>rpmD>>uidA)中的GUS活性分别为6.89倍和20.99倍。

[0260] 这些结果清楚地确定了双顺反子表达允许在多种设定中增强蛋白质表达水平。

[0261] 实施例3:人胰岛素原的双顺反子表达

[0262] 将usp45分泌前导物(SS)与人胰岛素原(ins)融合以得到胰岛素原的分泌(SS::ins)。将[SS::ins]表达盒在thyA基因座处整合在乳酸乳球菌MG1363染色体中并且直接由PthyA(sAGX0121)表达,或者与在SS::ins前面的rpmD基因间区域一起作为第二顺反子插入usp45(sAGX0121)或enoA(sAGX0164)下游(图4a)。通过ELISA定量胰岛素分泌能力以评价与thyA基因座处PthyA驱动表达相比货物的双顺反子表达。

[0263] 构建Ph11A>>SS::Ins整合质粒的尝试失败了。

[0264] 将菌株由单一菌落接种到在需要时补加有200 μ M胸苷的2ml GM17中并使其在30℃下生长16小时。为了定量胰岛素原分泌,将这些饱和过夜的培养物稀释1/25在5ml新鲜GM17培养基中并使其在30℃下生长4小时。通过以3220 $\times$ g离心10分钟收集细胞,将其重悬于等量的BAM9培养基中并在30℃下培养另外的3小时。BAM9包含M9盐、0.5%安平、0.5%葡萄糖、25mM NaHCO₃、25mM Na₂CO₃、2mM MgSO₄、0.1mM CaCl₂和200 μ M胸苷。通过以3220 $\times$ g离心10分钟分离细胞和培养物上清液。通过MercoDIA提供的ELISA定量培养物上清液中分泌的人胰岛素原的量。平行处理所有的菌株。

[0265] 图4b示出了通过乳酸乳球菌菌株sAGX0122、sAGX0121和sAGX0164的人胰岛素原分泌的定量,分泌的胰岛素原的量表示为ng/ml并且示于Y轴上。该图清楚地证实了,包含双顺反子表达盒的菌株具有比参照菌株显著更高的货物表达。特别地,当SS::ins通过rpmD与enoA偶联时胰岛素分泌最高。

[0266] 实施例4:cA2Fab的双顺反子表达

[0267] 用cA2抗hTNF Fab的重链和轻链生成双顺反子表达构建体。所有的表达单元由thyA启动子驱动并且位于质粒上。所有的表达单元都携带来源于cA2英夫利昔单抗的轻链的基因VLCL(L)和重链之Fab片段VHCH1(H)。L>>H和H>>L构造通过在rpmD、rplB、rpsG、rpsE或rplN前面的基因间区域偶联。所有的构建体都是基于质粒的。

[0268] 图5揭示了通过双顺反子构建体高度表达了重链和轻链二者,导致了高水平的功能性cA2抗hTNF Fab。图5还揭示了当重链定位在轻链之前时,cA2抗hTNF Fab表达增加而无论基因间区域为何。

[0269] 为了定量抗hTNF分泌,将菌株由单一菌落接种到2ml GM17中并使其在30℃下生长

16小时。将这些饱和和过夜的培养物稀释1/25在5ml新鲜GM17培养基中并使其在30℃下生长4小时。通过以3220×g离心10分钟收集细胞,将其重悬于等量的BAM9培养基中并在30℃下培养另外的3小时。BAM9包含M9盐、0.5%安平、0.5%葡萄糖、25mM NaHCO₃、25mM Na₂CO₃、2mM MgSO₄、0.1mM CaCl₂和200μM胸苷。通过以3220×g离心10分钟分离细胞和培养物上清液。平行制备来自携带有各构建体的菌株的粗制上清液并且在抗TNF活性存在下进行测定。这使用人TNF作为捕获蛋白通过直接ELISA来完成。通过兔抗人IgG抗血清检测VLCL部分并通过与碱性磷酸酶缀合的抗兔抗血清来证明。通过比色测定和OD402的读数测量磷酸酶活性。平行处理所有的菌株。

[0270] 实施例5:CDP870的双顺反子表达

[0271] 用CDP870抗TNF Fab的重链和轻链生成双顺反子表达构建体。所有的表达单元都位于细菌染色体上。

[0272] 图6a:将与usp45分泌前导物编码序列融合的CDP870轻链和重链Fab(SS::CDP870VLCL和SS::CDP870VHCH1)作为第二和第三顺反子插入usp45的下游(sAGX0219、sAGX0220)。在sAGX0219和sAGX0220中,rpmD用于偶联SS::CD870基因与usp45。为了避免遗传不稳定,轻链与重链基因通过在rp1N前面的基因间区域偶联。在sAGX0219中,轻链基因在重链基因之前,而在sAGX0220中,重链基因在轻链基因之前。

[0273] 为了定量抗hTNF分泌,将菌株由单一菌落接种到2ml GM17中并使其在30℃下生长16小时。将这些饱和和过夜的培养物稀释1/25在5ml新鲜GM17培养基中并使其在30℃下生长4小时。通过以3220×g离心10分钟收集细胞,将其重悬于等量的BAM9培养基中并在30℃下培养另外的3小时。BAM9包含M9盐、0.5%安平、0.5%葡萄糖、25mM NaHCO₃、25mM Na₂CO₃、2mM MgSO₄、0.1mM CaCl₂和200μM胸苷。通过以3220×g离心10分钟分离细胞和培养物上清液。平行制备来自携带有各构建体的菌株的粗制上清液并且在抗TNF活性存在下进行测定。这使用人TNF作为捕获蛋白并且将英夫利昔单抗用作参照标准通过直接ELISA来完成。通过兔抗人IgG抗血清检测VLCL部分并通过与碱性磷酸酶缀合的抗兔抗血清来证明。通过比色测定和OD402的读数测量磷酸酶活性。平行处理所有的菌株。

[0274] 图6b揭示了双重顺反子构建体高度表达了重链和轻链二者,导致了高水平的功能性CDP870抗TNF Fab。图6b还揭示当重链定位在轻链之前时,CDP870抗TNF表达大幅度增加。

[0275] 实施例6:人三叶因子1(hTFF1)的双顺反子表达

[0276] 通过与hTFF1融合的usp45分泌前导物编码序列(SS::hTFF1)生成表达构建体。所有的表达单元都位于细菌染色体上。不可能使用比Ph11A更强的启动子构建整合质粒用于单顺反子hTFF1表达。

[0277] 图7a:将usp45分泌前导物编码序列(SS)与hTFF1融合以得到hTFF1的分泌(SS::hTFF1)。SS::hTFF1表达盒在thyA基因座处整合在乳酸乳球菌MG1363染色体中,并且直接由Ph11A表达(sAGX0085),或者与在SS::hTFF1前面的rpmD基因间区域一起作为第二顺反子插入gapB下游(sAGX0276)。

[0278] 图7b:通过ELISA定量hTFF1分泌能力以评价与thyA基因座处Ph11A驱动表达相比货物的双顺反子表达。

[0279] 为了定量hTFF1分泌,将菌株由单一菌落接种到2ml GM17中并使其在30℃下生长16小时。将这些饱和和过夜的培养物稀释1/25在5ml新鲜GM17培养基中并使其在30℃下生长4

小时。通过以 $3220 \times g$ 离心10分钟收集细胞,将其重悬于等量的BAM9培养基中并在 30°C 下培养另外的3小时。BAM9包含M9盐、0.5%安平、0.5%葡萄糖、25mM NaHCO_3 、25mM Na_2CO_3 、2mM MgSO_4 、0.1mM CaCl_2 和200pM胸苷。在该阶段,测定所有培养物的菌落形成单位(CFU)。通过以 $3220 \times g$ 离心10分钟分离细胞和培养物上清液。平行制备来自携带有各构建体的菌株的粗制上清液,并且使用纯化的hTFF1作为参照标准通过直接ELISA进行。分泌的hTFF1的量表示为ng/ml和ng/ 10^9 CFU。平行处理所有的菌株。

[0280] 图7b清楚地证实了包含双顺反子表达盒的菌株(sAGX0276)具有显著高于参照菌株(sAGX0085)的货物表达。当hTFF1通过rpmD与gapB偶联时,分泌的hTFF1表达的量大幅度增加(>5倍/ml; >12倍/CPU)。

[0281] 实施例7:从尿肠球菌基因组中选择基因间区域

[0282] 如图8所示,在进行考马斯亮蓝染色的蛋白质凝胶上观察尿肠球菌菌株LMG 15709(尿肠球菌[Orla-Jensen 1919] Schleifer and Kilpper-Balz 1984VP; LMG 15709; ATCC 6057; DSM 2146; NCIMB 8842)的对数期结束培养物的细胞蛋白质。泳道A、B和C分别包含等价于284 μL 、142 μL 和56.8 μL 尿肠球菌LMG 15709对数期结束培养物的裂解细胞的细胞蛋白质。从凝胶中分离泳道C中的12个确定的蛋白质带。分离蛋白质并通过以下方法鉴定基因间区域:

[0283] 1) 通过部分肽测序(MALDI-TOF/TOF)和使用组合的肽质量和序列信息的数据库检索鉴定片段中丰富表达的蛋白质

[0284] 2) 使用尿肠球菌PC4.1的染色体序列(由NCBI基因组数据库中获取,GenBank登录号ADMM01000000)鉴定编码丰富表达之蛋白质(1)的基因,所述基因存在于操纵子中但不是“第一基因”

[0285] 3) 鉴定在这些丰富表达的基因前面的基因间区域(表5)。

[0286] 表5列出了尿肠球菌LMG15709中经鉴定的基因间区域。下划线序列表示核糖体结合位点。

[0287] 表5

[0288]

基因间区域	第二基因	功能第二基因
TAATC (SEQ ID NO: 8)	<i>rplP</i>	50S 核糖体蛋白质 L16
TAAGGAGGACAACAATA (SEQ ID NO: 9)	<i>rpmD</i>	50S 核糖体蛋白质 L30
TAATAGGAGGGAATTTCA (SEQ ID NO: 10)	<i>rplM</i>	50S 核糖体蛋白质 L13
TTAGAAGAAGGAGGAATACCATTG (SEQ ID NO: 11)	<i>rpsE</i>	30S 核糖体蛋白质 S5
TAAAGTTTAAGGAAGGAGGGTCTTACTGA (SEQ ID NO: 12)	<i>rplE</i>	50S 核糖体蛋白质 L5
TAATCAAGTAGAATCTACAAGGAGGTGTCTTTAA (SEQ ID NO: 13)	<i>rplF</i>	50S 核糖体蛋白质 L6

[0289] 实施例8:在尿肠球菌基因组中选择用于双顺反子表达的位点

[0290] 表6列出了实施例7中鉴定为驱动高水平表达的高度表达屎肠球菌基因。驱动这些基因的启动子可用作用于多顺反子表达外源基因的靶位点。这些内源基因还可用作多顺反子表达模块中的第一基因,通过基因间区域与下游外源基因转录或翻译偶联。

[0291] 表6

[0292]

带	基因注解	名称
1	烯醇酶[屎肠球菌 DO]; gi 69249235	<i>eno</i>
	延伸因子 Tu[屎肠球菌 TX13330]; gi 227550718	<i>tuf</i>
2	甘油醛-3-磷酸脱氢酶[屎肠球菌 TX1330]; gi 227552066	<i>gap</i>
3	L-乳酸脱氢酶[屎肠球菌 DO]; gi 69245441	<i>ldh</i>
	天冬氨酸氨甲酰转移酶[屎肠球菌 DO]; gi 69247601	<i>phyB</i>

[0293]

	核糖-磷酸焦磷酸激酶[屎肠球菌 DO]; gi 69245416	
4	丙酮酸激酶[屎肠球菌 DO]; gi 69247355 寡聚内肽酶 F[屎肠球菌 E1039]; gi 293553061 天冬酰基 tRNA 合成酶细菌/线粒体型[屎肠球菌 DO]; gi 69247937	<i>pyk</i> <i>pepF</i> <i>aspS</i>
5	赖酰基 tRNA 合成酶 [屎肠球菌 TX1330]; gi 227552660 GroEL[屎肠球菌]; gi 35187728	<i>lysS</i> <i>groEL</i>
6	磷酸甘油酸激酶[屎肠球菌 E1039]; gi 293557157	<i>pgk</i>
7	II 类果糖-二磷酸醛缩酶[屎肠球菌 1,230,933]; gi 293557157 2,3-二磷酸甘油酸依赖性磷酸甘油酸变位酶[屎肠球菌 E1039]; gi 293556592 Saicar 合成酶[屎肠球菌 1,141,733]; gi 257887626	 <i>purC</i>
8	2,3-二磷酸甘油酸依赖性磷酸甘油酸变位酶[屎肠球菌 E1039]; gi 293556592 Saicar 合成酶[屎肠球菌 1,231,501]; gi 257884790	 <i>purC</i>
9	50S 核糖体蛋白质 L5[屎肠球菌 DO]; gi 69247181 50S 核糖体蛋白质 L6[屎肠球菌 DO]; gi 69247184 过氧化物酶[屎肠球菌 TX1330]; gi 227551517 黄嘌呤磷酸核糖转移酶[屎肠球菌 1,230,933]; gi 257878081	<i>rplE</i> <i>rplF</i> <i>aphC</i>
10	延伸因子 G[屎肠球菌 TX1330]; gi 227550717	<i>fusA</i>
11	细菌和细胞器形式的 30S 核糖体蛋白质 S5[屎肠球菌 DO]; gi 69247186 50S 核糖体蛋白质 L16[屎肠球菌]; gi 9931590 广泛应激蛋白家族[屎肠球菌 E980]; gi 293571359 铁蛋白[屎肠球菌 1,230,933]; gi 257880413 30S 核糖体蛋白质 S7[屎肠球菌 TX1330]; gi 227550716 50S 核糖体蛋白质 L13[屎肠球菌 1,230,933]; gi 257880414	<i>rpsE</i> <i>rplP</i> <i>rpsG</i> <i>rplM</i>
12	M20 家族肽酶 PepV[屎肠球菌 TX1330]; gi 227550917 谷氨酰基 tRNA 合成酶, 细菌/线粒体[屎肠球菌 DO]; gi 69245495 细胞分裂蛋白 FtsA[屎肠球菌 DO]; gi 69244711	<i>pepV</i> <i>gltX</i> <i>ftsA</i>

[0294]

IIb 类天冬酰基 tRNA 合成酶 [屎肠球菌 DO]; gi 69247321	<i>asnC</i>
--	--------------------

[0295] 通过这样方式,将来自大肠杆菌的 β -葡萄糖醛酸酶(*uidA*)基因作为报道基因引入到屎肠球菌LMG15709中。*uidA*基因产物 β -葡萄糖醛酸酶催化可商购的作为组织化学和光谱光度测量底物的多种 β -葡萄糖苷酸的切割。如图9所描绘的,通过将*uidA*在几种内源基因(基因X,在该实施例中为*gap*和*eno*,图9)的3'末端插入屎肠球菌LMG15709染色体中制备了双顺反子构建体。以此方式将屎肠球菌的*rpmD*用作表6的目的内源基因与*uidA*之间的基因间序列,以鉴定导致最高 β -葡萄糖醛酸酶(GUS)活性的位点(图10)。

[0296] 在需要时补加有胸苷的GM17中在30℃使屎肠球菌培养物生长16小时。清洗1ml培养物的细胞并将其重悬于1ml去矿物化水中。用MPBiomedicals裂解基质B和Fasprep-24装置以6m/s破坏细胞40秒。将管离心并制备系列稀释的细胞上清液。通过添加对硝基苯底物和 β -巯基乙醇得到在 β -葡萄糖醛酸酶存在下为黄色的溶液来测量GUS活性。在405nm下测量GUS活性并且相对于参照乳酸乳球菌菌株sAGX0090进行表示。平行处理所有的菌株。

[0297] 图10示出了基因X>>*rpmD*>>*uidA*双顺反子构建体的相对GUS活性。GUS活性相对于携带有Ph11A>>*uidA*表达盒的参照菌株sAGX0090进行表示并且示于Y轴上。发现所有双顺反子菌株中的GUS活性高于参照菌株。

[0298] 特别地,发现当与SAGX0090相比时,sAGX0270(*gap*>>*rpmD*>>*uidA*)和sAGX0271(*eno*>>*rpmD*>>*uidA*)中的GUS活性分别为30.6倍和26.9倍。

[0299] 这些结果清楚地确定了双顺反子表达允许在多种设定中增强蛋白质表达水平。

[0300] 实施例9:通过屎肠球菌双顺反子表达人白细胞介素10(hIL10)

[0301] 将乳酸乳球菌(SS)usp45分泌前导物的DNA编码序列在框中与成熟hIL10的DNA序列融合以得到hIL10的分泌。[SS::hIL10]表达盒与在SS::hIL10前面的屎肠球菌*rpmD*基因间区域一起作为第二顺反子插入*gap*下游(sAGX0279;图11a)。通过ELISA定量hIL10分泌能力以评价屎肠球菌中货物的双顺反子表达。屎肠球菌sAGX0270充当阴性对照。

[0302] 将菌株由单一菌落接种到在需要时补加有200 μ M胸苷的10mlGM17(GM17T)中并使其在30℃下生长16小时。为了定量hIL10分泌,将这些饱和过夜的培养物稀释1/25在5ml新鲜GM17T培养基中并使其在30℃下生长4小时。通过以3220 $\times$ g离心10分钟收集细胞,将其重悬于等量的BAM9T培养基中并在30℃下培养另外的3小时。BAM9T包含M9盐、0.5%安平、0.5%葡萄糖、25mM NaHCO₃、25mM Na₂CO₃、2mMMgSO₄、0.1mM CaCl₂和200 μ M胸苷。通过以3220 $\times$ g离心10分钟分离细胞和培养物上清液。培养物上清液中分泌的hIL10的量通过夹心式hIL10ELISA进行定量。平行处理所有的菌株。

[0303] 图11b示出了通过屎肠球菌菌株sAGX0270和sAGX0279的人hIL10分泌的定量。3小时中分泌的hIL10的量表示为ng/10⁹CFU细胞并且示于Y轴上。该图清楚地证实了,包含双顺反子表达盒的屎肠球菌菌株能够分泌相当大量的货物蛋白质hIL10。

[0304] 实施例10:通过屎肠球菌双顺反子表达人白细胞介素27(hIL27)

[0305] 将乳酸乳球菌(SS)usp45分泌前导物的DNA编码序列在框中与成熟hIL27的DNA序列融合以得到hIL27的分泌。[SS::hIL27]表达盒与在SS::hIL27前面的屎肠球菌*rpmD*基因间区域一起作为第二顺反子插入*gap*下游(sAGX0317;图12a)。通过ELISA定量hIL27分泌能

力以评价hIL27的双顺反子表达。屎肠球菌sAGX0270充当阴性对照。

[0306] 将菌株由单一菌落接种到在需要时补加有200 μ M胸苷的10ml GM17T (GM17T) 中并使其在30 $^{\circ}$ C下生长16小时。为了定量hIL27分泌,将这些饱和过夜的培养物稀释1/25在5ml新鲜GM17T培养基中并使其在30 $^{\circ}$ C下生长4小时。通过以3220 $\times$ g离心10分钟收集细胞,将其重悬于等量的BAM9T培养基中并在30 $^{\circ}$ C下培养另外的3小时。BAM9T包含M9盐、0.5%安平、0.5%葡萄糖、25mM NaHCO₃、25mM Na₂CO₃、2mM MgSO₄、0.1mM CaCl₂和200 μ M胸苷。通过以3220 $\times$ g离心10分钟分离细胞和培养物上清液。培养物上清液中分泌的人hIL27的量通过夹心式hIL27 ELISA进行定量(R&D systems)。平行处理所有的菌株。

[0307] 图12b示出了通过屎肠球菌菌株sAGX0270和sAGX0317的人hIL27分泌的定量。3小时中分泌的hIL27的量表示为ng/10⁹CFU细胞并且示于Y轴上。该图清楚地证实了,包含定位在屎肠球菌gap基因下游的双顺反子表达盒的屎肠球菌菌株sAGX0317能够有效分泌相当大量的外源蛋白质hIL27。

[0308] 实施例11:通过屎肠球菌多顺反子表达CDP870 Fab

[0309] 用CDP870 Fab的重链和轻链基因生成双顺反子表达构建体。所有的表达单元都位于细菌染色体上。

[0310] 图13a:将与乳酸乳球菌MG1363 usp45分泌前导物(SS) 编码序列融合的CDP870轻链和重链Fab [SS::CDP870VHCH1] 和 [SS::CDP870VLCL] 作为第二和第三顺反子插入屎肠球菌LMG15709gap基因的下游(sAGX0278)。在sAGX0278中,屎肠球菌rpmD的基因间区域用于偶联SS::CD870表达盒与gap。为了避免遗传不稳定,轻链与重链基因通过在乳酸乳球菌rpmD前面的基因间区域rpmD偶联,并且使用不同的密码子用于两种SS::CD870表达盒的usp45分泌信号。在sAGX0278中,重链表达盒在轻链表达盒之前。

[0311] 为了定量CDP870fab分泌,将菌株由单一菌落接种到10ml GM17T中并使其在30 $^{\circ}$ C下生长16小时。将这些饱和过夜的培养物稀释1/25在5ml新鲜GM17T培养基中并使其在30 $^{\circ}$ C下生长4小时。通过以3220 $\times$ g离心10分钟收集细胞,将其重悬于等量的BAM9T培养基中并在30 $^{\circ}$ C下培养另外的3小时。BAM9T包含M9盐、0.5%安平、0.5%葡萄糖、25mM NaHCO₃、25mM Na₂CO₃、2mM MgSO₄、0.1mM CaCl₂和200 μ M胸苷。通过以3220 $\times$ g离心10分钟分离细胞和培养物上清液。平行制备来自携带有各构建体的菌株的粗制上清液并在TNF结合活性存在下进行测定。这使用人TNF作为捕获蛋白并且将Cimzia[®] (CDP870fab与PEG连接) 用作参照标准通过直接ELISA来完成。通过山羊抗人IgG抗血清检测CDP870fab并通过与HRP缀合的驴抗山羊IgG (H+L) 抗血清来证明。通过TMB底物观察HRP活性。在30分钟后添加HCl使反应停止。在450nm下并使用595nm作为参照波长测量吸光度。平行处理所有的菌株。

[0312] 图13b揭示了在屎肠球菌中多顺反子构建体表达了重链和轻链二者,导致了功能性CDP870抗TNF Fab的分泌。

[0313] 实施例12:产生抗hTNF的乳酸乳球菌(根据本发明)针对A20IEC-KO小鼠中的hTNF诱导肠损伤进行保护。

[0314] 组织特异性A20缺陷小鼠的产生。

[0315] 如所述产生了其中tnfaip3的外显子IV和V旁侧是两个LoxP位点的附有条件的A20/tnfaip3敲除小鼠(Piguert等,1999,Lab Invest 79,495-500)。使A20液氧化(floxed)小鼠与Villin-Cre转基因小鼠杂交产生IEC特异性A20敲除小鼠(A20^{IEC-KO}) (Madison等,

2002, J Biol Chem 277, 33275-33283)。在回交到C57BL/6遗传背景中至少4代的小鼠上进行实验。

[0316] 体内TNF毒性。

[0317] 向小鼠腹膜内注射不同剂量的hTNF (50、10、8、6、4和2 μ g hTNF/20g体重)。大肠杆菌源重组hTNF的比活性为 6.8×10^7 IU/g。在实验室中产生了人TNF并纯化至均一,并且内毒素水平不超过1ng/mg蛋白质。A20^{IEC-K0}小鼠的hTNF注射诱导了几种病理学和免疫学变化,指示了肠损伤。低剂量hTNF不诱导严重的全身作用和致死,但是诱导促炎性细胞因子和趋化因子表达,其可在血清和肠组织匀浆二者中进行测量。在4或5小时后使小鼠安乐死用于组织学分析。为了治疗性研究,A20^{IEC-K0}小鼠通过口服喂食接受(根据本发明的)产生抗TNF的乳酸乳球菌5次(5×10^{10} CFU,间隔30分钟)之后,腹膜内注射hTNF (2 μ g和6 μ g hTNF/20g体重)。对照组用母本乳酸乳球菌菌株MG1363或细菌培养基BM9T(载体)处理。此外,阳性对照组用单次注射英夫利昔单抗(30mg/kg)来后处理。每小时监测体温。

[0318] 组织样品制备。

[0319] 用PBS冲洗新鲜分离的结肠和回肠区段以移除排泄内含物,随后用福尔马林(磷酸盐缓冲盐水(PBS)中的4%甲醛)冲洗并通过在4 $^{\circ}$ C下在10倍过量的福尔马林中孵育过夜进行固定。移除福尔马林并用PBS清洗肠两次,然后使用标准方法包埋在固体石蜡中。

[0320] 组织学。

[0321] 切下4 μ m的组织切片并使用标准技术用苏木精/伊红染色。为了进行组合的阿尔新蓝(AB)和PAS染色,将经脱蜡的切片水化到蒸馏水中并在阿尔新蓝中孵育20分钟。随后在1%高碘酸中将切片孵育10分钟,然后在希夫试剂中孵育10分钟。用Mayer苏木精将核对比染色30秒。通过在黑暗中的NBT/BCIP溶液(70 μ l NBT+70 μ l BCIP+4860 μ l缓冲剂A;NBT=70%二甲基甲酰胺中的1.5%氯化硝基四氮唑蓝溶液;BCIP=100%二甲基甲酰胺中的1%5-溴-4-氯-3-吡啶基磷酸酶;缓冲剂A=0.1M TrisHCl,0.1M NaCl,0.05M MgCl₂,pH9.5)中孵育经脱蜡和水化的组织切割进行碱性磷酸酶检测。为了免疫化学,使切片脱蜡,在Dako抗原修复溶液中孵育并在Pick细胞冷却单元中煮沸20分钟后冷却2.5小时。在室温下通过将玻片浸没在过氧化物酶阻断缓冲剂(0.040M柠檬酸,0.121M磷酸氢二钠,0.030M叠氮化钠,1.5%过氧化氢)中维持15分钟来阻断内源过氧化物酶活性。在室温下添加阻断缓冲剂(PBS中的1%牛血清白蛋白)至玻片维持30分钟。在阻断缓冲剂中添加第一抗体(兔抗溶菌酶;1:1,750稀释-Dako;兔抗粘蛋白-2;1:500 22)并将组织切片孵育过夜。在室温下添加第二抗体(聚合物辣根过氧化物酶标记的抗兔,设想)维持30分钟。通过在室温下添加二氨基丁酸(DAB)底物维持10分钟来检测过氧化物酶,并用Mayer苏木精将细胞核对比染色2分钟。用Leica图像管理器500软件进行潘氏细胞颗粒半径的显微镜测量。

[0322] 细胞因子定量

[0323] 在配备有CellQuest Pro和CBA软件(BD Biosciences)的FACS Calibur细胞计数器上通过Cytometric Bead Array试剂盒(CBA)(BD Biosciences)定量血清和组织匀浆中的细胞因子和趋化因子。

[0324] 定量实时PCR

[0325] 新鲜分离5cm长的回肠区段并用PBS冲洗以移除排泄内含物。将一段结扎,用RNA裂解缓冲剂(Aurum Total RNA Mini kit,Bio-Rad Laboratories)装满区段并在冰上孵育5

分钟。使用Aurum Total RNA Mini kit (Bio-Rad Laboratories) 从裂解溶液中纯化RNA。使用iScript cDNA合成试剂盒 (Bio-Rad Laboratories) 根据制造商说明书进行cDNA合成。在LightCycler480 (Roche) 上用LightCycler480SYBR Green I Master Mix (Roche) 和特定引物以10 μ L的总体积将10ng cDNA用于进行定量PCR。重复进行三次实时PCR反应。使用以下小鼠特异性引物: 泛素正向, 5'-AGGTCAAACAGGAAGACAGACGTA-3' (SEQ ID NO:14); 和泛素反向, 5'-TCACACCCAAGAACAAGCACA-3' (SEQ ID NO:15); 溶菌酶P正向, 5'-GCCAAGGTCTAACAATCGTTGTGAGTTG-3' (SEQ ID NO:16); 溶菌酶P反向, 5'-CAGTCAGCCAGCTTGACACACG-3' (SEQ ID NO:17); Cryptidin-1正向, 5'-TCAAGAGGCTGCAAAGGAAGAGAAC-3' (SEQ ID NO:18); Cryptidin-1反向, 5'-TGGTCTCCATGTTTCAGCGACAGC-3' (SEQ ID NO:19)。

[0326] 统计学分析。

[0327] 结果表示为平均值 $\pm$ SEM。使用未配对两样品的学生t检验评估实验组之间的统计显著性。

[0328] 表征产生抗hTNF的乳酸乳球菌以保护A20IEC-KO小鼠免于hTNF诱导的病理学和免疫学改变。

[0329] 与用产生抗hTNF的乳酸乳球菌处理的A20IEC-KO小鼠相比, 注射2 μ g hTNF的两个对照组显示出体温更大幅度的下降 (图14a, 左图)。当向小鼠注射更高浓度的hTNF (6 μ g) 时, 不能再观察到在用2 μ g hTNF处理的小鼠中所观察到的sAGX0220处理的保护作用, 而类克 (Remicade) 处理清楚地具有保护作用 (图14a, 右图)。与载体处理小鼠相比, sAGX0220预处理使经2 μ g hTNF处理之小鼠的回肠和结肠匀浆中以及血清中的MCP-1、KC和IL-6水平显著降低 (图14b、c)。但是, 用母本乳酸乳球菌菌株MG1363处理的小鼠中具有可比较的降低, 表明施用细菌其自身已可具有益菌保护作用。经6 μ g hTNF攻击的小鼠在sAGX0220预处理后显示出血清和组织细胞因子和趋化因子水平的类型降低, 其程度与类克的相同 (图14d、e)。但是, 在这种环境下, 母本MG1363菌株的保护作用大部分丧失 (图14d、e)。

[0330] 实施例13: 用由乳酸乳球菌局部产生和分泌的毒素中和抗体被动免疫接种对抗艰难梭菌相关疾病。

[0331] a) 基因合成艰难梭菌毒素A和艰难梭菌毒素B中和mAb的VLCL和VHCH1

[0332] 根据常规方法 (Stemmer等, Gene 1995; 164 (1): 49-53) 基于VH和VL氨基酸信息进行从头基因合成 (优化以用于乳酸乳球菌密码子使用)。该方法利用跨越整个编码链以及非编码链的合成40-mer寡核苷酸, 以此方式使来自编码链的每条寡核苷酸分别与非编码链中两条连续寡核苷酸的最后和前20个碱基对100%互补, 并且反之亦然。

[0333] 将编码乳酸乳球菌未鉴定的分泌45-kDa蛋白 (Usp45) 的分泌前导物的遗传信息添加到VLCL和VHCH1基因的5'末端。

[0334] 为了保证协调表达, 将这些合成VLCL和VHCH1基因串联放置并通过rpmD基因间区域联接。这导致了功能性VLCL >> VHCH1操纵子的形成。还构建了上述合成基因的变体, 其也编码C端E和FLAG肽标签。这使得全尺寸和/或可能降解的产物可视化, 并且能够验证轻链和重链装配以及毒素结合。

[0335] 对所得基因构建体进行序列验证。

[0336] b) 构建分泌毒素A/B中和Fab的乳酸乳球菌菌株: 在Usp45基因座处整合

[0337] 该任务由以下阶段组成：

[0338] 1. 构建用于在usp45基因座下游整合以下的整合载体

[0339] • 艰难梭菌毒素A中和Mab的VLCL>>VHCH1

[0340] • 艰难梭菌毒素B中和Mab的VLCL>>VHCH1

[0341] • 以上的3' E和FLAG标记变体

[0342] 合成的VLCL>>VHCH1操纵子在5' 末端旁侧是1kb的乳酸乳球菌usp45基因的3' 末端,然后是rp1N基因间区域。VLCL>>VHCH1操纵子在3' 末端旁侧是乳酸乳球菌usp45基因3' 下游侧翼区的1kb片段。通过重叠PCR/DNA退火进行构建。对所得质粒进行序列验证。

[0343] 2. 将以上生成的整合质粒用于通过与乳酸乳球菌MG1363的usp45基因翻译偶联来整合。通过在5' 和3' 侧翼区二者(对应于usp453' 末端旁侧的1kb区域)处的双同源重组进行整合,并通过PCR和DNA测序进行验证。

[0344] c) 构建分泌毒素A/B中和Fab的乳酸乳球菌菌株:在enoA基因座处整合

[0345] 该任务由以下阶段组成：

[0346] 1. 构建用于在enoA基因座下游整合以下的整合载体

[0347] • 艰难梭菌毒素A中和Mab的VLCL>>VHCH1

[0348] • 艰难梭菌毒素B中和Mab的VLCL>>VHCH1

[0349] • 以上的3' E和FLAG标记变体

[0350] 来自Task7的合成VLCL>>VHCH1操纵子在5' 末端旁侧是1kb的乳酸乳球菌enoA基因的3' 末端,然后是rp1N基因间区域。VLCL>>VHCH1操纵子在3' 末端旁侧是乳酸乳球菌enoA基因3' 下游侧翼区的1kb片段。通过重叠PCR/DNA退火进行构建。对所得质粒进行序列验证。

[0351] 2. 将以上生成的整合质粒用于通过与乳酸乳球菌MG1363的enoA基因翻译偶联来整合。通过在5' 和3' 侧翼区二者(对应于enoA3' 末端旁侧的1kb区域)处的双同源重组进行整合,并通过PCR和DNA测序进行验证。

[0352] d) 建立CDAD的TopAct™相容性仓鼠模型

[0353] CDAD的仓鼠模型是已建立的用于研究毒素诱导型抗生素相关腹泻和结肠炎的模型。仓鼠中艰难梭菌感染最广泛研究的模型是初级攻击模型。简言之,用克林霉素(10至30mg/kg)经口胃预处理仓鼠24小时后施用艰难梭菌孢子以破坏仓鼠中的正常结肠菌群。经口胃施用艰难梭菌孢子(例如,菌株630或B1的100个孢子;参见Goulding等,Infect Immun 2009;77(12):5478-5485),并观察仓鼠(CDAD初级攻击模型)。通常,100%的仓鼠在孢子施用36小时与72小时之间死于疾病。在死亡之前,疾病的症状包括腹泻和重量减轻。一般而言,虽然症状比在人中观察的那些症状严重的多得多,但是仓鼠模型响应于用于临床疾病的治疗手法(例如用万古霉素治疗),并因此被广泛用于研究CDAD。

[0354] 为了模拟CDAD复发控制,使用经改良的原发性疾病仓鼠模型。万古霉素保护仓鼠免于艰难梭菌疾病,正如其保护人一样。当中断万古霉素治疗时,仓鼠复发了严重的疾病,但是发病率有所改变。简言之,向仓鼠给药单剂量的克林霉素,然后在1天后经口胃施用艰难梭菌菌株B1孢子。在孢子攻击当天或24小时后开始万古霉素治疗,并每天继续以维持之后的两天至四天(CDAD复发模型)。可进一步优化该方案以确保用万古霉素援救之后的复发。

[0355] 为了评估经乳酸乳球菌经肠递送的毒素中和Fab在预防仓鼠感染的原发和/或复发模型死亡中的益处,重要的是记录克林霉素和万古霉素对乳酸乳球菌的生长和Fab生产能力的影响。因此,进行体外/体内研究以确定分泌Fab的乳酸乳球菌菌株的生存力和代谢活性。

[0356] • 体外评价:将补充有克林霉素/万古霉素的乳酸乳球菌培养物的Fab生产(通过ELISA)和生长(通过铺板)与不含抗生素的培养物和补充有5 μ g/ml氯霉素(Cm)的培养物进行比较。在该浓度下,Cm是已知的乳酸乳球菌敏感的蛋白质合成和生长的抑制剂。

[0357] • 体内评价:在口服喂食仓鼠并用不同剂量的克林霉素/万古霉素联合治疗之后,在小肠/大肠中确定Fab生产(通过ELISA)和生长(通过铺板)。

[0358] 这些评价允许设计非常适合于评价乳酸乳球菌递送系统之预防性和治愈性作用的CDAD的仓鼠模型(攻击和复发):其使用(较低的)克林霉素(和万古霉素)浓度和/或抗生素的不同混合物,证实对艰难梭菌感染具有易感性并且对乳酸乳球菌生存力和代谢活性没有负面作用。

[0359] e) 验证CDAD的仓鼠模型。

[0360] 在仓鼠初级攻击模型中,在开始施用艰难梭菌孢子3天之前,向叙利亚金黄地鼠(70至80g)腹膜内给药不同口服剂量(qd、bid或tid)所选的分泌抗毒素A/B的乳酸乳球菌(单独的抗毒素A和抗毒素B以及其组合)或1ml抗毒素A/B mAb(作为阳性对照)维持4天。经口胃施用克林霉素(如上所限定的剂量或抗生素的另一种混合物)24小时之后,使用标准小动物饲喂针进行艰难梭菌孢子攻击。观察动物的发病率和死亡率,对肠组织的组织学损伤和宏观损伤进行评分,并测定管腔内容物和排泄物中的艰难梭菌毒素产生。

[0361] 在仓鼠复发模型中,向叙利亚金黄地鼠(70至80g)经口胃给药克林霉素(如上所限定的剂量或抗生素的另一种混合物)并在24小时后经口胃用艰难梭菌B1孢子攻击。在孢子施用或24小时后,开始经口胃的万古霉素治疗(如上所限定的剂量)并每天继续,总计2至4天。在万古霉素治疗后开始的第1、2、3、4或5天中,施用不同口服剂量(qd、bid或tid)所选的分泌抗毒素A/B的乳酸乳球菌(单独的抗毒素A和抗毒素B以及其组合)或1ml抗毒素A/B mAb(作为阳性对照,腹膜内),维持总计5至10天。观察动物的发病率和死亡率,对肠组织的组织学损伤和宏观损伤进行评分,并测定管腔内容物和排泄物中的艰难梭菌毒素产生。

[0362] 可总结的是,根据本发明的革兰氏阳性菌可有效地用于针对CDAD免疫。特别地,根据本发明的革兰氏阳性菌可预防CDAD发生,预防CDAD复发,并且治疗CDAD。

[0363] 实施例14:用于重构的口腔清洗粉末:

[0364] 口腔清洗制剂的原料药(DS)是根据本发明的改造菌株与冷冻保护剂(葡聚糖、山梨糖醇和谷氨酸钠)混合的均匀冻干粉末。

[0365] 原料药的生产工艺包括以下连续的步骤:发酵、生物质浓缩(通过渗滤器离心)、与冷冻保护剂配制、填充到合适的盘中并进行大块冻干。进行冻干块状物的均化和筛分以产生适合于与赋形剂混合并填充到期望药物剂型中的均匀粉末(原料药)。

[0366] 用于重构的口腔清洗药品(DP)粉末由与作为赋形剂的甘露醇混合的冷冻干燥乳酸乳球菌组成,并且呈现为(压缩)粉末。临床制剂以口腔清洗剂形式口服局部施用。该口腔清洗悬液通过将DP重构到所选溶液中来制备。

[0367] 用于重构的口腔清洗粉末的生产工艺包括一系列的连续步骤:

[0368] ●将块状DS与甘露醇混合,

[0369] ●在500mg可分散粉盒中压缩500mg DP粉末混合物,

[0370] ●将压缩粉末填充到玻璃小瓶中,

[0371] ●用防揭换对儿童安全的螺帽封闭小瓶,以及

[0372] ●将小瓶包装在铝(Alu)袋中。

[0373] 实施例15:CDP870的双顺反子表达

[0374] 用CDP870抗TNF Fab的重链和轻链生成了双顺反子表达构建体。所有的表达单元都位于细菌染色体上。

[0375] 图15A,多种菌株中CDP870抗TNF表达单元的概述图:将与usp45分泌前导物编码序列融合的CDP870轻链和重链Fab(SS::CDP870VLCL和SS::CDP870VHCH1)作为第二和第三顺反子插入usp45(sAGX0309、SAGX0319)、enoA(sAGX0275)和gapB(sAGX0323、SAGX0326)下游。在这些菌株中,rpmD分别用于偶联SS::CD870基因与usp45、enoA或gapB。为了避免遗传不稳定,轻链与重链通过在rp1N前面的基因间区域偶联。在图15B和C中,分析并报道了sAGX0326的4个相同克隆(克隆1至4)。在整个实验中平行处理菌株。

[0376] 为了观察并定量CDP870抗TNF分泌,将菌株由单一菌落接种至10ml GM17T(Difco™M17,BD,Sparks,MD,+0.5%葡萄糖+200μM胸苷)中并在30℃下生长16小时。通过以3220×g离心10分钟收集来自这些饱和过夜培养物的细菌,将其重悬于10ml新鲜GM17T培养基中并且在30℃下生长2小时。通过以3220×g离心10分钟分离细菌和粗制培养物上清液。平行制备所有菌株的粗上清液并每个菌株分开以分析(图15B和C)。

[0377] 用苯酚萃取5ml体积原始培养物上清液的总蛋白质内容物,用乙醇沉淀并将其重悬于SDS-PAGE样品缓冲剂中。使用山羊抗人Fab作为初级抗血清通过western印迹分析1ml原始培养物上清液的等同物并通过兔抗山羊AP和NBT/BCIP染色进行证明(图15B;菌株示于各自泳道的右侧)。

[0378] 测定携带有各构建体之菌株的粗制上清液中hTNF结合活性的存在。这使用hTNF作为捕获蛋白和Cimzia作为参照标准通过直接ELISA来完成。通过山羊抗人IgG抗血清检测并通过与辣根过氧化物酶(HRP)缀合的抗山羊抗血清证明VLCL部分。通过比色测定测量HRP活性。数据示于图15C中,菌株示于各自的柱下面。

[0379] 图15(B和C)表明,双顺反子构建体高度表达了重链和轻链二者,导致了高水平的功能性CDP870抗TNF Fab。图15(B和C)表明,与重链和轻链基因作为第二和第三顺反子插入usp45下游相比时,当插入enoA下游时CDP870抗TNF表达略微增加。图15(B和C)还表明,与重链和轻链基因作为第二和第三顺反子插入usp45或enoA下游相比时,当插入gapB下游时CDP870抗TNF表达大幅度增加。

[0380] 为了确定特异性hTNF中和能力(生物活性/TNF结合蛋白量),将菌株由单一菌落接种至5ml GM17T中并在30℃下生长16小时。通过以3220×g离心10分钟收集来自这些饱和过夜培养物的细菌,将其重悬于5ml BM9T培养基中并且在30℃下生长2小时。通过以3220×g离心10分钟分离细菌和原始培养物上清液。平行制备所有菌株的粗制上清液并每个菌株分开以分析(图15D和E)。

[0381] 测定携带有各构建体之菌株的粗制上清液中TNF结合活性的存在。这使用人TNF作为捕获蛋白和Cimzia作为参照标准通过直接ELISA来完成。通过山羊抗人IgG抗血清检测并

通过与辣根过氧化物酶 (HRP) 缀合的抗山羊抗血清证明VLCL部分。通过比色测定测量HRP活性。数据示于图15D中, 菌株示于各自的柱下面。

[0382] 测定携带有各构建体之菌株的粗制上清液中TNF中和活性的存在。这通过经hTNF易感性WEHI细胞与人TNF一起孵育并添加抗TNF来完成。抗TNF将清除hTNF并保护WEHI细胞免于细胞死亡。将1/2稀释系列的粗制上清液以及参照标准 (63ng/ml的Cimzia) 添加到经历hTNF的细胞培养物中。确定对细胞死亡的影响。数据示于图1 SE中, 菌株示于各自的柱下面。

[0383] 图15D表明双顺反子构建体高度表达了重链和轻链二者, 导致了高水平的功能性CDP870抗TNF Fab。图15D还表明, 与重链和轻链基因作为第二和第三顺反子插入usp45下游相比时, 当插入gapB下游时CDP870抗TNF表达大幅度增加。

[0384] 图15D和E示出, 菌株sAGX0323和sAGX0326的粗制培养物上清液中CDP870抗TNF的特异性TNF中和能力 (生物活性/TNF结合蛋白量) 与Cimzia的相同。

[0385] 实施例16: 乳酸乳球菌分泌抗hTNF α Fab片段的效力

[0386] 实验装置以Tg1278TNFko小鼠为基础, 所述Tg1278TNFko小鼠是在小鼠TNF不存在下正常调节人TNF表达的转基因小鼠 (Keffner等. EMB0. J10, 4025-4031, 1991)。在一次皮肤预致敏后通过40%乙醇中的4% TNBS的直肠施用攻击诱导结肠炎。简言之, 在通过将1体积5% TNBS+4体积4:1丙酮: 橄榄油至背上经剃毛的1.5×1.5cm皮肤区域进行直肠内攻击7天之前 (第-7天) 对小鼠进行敏化。在攻击当天 (第0天), 首先用克他命/甲苯噻嗪麻醉小鼠, 随后通过将软导管插入到直肠内4cm经直肠施用100 μ L 4% TNBS/40% EtOH。为了确保结肠内灌肠剂的平均分配, 在进行直肠攻击之后直接使小鼠保持在垂直位置维持30秒。

[0387] 在直肠TNBS攻击前1天 (第-1天) 开始治疗并持续另外的4天 (第+3天)。三组小鼠接受胃内接种10¹⁰CFU MG1363 (阴性对照)、10¹⁰CFUSAGX0309或10 μ g Cimzia (阳性对照), 每天一次。在第0天开始并每天监测小鼠的体重、发病率和存活。在第+3天处死小鼠并收集结肠样品和血清用以进行组织学 (结肠) 和细胞因子 (结肠和血清) 分析。

[0388] 与野生型乳酸乳球菌菌株MG1363相比, 用根据本发明一个实施方案的菌株 (分泌抗hTNF的乳酸乳球菌菌株sAGX0309) 处理导致存活增加 (图16和表7), 并且出乎意料地, 甚至比用Cimzia处理的小鼠的存活百分比更高。

[0389] 表7

[0390]

存活	乳酸乳球菌 sAGX0309	乳酸乳球菌 MG1363	Cimzia
第1天	100% (7/7)	100% (9/9)	100% (9/9)
第2天	86% (6/7)	89% (8/9)	89% (8/9)
第3天	86% (6/7)	56% (5/9)	78% (7/9)

[0391] 治疗期间还追踪了小鼠的体重, 描绘于图17中。由图17明显看出, 与用Cimzia治疗

相比,用根据本发明一个实施方案的菌株处理后的重量减轻降低。

[0392] 还分析了结肠的组织学状态并根据表8对组织学评分进行了归类。结果示于图18中。由图18看出,在用根据本发明一个实施方案的菌株处理之后,组织学评分显著改善并因此结肠病理学的减少是明显的。

[0393] 表8

[0394]

组织学评分	描述
0	没有炎症;没有上皮损伤
1	隐窝周围的粘膜有炎症;没有上皮损伤
2	粘膜下炎症;伴随杯状细胞损失的轻微上皮损伤
3	粘膜下炎症;隐窝结构局部丧失
4	粘膜下炎症;扩大面积的粘膜中隐窝结构丧失

[0395] 最后,由图19明显看出的是,用根据本发明一个实施方案的菌株处理导致了结肠促炎性细胞因子分泌的抑制。

序列表

[0001]	<110>	Actogenix N.V.	
	<120>	用于细菌的多顺反子表达系统	
	<130>	AGX-030-PCT	
	<150>	11168495.7	
	<151>	2011-06-01	
	<150>	11173588.2	
	<151>	2011-07-12	
	<160>	19	
	<170>	PatentIn version 3.3	
	<210>	1	
	<211>	5	
	<212>	DNA	
	<213>	乳酸乳球菌	
	<400>	1	
		taatg	5
	<210>	2	
	<211>	9	
	<212>	DNA	
	<213>	乳酸乳球菌	
	<400>	2	
		taatccatg	9
	<210>	3	
	<211>	16	
	<212>	DNA	
	<213>	乳酸乳球菌	
	<400>	3	
		taaggaggaa aaaatg	16
	<210>	4	
	<211>	21	
	<212>	DNA	
	<213>	乳酸乳球菌	
	<400>	4	
		taatagagga ggaaantegt g	21
	<210>	5	
	<211>	24	
	<212>	DNA	
	<213>	乳酸乳球菌	
	<400>	5	
		taagaagga gataagtaag aatg	24
	<210>	6	
	<211>	24	
	<212>	DNA	
	<213>	乳酸乳球菌	
	<400>	6	
		taaggaaagg ggtaattaaa catg	24
	<210>	7	
	<211>	28	
	<212>	DNA	
	<213>	乳酸乳球菌	
	<400>	7	
		taagcaaaac taggaggaa atagcatg	28

[0002]

<210> 8	
<211> 5	
<212> DNA	
<213> 屎肠球菌	
<400> 8	
taatc	5
<210> 9	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> 屎肠球菌	
<400> 9	
taaggaggac aacaata	17
<210> 10	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 屎肠球菌	
<400> 10	
taataggagg gaatttea	18
<210> 11	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 屎肠球菌	
<400> 11	
ttagaagaag gaggaataacc attc	24
<210> 12	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 屎肠球菌	
<400> 12	
taaaagtta aggaaggagg gtcttactga	30
<210> 13	
<211> 34	
<212> DNA	
<213> 屎肠球菌	
<400> 13	
taatcaagta gaatctacaa ggaggtgtct ttaa	34
<210> 14	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 引物	
<400> 14	
aggtcacaca ggaagacaga cgta	24
<210> 15	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 引物	
<400> 15	
tcacacccaa gaacaagcac a	21
<210> 16	
<211> 28	
<212> DNA	

	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 16	
	gccaaggtct aacaatcggt gtgagttg	28
	<210> 17	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 17	
	cagtcagcca gcttgacacc acg	23
[0003]	<210> 18	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 18	
	tcagaggctt gcaaaggaag agaac	25
	<210> 19	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 19	
	tggtctccat gttcagcgac agc	23

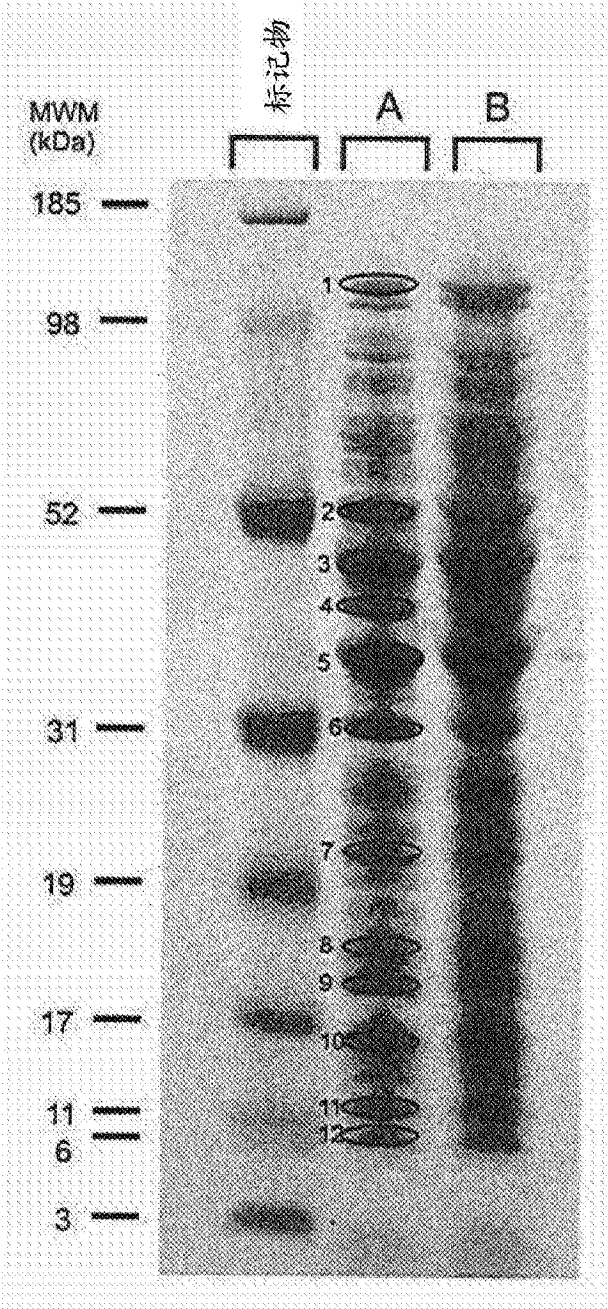


图1

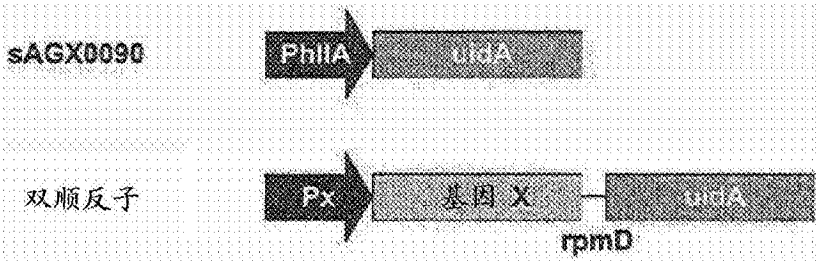


图2

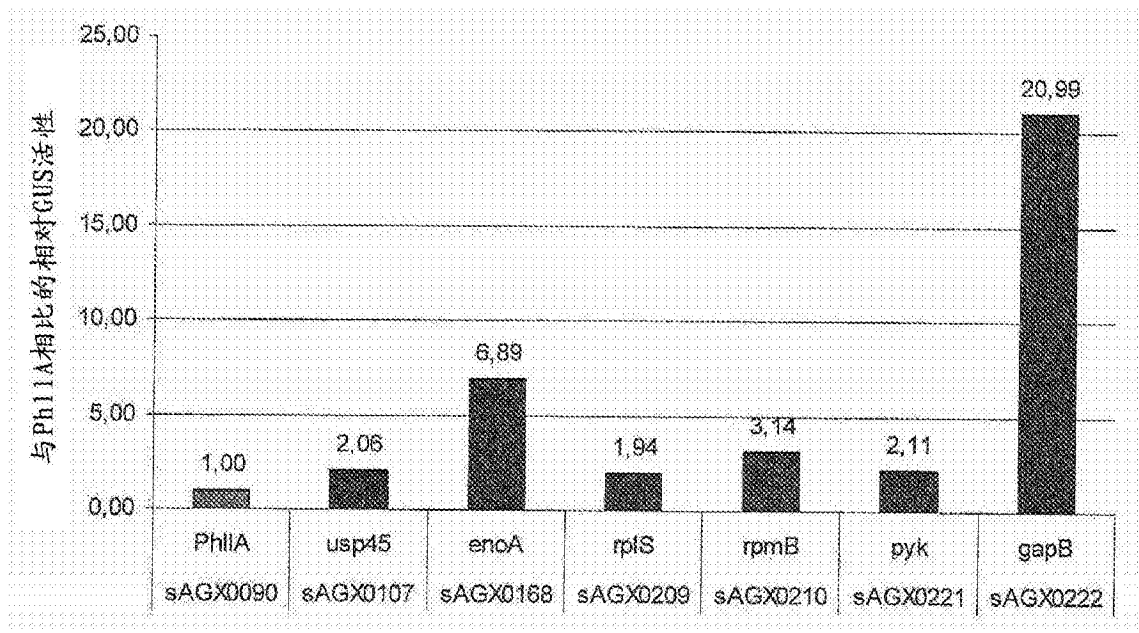


图3

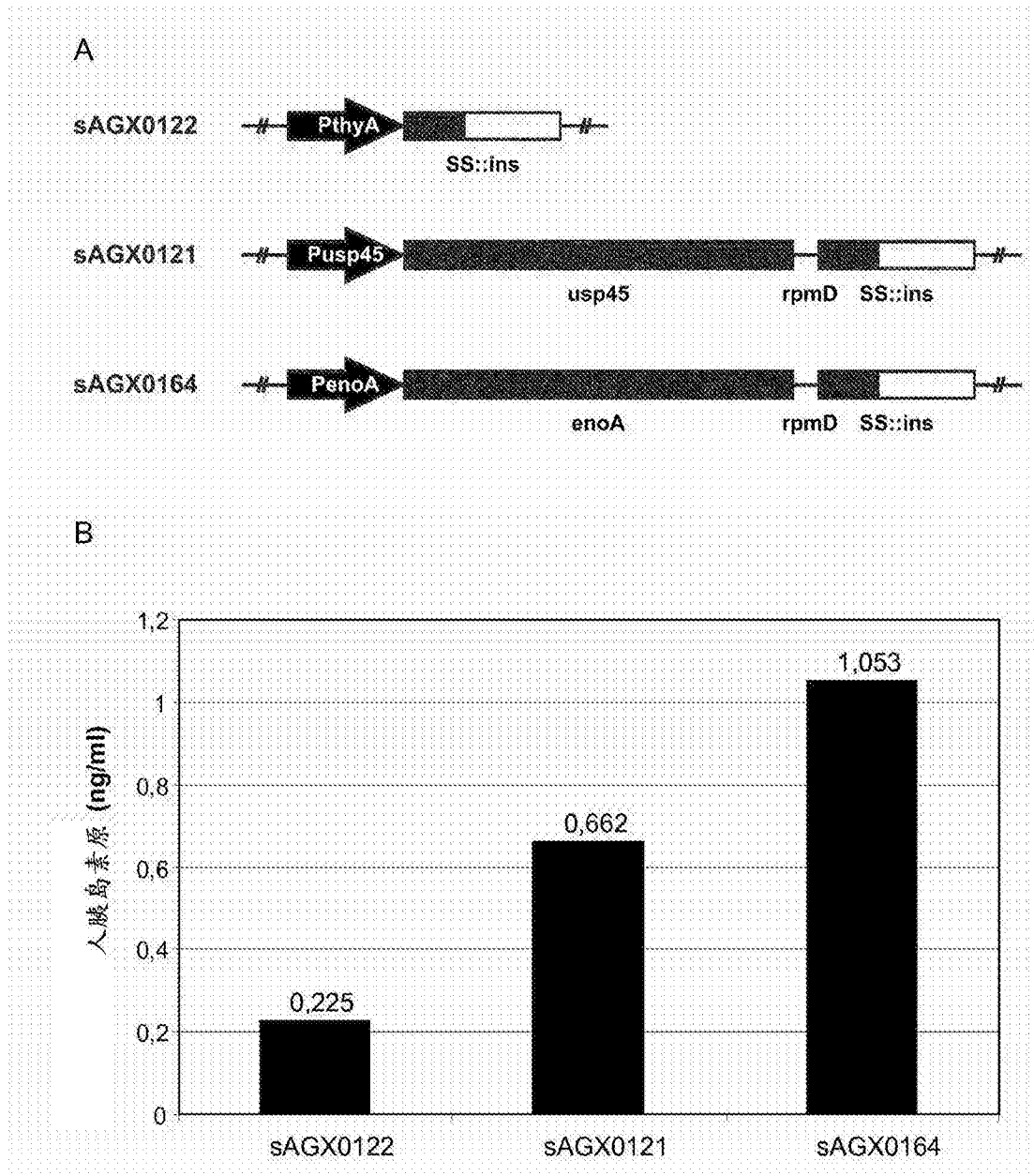


图4

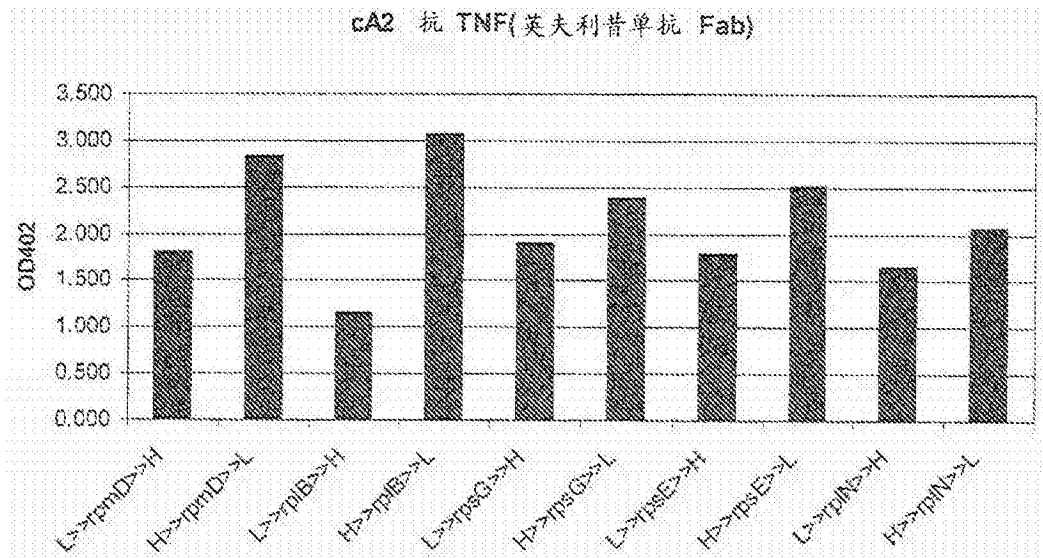


图5

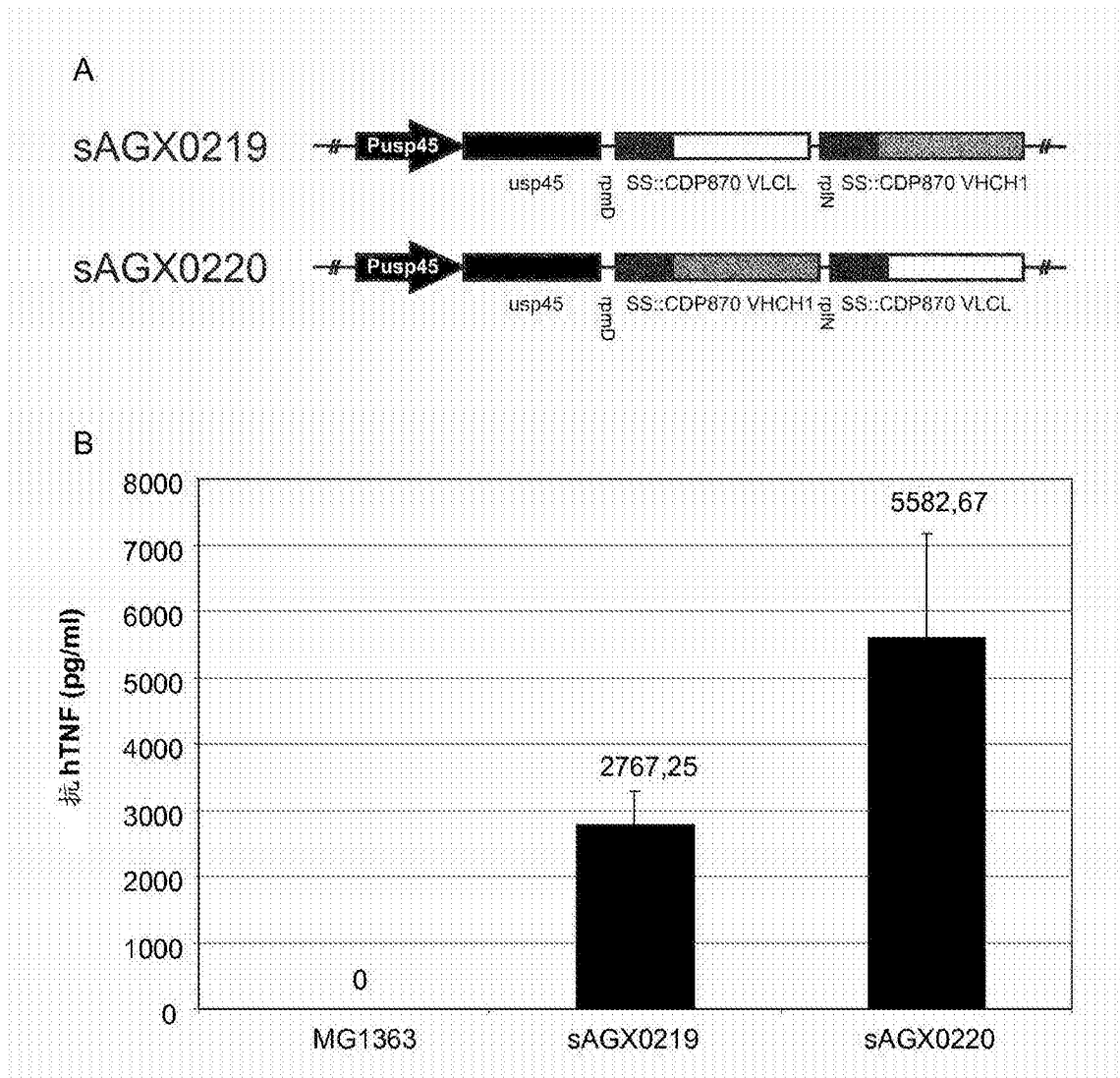


图6

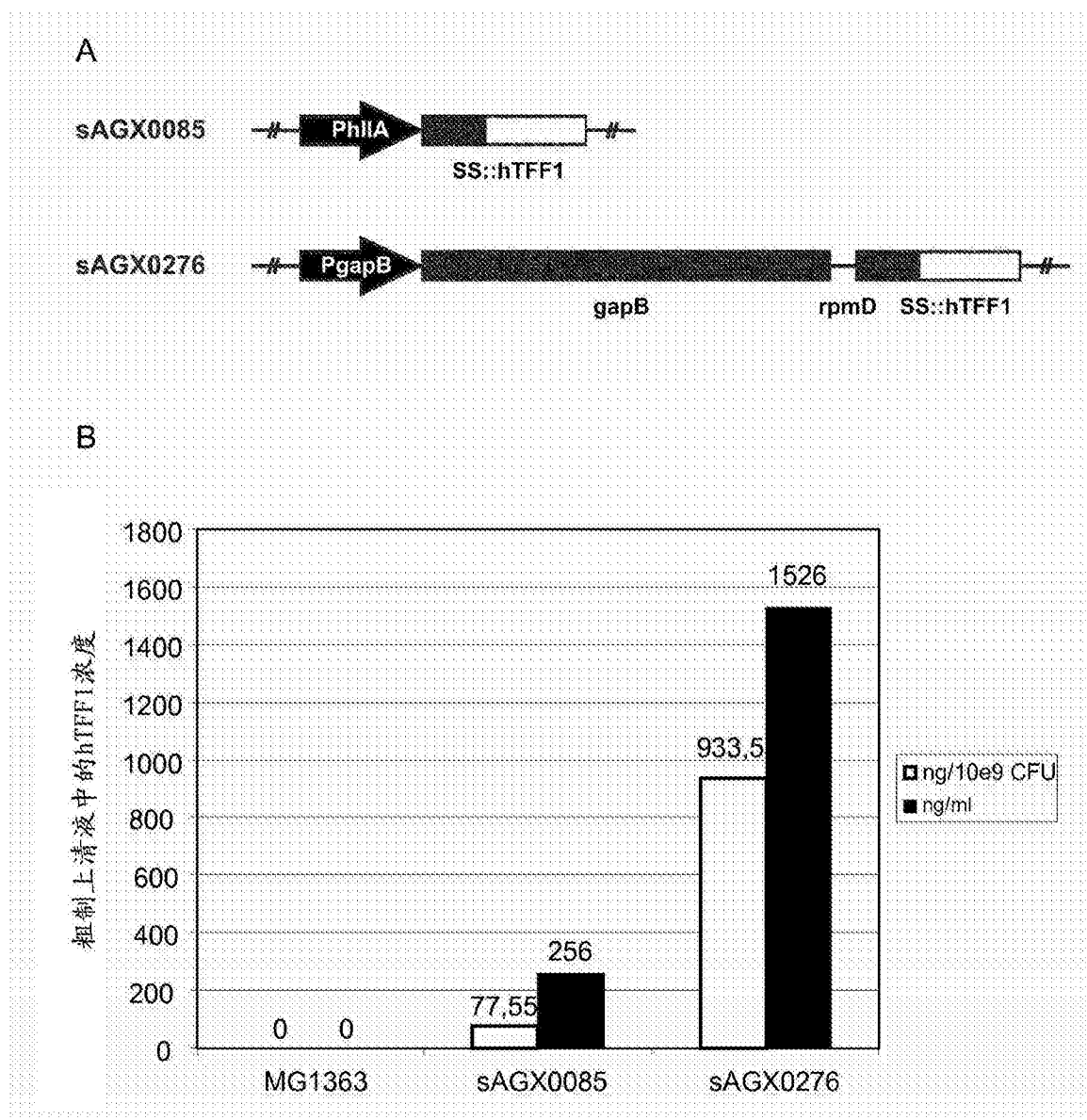


图7

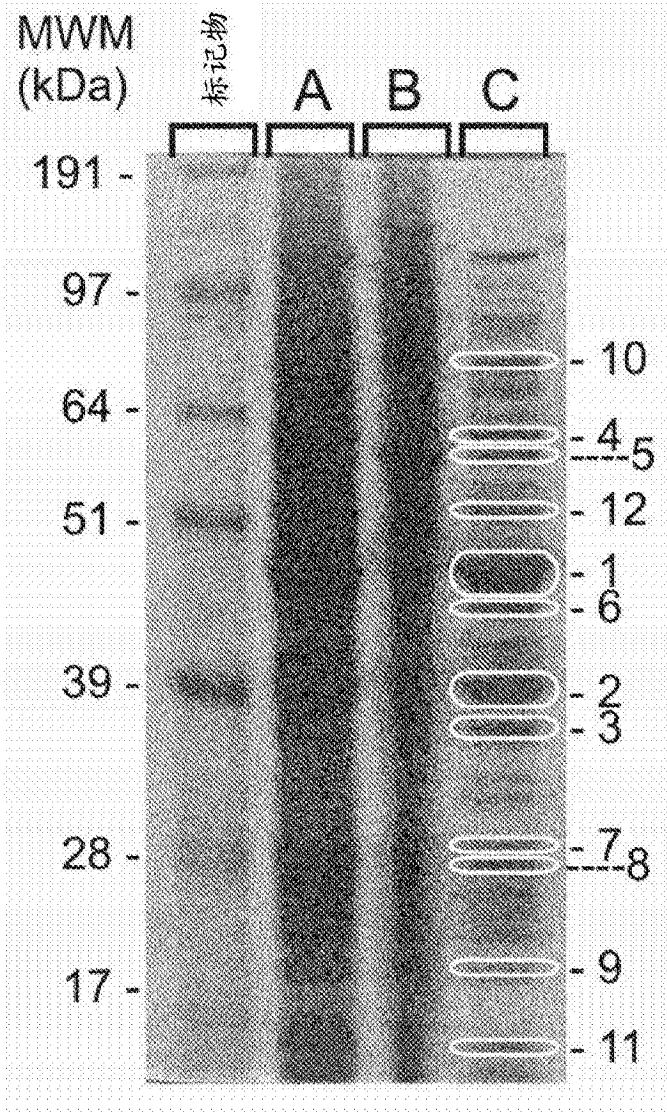


图8

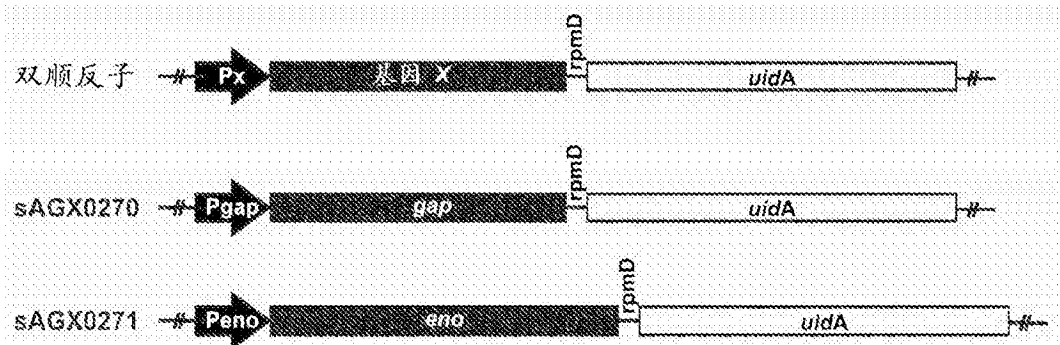


图9

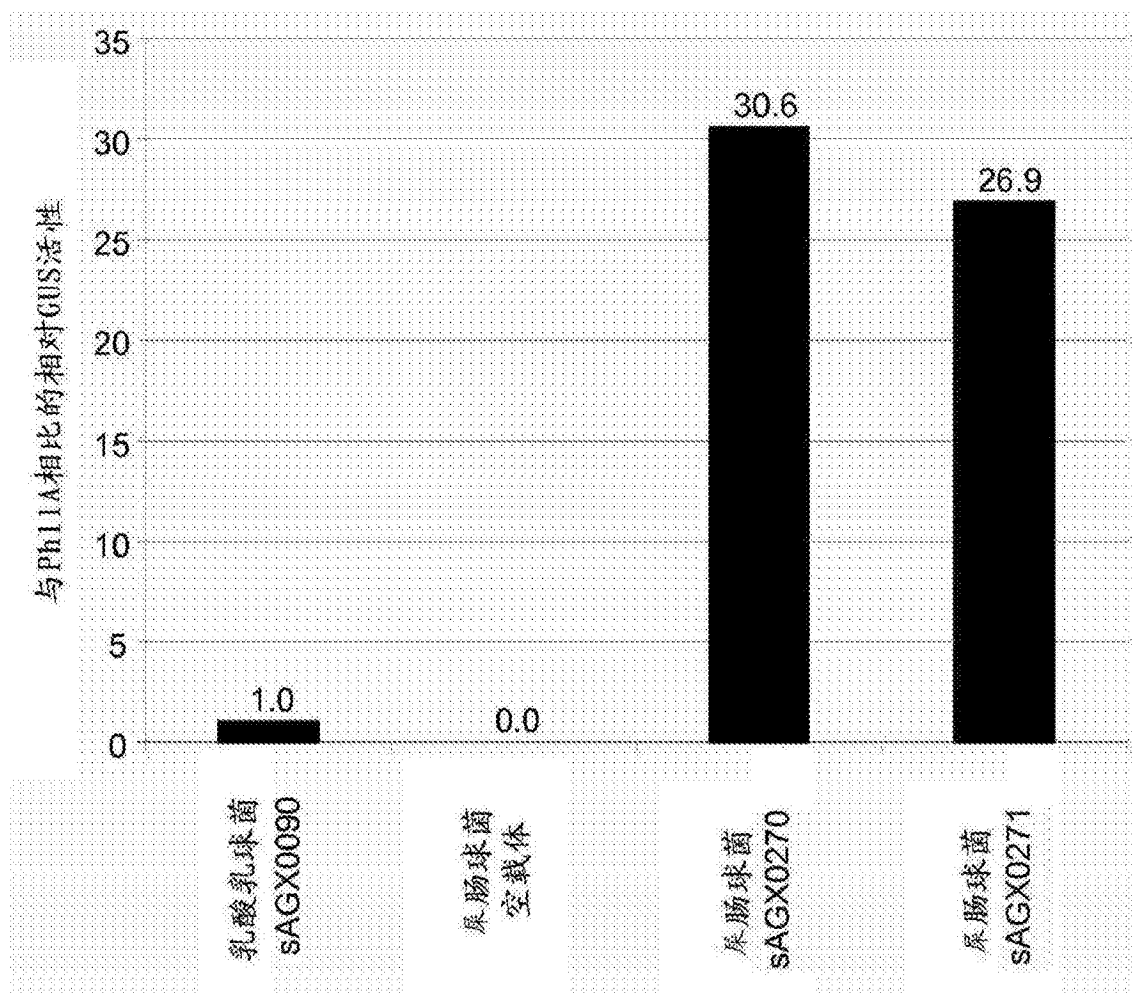


图10

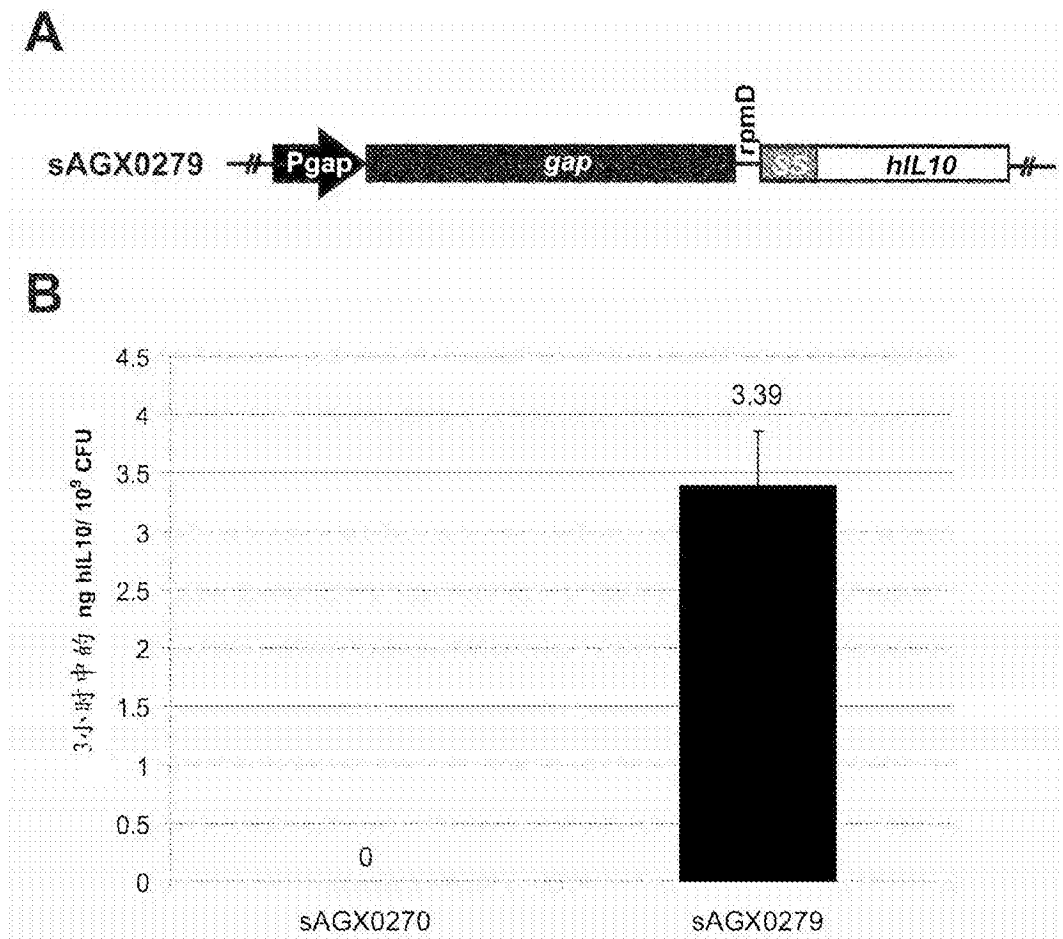


图11

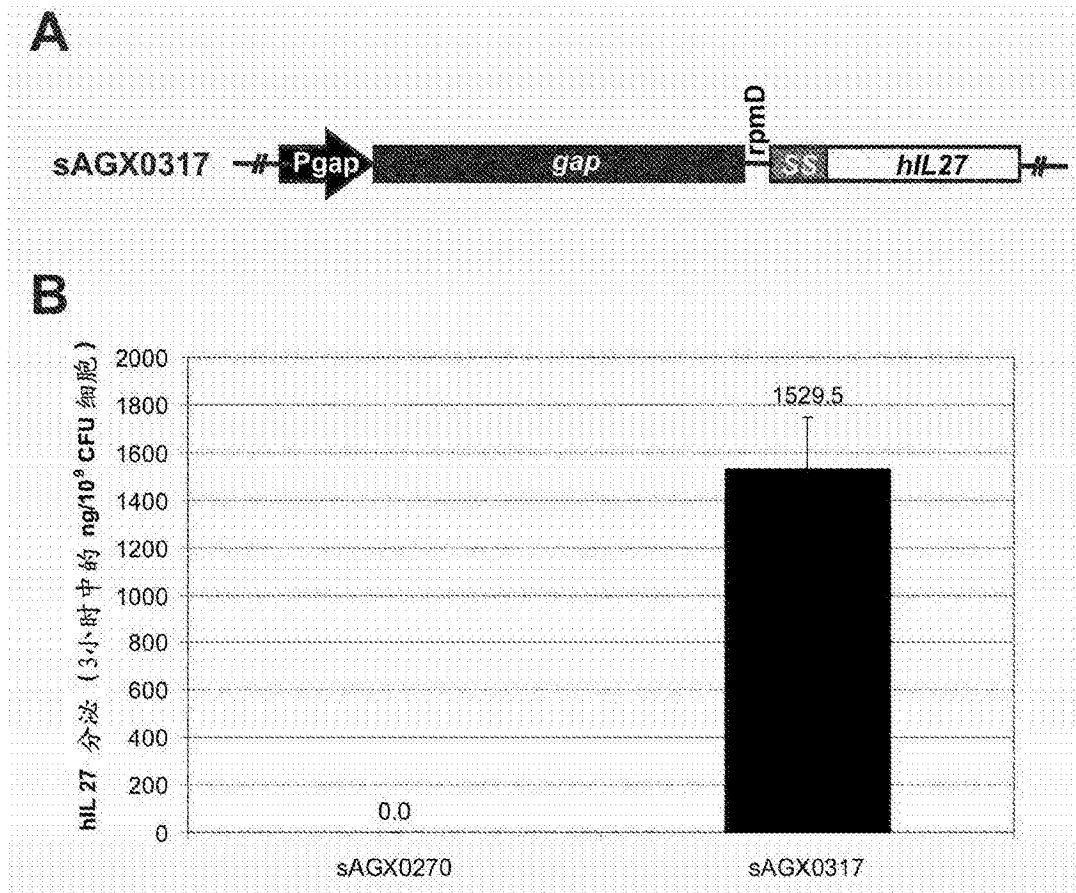


图12

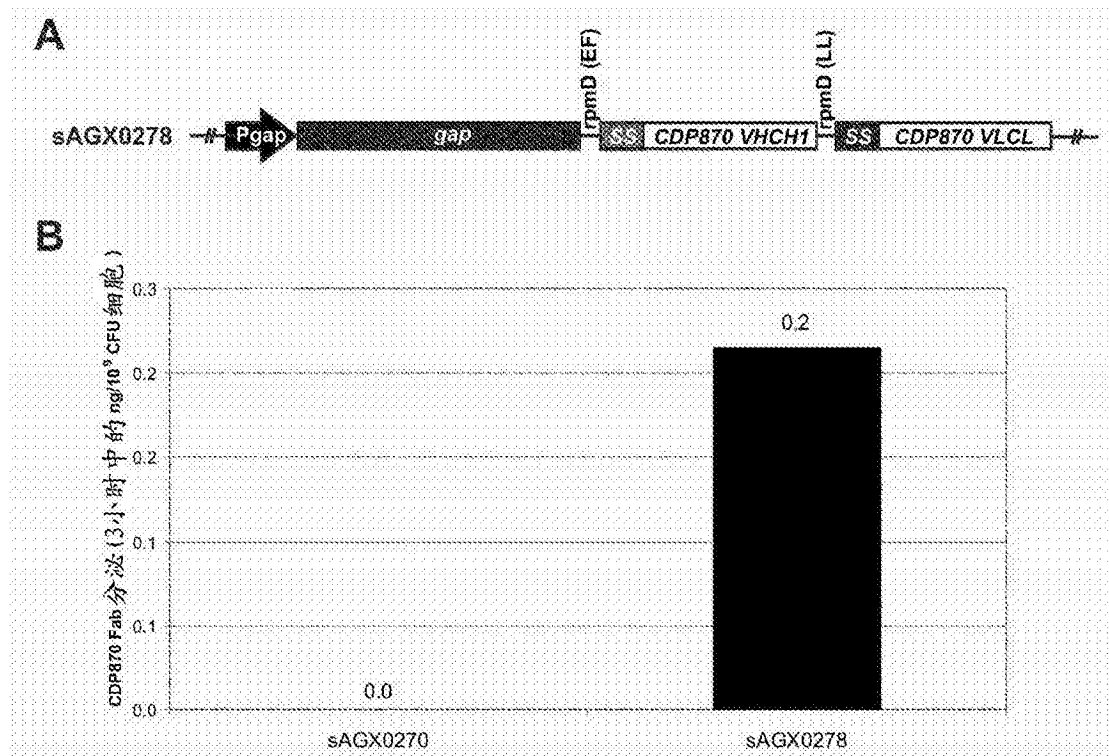


图13

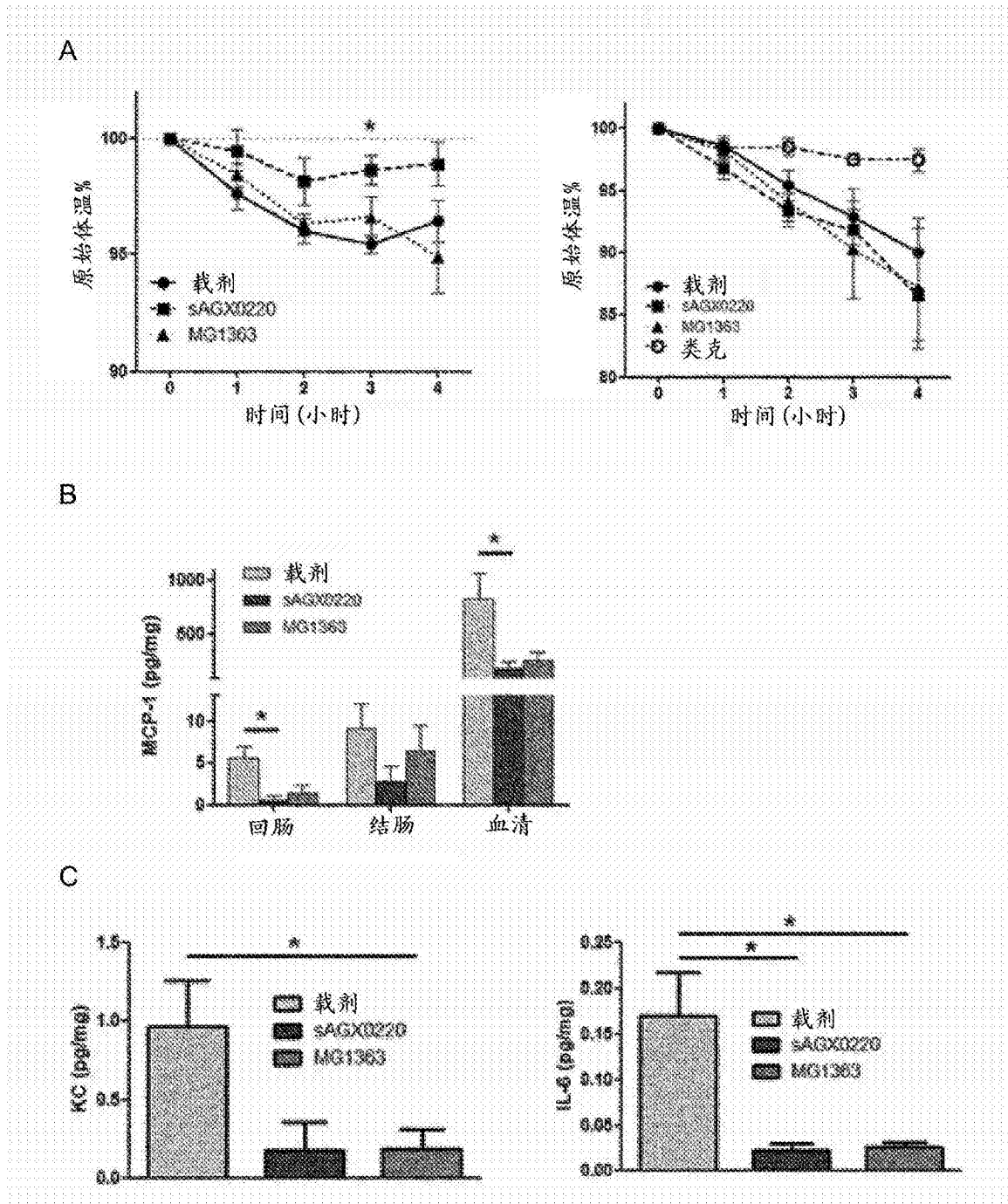


图14

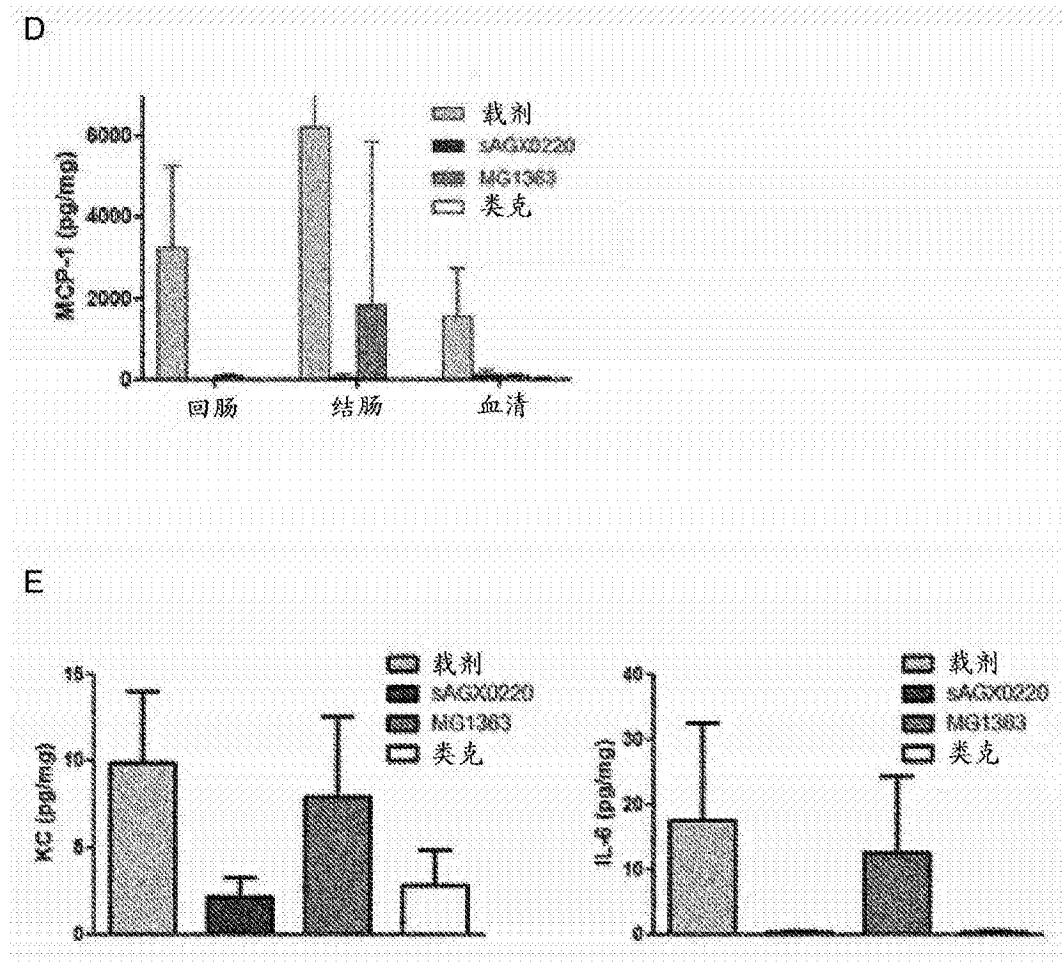


图14 (续)

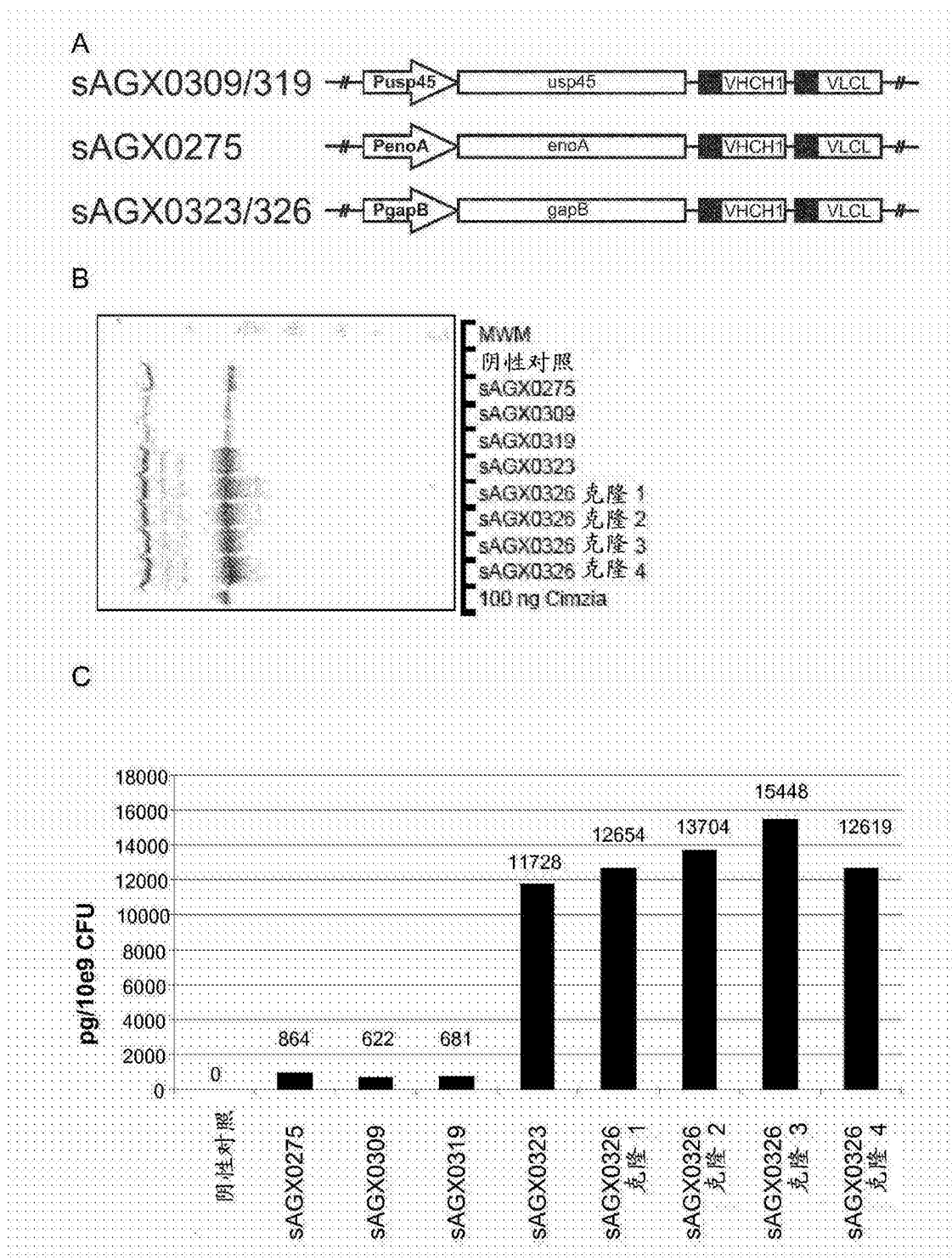


图15

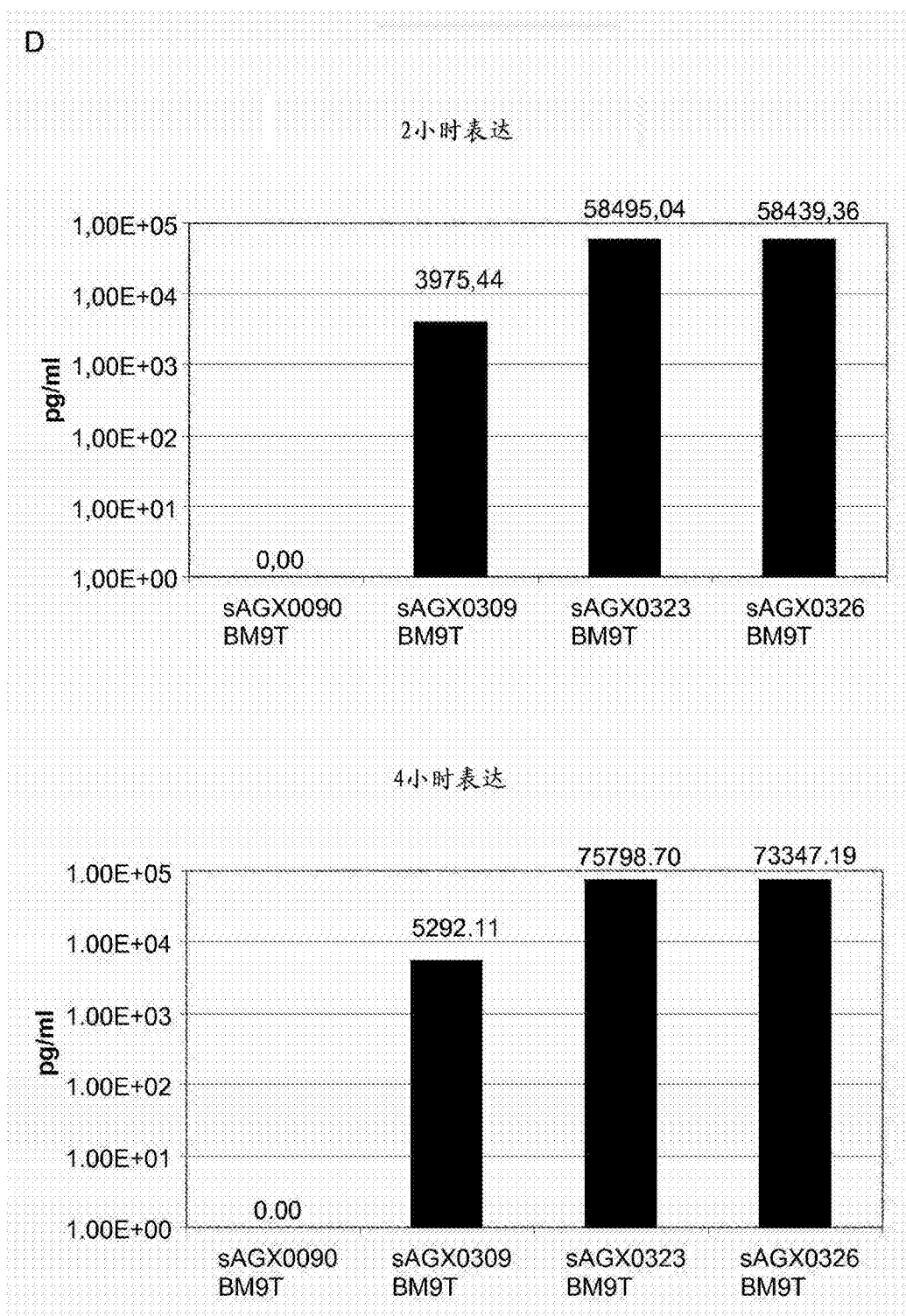


图15 (续)

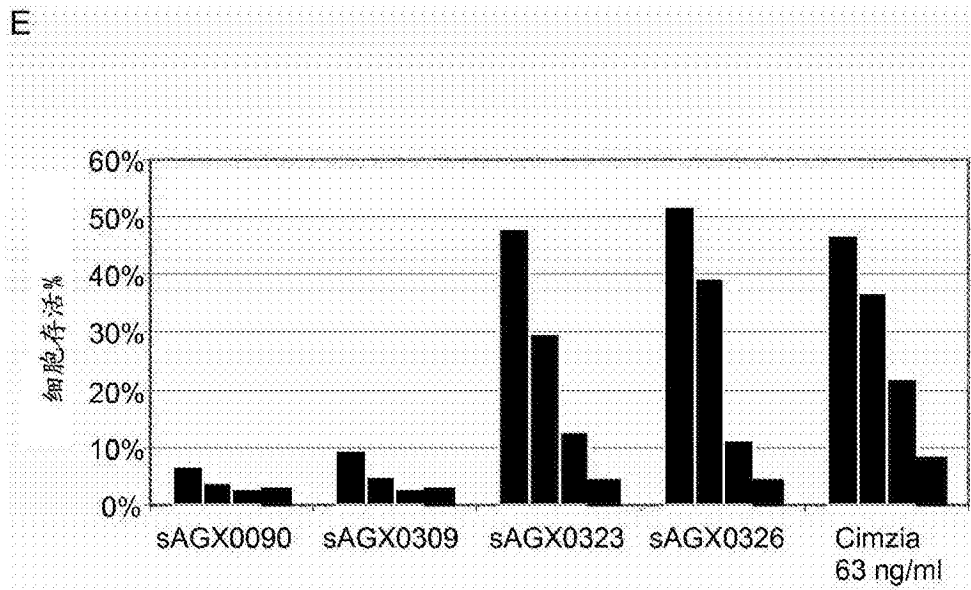


图15 (续)

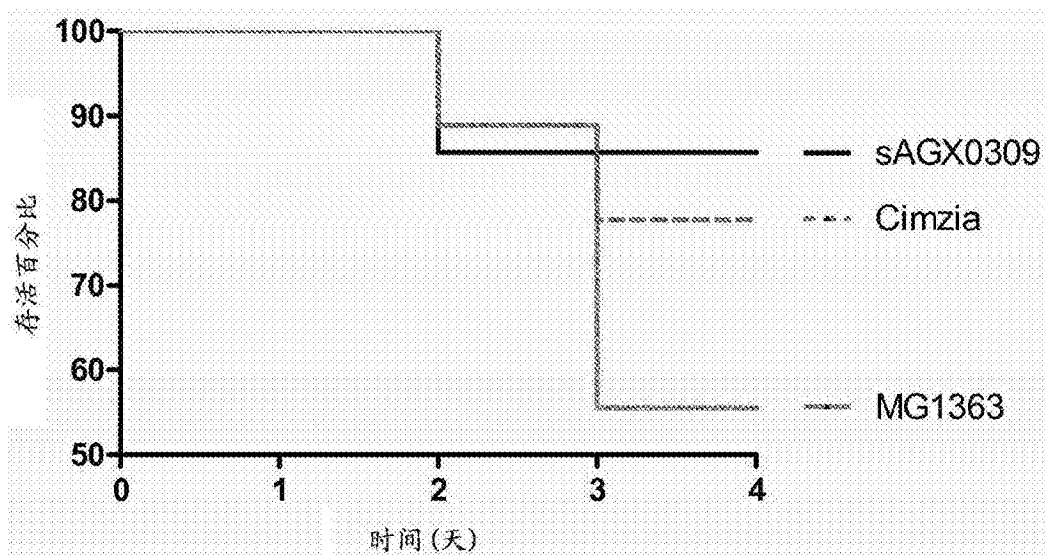


图16

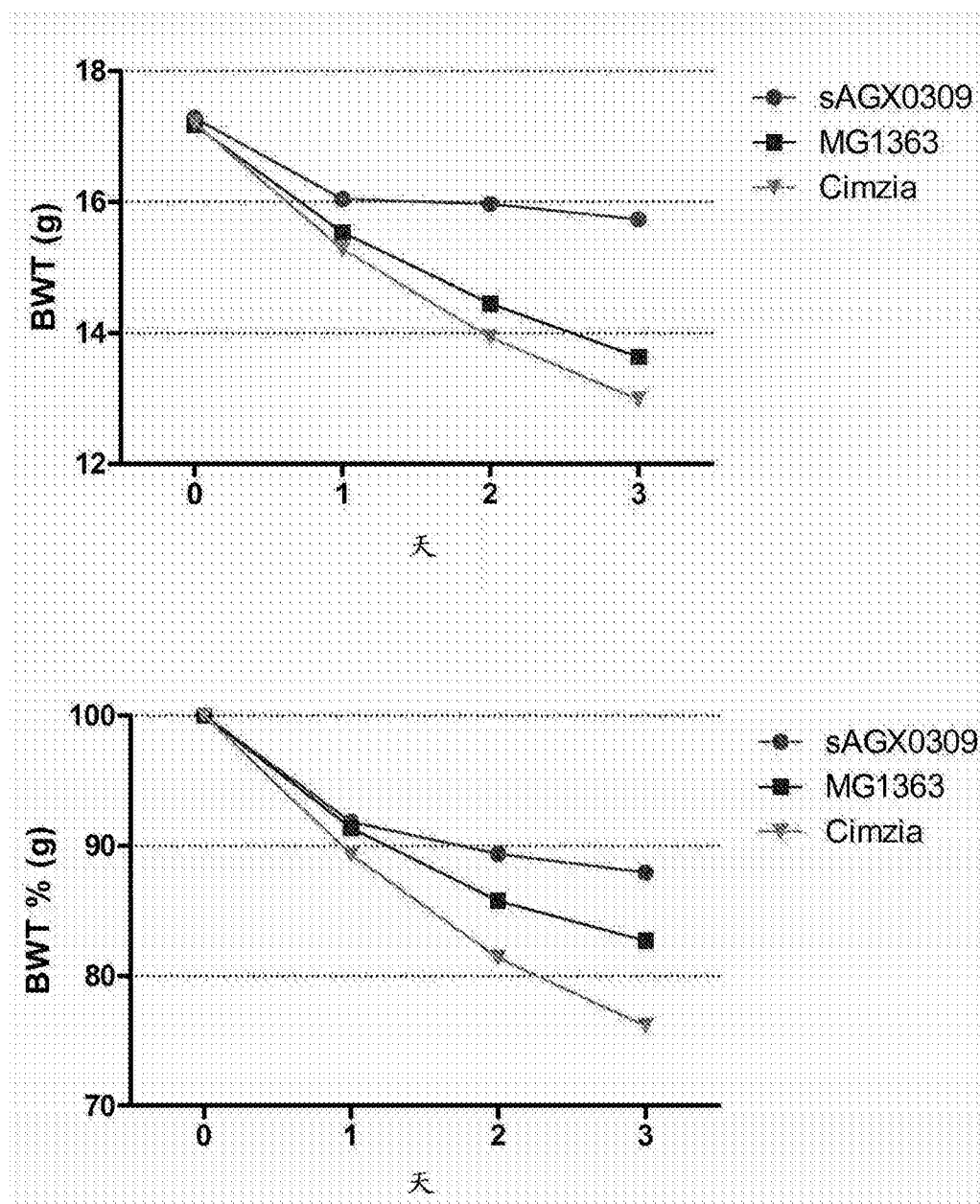


图17

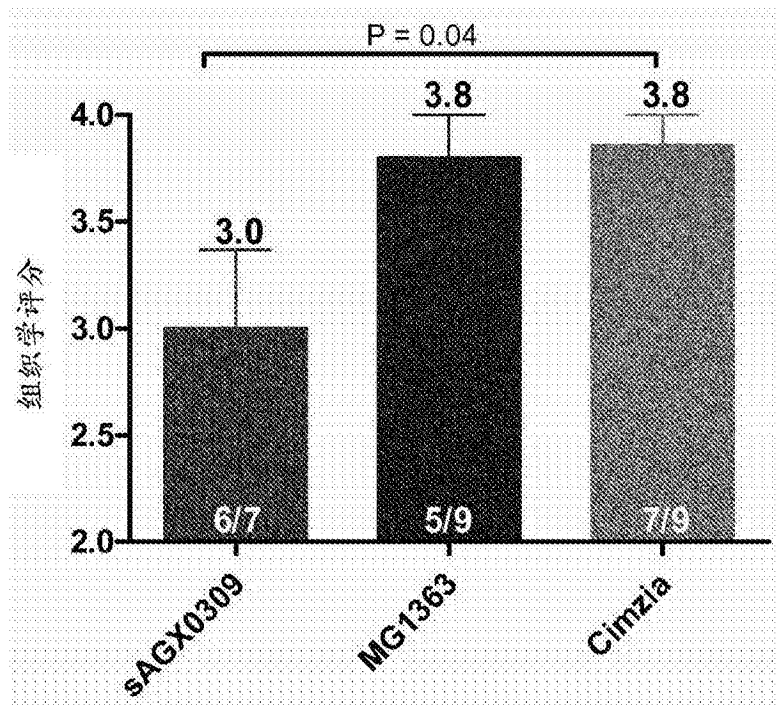


图18

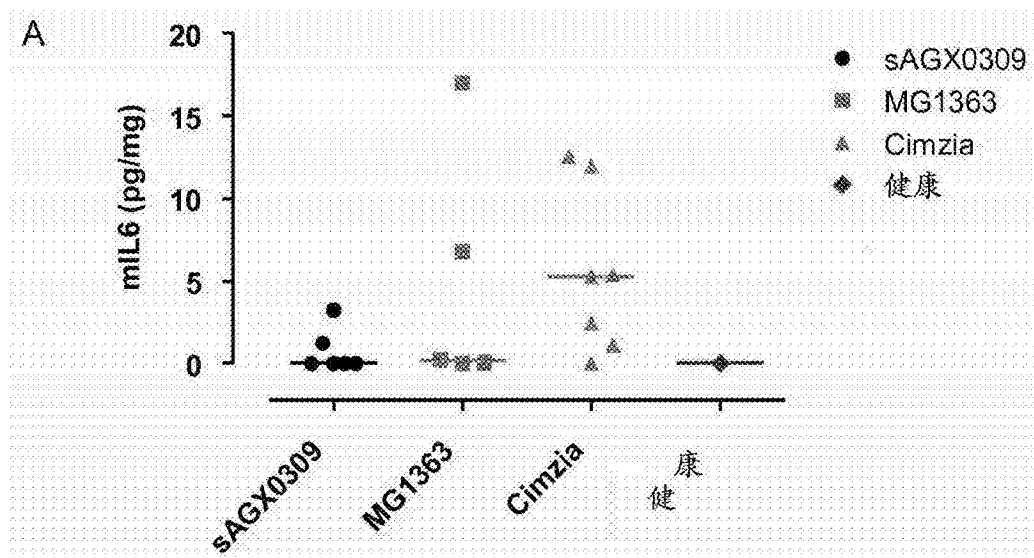


图19

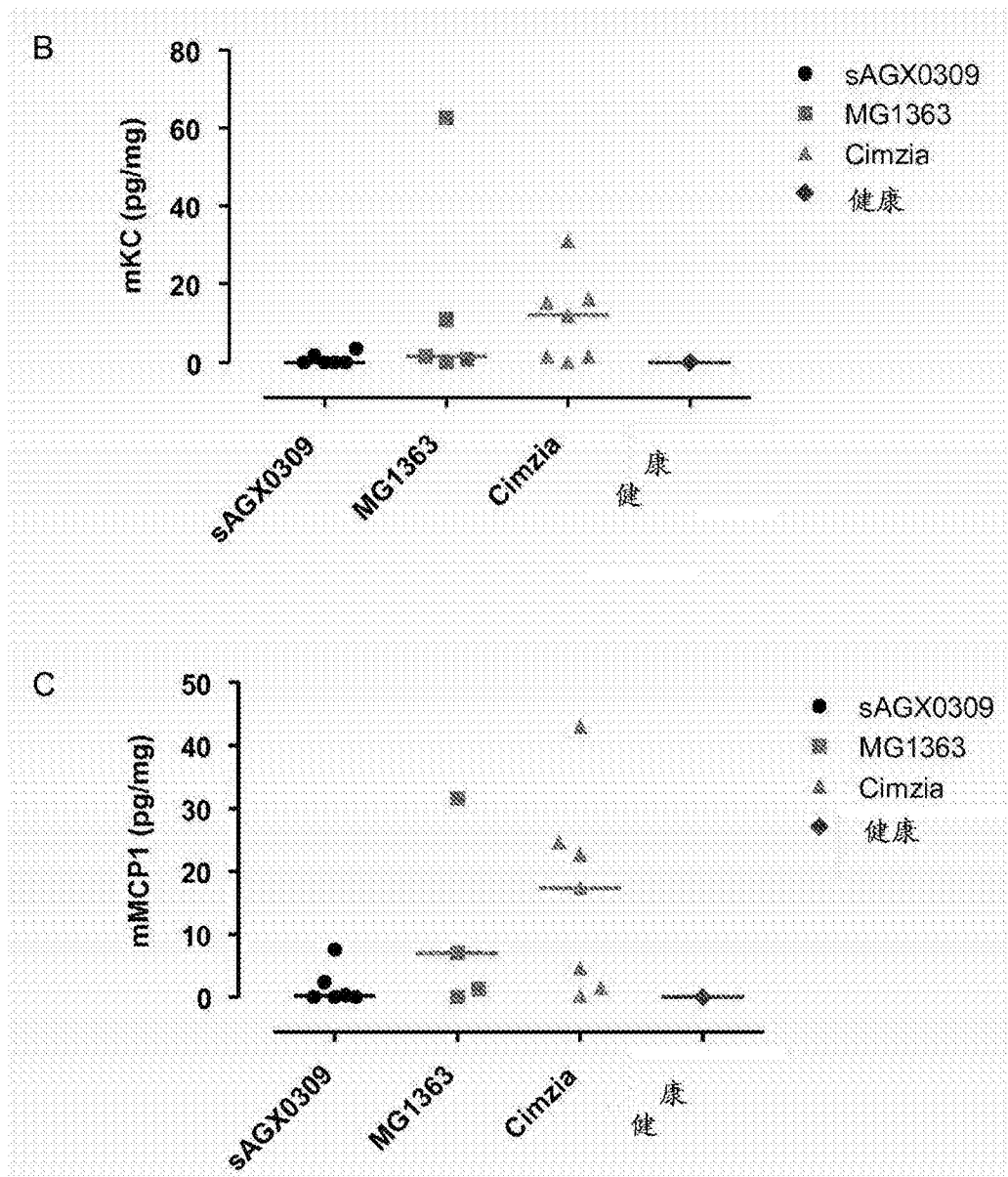


图19(续)