



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 357 372**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/00** (2006.01)      **C12N 15/09** (2006.01)  
**A61K 35/74** (2006.01)      **A61K 38/51** (2006.01)  
**A61K 48/00** (2006.01)      **A61P 35/00** (2006.01)  
**C12N 1/21** (2006.01)      **C07K 14/47** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **09003552 .8**

96 Fecha de presentación : **24.11.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **2088193**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **12.08.2009**

54

Título: **Nuevo vector lanzadera.**

30

Prioridad: **24.11.2004 JP 2004-339677**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**25.04.2011**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**25.04.2011**

73

Titular/es: **ANAEROPHARMA SCIENCE Inc.**  
**2F Yaesu Fuji Building 1-5-3, Yaesu**  
**Chuo-ku, Tokyo 103-0028, JP**

72

Inventor/es: **Kano, Yasunobu;**  
**Hamaji, Yoshinori;**  
**Fujimori, Minoru;**  
**Sasaki, Takayuki;**  
**Kohno, Kyoko;**  
**Amano, Jun y**  
**Taniguchi, Shun'ichiro**

74

Agente: **Curell Aguilá, Marcelino**

ES 2 357 372 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****CAMPO TÉCNICO**

5 La presente invención se refiere a un vector lanzadera para un microorganismo del género *Bifidobacterium* y *Escherichia coli*; a un vector de expresión que puede expresar un gen deseado en un microorganismo del género *Bifidobacterium* mediante la utilización del vector lanzadera; a un microorganismo del género *Bifidobacterium* transformado con el vector de expresión; y a un agente antitumoral que comprende el microorganismo del género *Bifidobacterium* como principio activo.

**ANTECEDENTES DE LA TÉCNICA**

10 La *Bifidobacterium longum* es una bacteria anaerobia Gram-positiva y que presenta un genoma con un gran contenido en GC (véase por ejemplo, el Documento 1 no de patente). Esta *Bifidobacterium longum* no es patógena y constituye la mayor parte de la microflora normal en el intestino delgado de la especie humana y de otros animales (véase por ejemplo, el Documento 2 no de patente). Este microorganismo se dice que tiene propiedades de estimulación de la salud del hospedador tal como el aumento de la inmunorreacción (véase por ejemplo, el Documento 3 no de patente), efecto inhibitor del comienzo del cáncer (véase por ejemplo, el Documento 4 no de patente), la protección del los hospedadores contra la infección vírica (véase por ejemplo, los Documentos 5 y 6 no de patente) y posiblemente de producción de sustancias antibacterianas (véase por ejemplo, el documento 7 no de patente). Algunos microorganismos del género *Bifidobacterium* son muy utilizados mundialmente en la preparación de productos lácteos fermentados.

20 Además, cabe esperar que los plásmidos del género *Bifidobacterium* se apliquen a los vectores probióticos y a los vectores de vacunas bucales contra enfermedades infecciosas. Recientes publicaciones han dado a conocer que la *Bifidobacterium longum* se acumula en el tumor sólido hipóxico después de la administración general (véase por ejemplo, los Documentos 8 y 9 no de patente) y que un plásmido recombinante pBLES100-S-eCD portador de codA de *Escherichia coli* fusionado con un activador hup de *Bifidobacterium longum* expresa la citosina desaminasa en microorganismos (véase por ejemplo, el Documento 1 de patente y los documentos 10 y 11 no de patente). Esto confirmó la teoría de que el *Bifidobacterium longum* recombinante es eficaz para la terapia de enzima-profármaco. Sin embargo, aunque estos plásmidos están atrayendo la atención en los campos de la alimentación, de los productos farmacéuticos y en la industria, sus propiedades genéticas son poco conocidas debido a la falta de un sistema de transferencia génica replicable eficaz.

30 El pBLES100, que se utilizó en la construcción del plásmido pBLES100-S-eCD recombinante, es un vector lanzadera construido a partir del plásmido pTB6 de una DK51 de *Bifidobacterium longum* y el plásmido pBR322 de *Escherichia coli* (véase por ejemplo, el Documento 12 no de patente). Este vector lanzadera pBLES100 transformó la *Bifidobacterium longum* con una eficacia de  $2,2 \times 10^4$  transformantes/ $\mu$ g de ADN y era estable en las células en cuanto a la estructura y segregación de fenotipos (véase por ejemplo, el Documento 13 no de patente). Sin embargo, como el plásmido que presenta ADN inalterado puede escindirarse con una enzima de restricción en el microorganismo durante la transfección, la clonación de un gen extraño requiere gran eficacia de transformación.

Documento 1 de patente: solicitud de patente nº 2002-97144 japonesa abierta al público

Documento 1 no de patente: Scardovi, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology vol 2, eds. Sneath et al., pp. 1418-1434 (1986)

Documento 2 no de patente: Mitsuoka, Elsevier Applied Science, pp 69-114 (1992)

40 Documento 3 no de patente: Yasui et al., J. Dairy Sci., 74, 1187-1195 (1991)

Documento 4 no de patente: Reddy et al., Cancer Res., 53, 3914-3918 (1993)

Documento 5 no de patente: Duffy et al., Pediatr. Res., 35, 690-695 (1994)

Documento 6 no de patente: Saaverdra et al., Lancet., 344, 1046-1049 (1994)

Documento 7 no de patente: Ibrahim et al., J. Food Prot., 56, 713-715 (1993)

45 Documento 8 no de patente: Yazawa et al., Cancer Gene Ther., 7, 269-274 (2000)

Documento 9 no de patente: Yazawa et al., Breast Cancer Res. Treat., 66, 165-170 (2001)

Documento 10 no de patente: Nakamura et al., Biosci. Biotechnol. Biochem., 66, 2362-2366 (2002)

Documento 11 no de patente: Fujimori et al., Curr. Opin. Drug Discov. Devel., 5, 200-203 (2002)

Documento 12 no de patente: Matsumura et al., Biosci. Biotechnol. Biochem., 61, 1211-1212 (1997)

50 Documento 13 no de patente: Matsumura et al., Biosci. Biotechnol. Biochem., 61, 1211-1212 (1997)

**DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN**

[Problema que debe resolver la invención]

Tal como se describió anteriormente, un vector lanzadera pBLES100 para un microorganismo del género *Bifidobacterium* y *Escherichia coli* transformó *Bifidobacterium longum* con una eficiencia de  $2,2 \times 10^4$  transformantes/ $\mu$ g de ADN y resultaba estable en las células en cuanto a la estructura y segregación de fenotipos. Sin embargo, como el plásmido que tiene ADN inalterado puede escindirse con una enzima de restricción en el microorganismo durante la transfección, la clonación de un gen extraño requiere mayor eficacia de transformación. El objetivo de la presente invención consiste en proporcionar un vector lanzadera para un microorganismo del género *Bifidobacterium* y *Escherichia coli* con una amplia gama de hospedadores y un número grande de copias en los microorganismos del género *Bifidobacterium* y que puede expresar en gran medida una proteína deseada en un microorganismo del género *Bifidobacterium* cuando se utiliza como vector de expresión; un vector de expresión que puede expresar un gen deseado en un microorganismo del género *Bifidobacterium* mediante la utilización del vector lanzadera; un microorganismo del género *Bifidobacterium* transformado con el vector de expresión; y un agente antitumoral que comprende el microorganismo del género *Bifidobacterium* como principio activo.

[Medios para resolver los problemas]

Se determinó la secuencia completa (3624 pb; SEC. ID. nº 1) de un plásmido pTB6 procedente de BK51 de *Bifidobacterium longum* e identificaron algunas secuencias génicas de este microorganismo del género *Bifidobacterium* que incluyen el origen de replicación OriV del plásmido. Se observó que OriV es una secuencia de 358 pb que contiene dso y sso, y que un fragmento procedente del pTB6 de aproximadamente 1900 pb en toda su longitud que contiene una proteína de replicación (RepB, 693 pb) está disponible como "unidad de replicación de un microorganismo del género *Bifidobacterium*". La capacidad de replicación no se confirmó para una unidad que contenía OriV y una parte de RepB. Se completó la presente invención observando que la expresión de un producto para la expresión de un gen de resistencia a la ampicilina que actúa como marcador selectivo, particularmente la expresión de la región N terminal del mismo, es desfavorable en cuanto a la expansión de una gama de hospedadores en los microorganismos del género *Bifidobacterium*.

Es decir, la presente invención se refiere a (1) un vector lanzadera para un microorganismo del género *Bifidobacterium* y *Escherichia coli* caracterizado porque comprende una parte de la región procedente de pTB6 que comprende una región (oriV)-repB origen de replicación de pTb6 pero que no comprende las regiones MembB, MobA, Orf1 y oriT de pTB6 y una parte del plásmido procedente de *Escherichia coli* que comprende una región origen (ori) de replicación de *Escherichia coli*; (2) el vector lanzadera para un microorganismo del género *Bifidobacterium* y *Escherichia coli* según (1), en el que la parte de la región procedente del pTB6 consiste en una parte de la región procedente de TB6 que comprende una secuencia nucleotídica de 1260 pb constituida por una secuencia nucleotídica representada por los nucleótidos 305 al 1564 en la SEC. ID. nº 1; (3) vector lanzadera para un microorganismo del género *Bifidobacterium* y *Escherichia coli* según (1) ó (2), en el que la parte del plásmido procedente de *Escherichia coli* que comprende una región origen (ori) de replicación es una parte del plásmido que no comprende un gen de resistencia a la ampicilina (ampR) o que tiene ADN suprimido que codifica una región con terminal N de producto de expresión  $\beta$ -lactamasa del gen de resistencia a la ampicilina (ampR); (4) el vector lanzadera para un microorganismo del género *Bifidobacterium* y *Escherichia coli* según cualquiera de los apartados (1) a (3), en el que el microorganismo del género *Bifidobacterium* es *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium bifidum* o *Bifidobacterium adolescentis*; (5) vector lanzadera para un microorganismo del género *Bifidobacterium* y *Escherichia coli* según cualquiera de los apartados (1) a (4), en el que el vector lanzadera presenta un número medio de copias de 6 a 30; (6) vector lanzadera para un microorganismo del género *Bifidobacterium* y *Escherichia coli* según cualquiera de los apartados (1) a (5), en el que el vector lanzadera es pAV001; (7) vector de expresión que puede expresar un gen deseado en un microorganismo del género *Bifidobacterium*, que comprende el vector lanzadera para un microorganismo del género *Bifidobacterium* y *Escherichia coli* según cualquiera de los apartados (1) a (6), en el que se inserta una unidad de expresión del gen deseado ligada en el marco entre un activador y un terminador implicados en la expresión de un gen procedente de *Bifidobacterium longum* que codifica una proteína de unión al ADN (proteína HU) similar a la histona; (8) vector de expresión según el apartado (7), en el que el gen deseado es un gen de la citosina desaminasa; (9) microorganismo del género *Bifidobacterium* transformado con un vector de expresión según el apartado (7) ó (8); (10) agente antitumoral que comprende el microorganismo del género *Bifidobacterium* según el apartado (9) como principio activo; (11) unidad de replicación del plásmido procedente de pTB6 de un microorganismo del género *Bifidobacterium* que comprende una región (oriV)-repB origen de replicación de pTB6 pero que no comprende las regiones MembB, MobA, Orf1 y oriT de pTB6; y (12) la unidad de replicación de plásmido procedente del pTB6 de un microorganismo del género *Bifidobacterium* según la reivindicación 11, que comprende una secuencia nucleotídica de 1260 pb constituida por una secuencia nucleotídica representada por los nucleótidos 305 a 1564 en la SEC. ID. nº 1.

Otros aspectos de la presente invención se resumen en los párrafos numerados siguientes:

1. Vector lanzadera para un microorganismo del género *Bifidobacterium* y *Escherichia coli* que comprende una parte de la región procedente del pTb6 que comprende una región del pTB6 origen de replicación (oriV)-repB pero que no comprende las regiones MembB, MobA, Orf1 y oriT del pTB6 y

una parte del plásmido procedente de *Escherichia coli* que comprende una región del origen de replicación (oriC) de *Escherichia coli*.

- 5 2. Vector lanzadera para un microorganismo del género *Bifidobacterium* y *Escherichia coli* según el párrafo 1, en el que la parte de la región procedente del pTB6 está constituida por una parte de la región procedente del pTb6 que comprende una secuencia nucleotídica de 1260 pb constituida por una secuencia nucleotídica representada por los nucleótidos 305 a 1564 en la SEC. ID. nº 1.
- 10 3. Vector lanzadera para un microorganismo del género *Bifidobacterium* y *Escherichia coli* según el párrafo 1 ó 2, en el que la parte del plásmido procedente de *Escherichia coli* es una parte del plásmido que no comprende un gen de resistencia a ampicilina (ampR) o que tiene ADN suprimido que codifica una región con terminal N de un producto  $\beta$ -lactamasa para la expresión del gen de resistencia a la ampicilina (ampR).
- 15 4. Vector lanzadera para un microorganismo del género *Bifidobacterium* y *Escherichia coli* según cualquiera de los párrafos 1 a 3, en el que el microorganismo del género *Bifidobacterium* es *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium bifidum* o *Bifidobacterium adolescentis*.
- 20 5. Vector lanzadera para un microorganismo del género *Bifidobacterium* y *Escherichia coli* según cualquiera de los párrafos 1 a 4, en el que el vector lanzadera tiene un número de copias medio de 6 a 30.
- 25 6. Vector lanzadera para un microorganismo del género *Bifidobacterium* y *Escherichia coli* según cualquiera de los párrafos 1 a 5, en el que el vector lanzadera es pAV001.
7. Vector de expresión que puede expresar un gen deseado en un microorganismo del género *Bifidobacterium*, que comprende el vector lanzadera para un microorganismo del género *Bifidobacterium* y *Escherichia coli* según cualquiera de los párrafos 1 a 6, en el que se inserta una unidad de expresión del gen deseado ligado en el marco entre un activador y un terminador implicados en la expresión de un gen procedente de *Bifidobacterium longum* que codifica una proteína de unión al ADN similar a una histona (proteína HU).
- 30 8. Vector de expresión según el párrafo 7, en el que el gen deseado es un gen de la citosina desaminasa.
- 35 9. Microorganismo del género *Bifidobacterium* transformado con el vector de expresión según el párrafo 7 u 8.
10. Agente antitumoral que comprende el microorganismo del género *Bifidobacterium* según el párrafo 9 como principio activo.
11. Unidad de replicación del plásmido procedente de pTB6 de un microorganismo del género *Bifidobacterium* que comprende una región repB del origen de replicación (oriV) de pTB6 pero que no comprende las regiones MembB, MobA, OrfI y oriT de pTB6.
12. Unidad de replicación del plásmido procedente de pTB6 del microorganismo del género *Bifidobacterium* según el párrafo 11, que comprende la secuencia nucleotídica de 1260 pb constituida por una secuencia nucleotídica representada por los nucleótidos 305 a 1564 en la SEC. ID. nº 1.

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

[Fig. 1]

La figura 1 es un diagrama que presenta una cartografía lineal de un plásmido pTB6 (3624 pb) y la estructura de oriV. figura 1(a) representa las supuestas RepB, MembB, MobA, y una supuesta proteína OrfI. Las flechas indican la dirección de transporte y las cifras indican la posición de los nucleótidos. La figura 1(b) representa esquemáticamente dos series de IR (305 a 417) en sso y 1 serie de IR (481 a 504) y 4 unidades repetidas (indicadas por los triángulos) (577 a 664) en dso situada en oriV. El diagrama está indicado sin referencia a escala.

[Fig. 2]

La figura 2 es un diagrama que representa las secuencias en RepB y oriT. Las secuencias (a) de aminoácidos de la región 1 y de la región 2 en RepB y las secuencias de nucleótidos DR (b) e IR(c) en oriV están indicadas en el diagrama. Las cifras superiores a la secuencia indican la posición de aminoácidos en RepB predicha de pTB6, y las cifras por encima de la línea de puntos indican el número de aminoácidos en las regiones. La posición (nuc) del nucleótido en la figura 2(b) indica el locus génico de DR, y las secuencias nucleotídicas de las unidades repetidas están ordenadas. La posición (nuc) del nucleótido en la figura 2(c) indica el locus génico de IR, y sus secuencias están ordenadas. Los rectángulos con puntos superpuestos representan las regiones conservadas de los aminoácidos o los nucleótidos.

[Fig. 3]

La figura 3 es un diagrama que presenta una secuencia de aminoácidos en MobA y una secuencia nucleotídica en oriV. En la figura 3(a), las secuencias parciales de aminoácidos (aminoácidos 1 a 27 y 121 a 145) de MobA de pTB6 y las secuencias parciales de aminoácidos (aminoácidos 1 a 27 y 108 a 131) de un plásmido RSF1010 en línea con MOB $\sigma$  (depósito n<sup>o</sup> M28829) están ordenadas. El símbolo \* indica un Tyr activo asociado a la actividad de rayado-cierre del ADN en el motivo I y del motivo 3H en el motivo III. En la figura 3(b), la secuencia nucleotídica de los nucleótidos 3454 a 3510 del supuesto oriV del pTB6 y la secuencia nucleotídica en la posición 3169 a 3132 de oriT de RSF1010 están ordenadas. Las flechas indican la IR característica, y la cabeza de flecha indica un punto de rayado (nic) por MobA de RSF1010. Las cifras por encima y por debajo de las secuencias indican la posición del aminoácido de MobA o la posición de los nucleótidos de pTB6. Las regiones indicadas por los rectángulos rellenos con puntos indican secuencias nucleotídicas homólogas con los aminoácidos emparejados.

[Fig. 4]

La figura 4 es un diagrama que representa las cartografías lineales de plásmidos reconstituidos. El fragmento PstI-FspI del pTB6 (nucleótidos 1 a 1872) se insertó en la zona PstI-FspII del pUC18 para obtener un plásmido compuesto. El fragmento HincII-HindIII de 1,6 kpb que contenía spc de pBLES100 se ligó con el fragmento HindIII-SspI (4,0 kpb) y el fragmento HindIII-FspI (3,4 kpb) del plásmido compuesto para obtener pBRASTA100 (5,6 kpb) y pBRASTA101 (5,0 kpb), respectivamente. El fragmento SspI-FspI de 0,6 kpb (indicado por el rectángulo con un subrayado corto y una línea sombreada) de pUC18 se insertó en la zona BamHI y en las zonas BamHI y HindIII de pBRASTA101 para obtener pBRASTA102 (5,6 kpb) y pBRASTA103 (6,2 kpb), respectivamente. Se construyó un plásmido pSS030Sp (5,4 kpb) por el mismo procedimiento que en la construcción pBRASTA100 excepto que el fragmento de ADN PstI-FspI (nucleótidos 1873 a 3624) de pTB6 en lugar del fragmento de ADN PstI-FspI (nucleótidos 1 a 1872) se insertó en la zona PstI-HincII del pUC18. El fragmento AatII-EcoRV que contiene spc (1,3 kpb) de pBLES100 se ligó a un fragmento AatII-FspI de molécula recombinante (1,4 kpb) construido insertando el fragmento de ADN (nucleótidos 472 a 1872) del pTB6 en la zona AatII-HincII del pUC18, para construir un plásmido pDS044Sp (4,3 kpb). Los rectángulos con una línea de sombreado indican sso y dso. El diagrama se indica sin referencia a la escala.

[Fig. 5]

La figura 5 es un diagrama que presenta el proceso de producción de *Bifidobacterium longum*::pAV001-HU-eCD y *Bifidobacterium longum*::pBLES100-S-eCD.

[Fig. 6]

La figura 6 es un diagrama que representa el resultado de comparación del nivel de expresión de una proteína citosina desaminasa en *Bifidobacterium longum*. El diagrama demuestra que la proteína citosina desaminasa es expresada 2 a 8 veces por *Bifidobacterium longum*::pAV001-HU-eCD en comparación con la expresada por *Bifidobacterium longum*::pBLES100-S-eCD.

[Fig. 7]

La figura 7 es un diagrama que representa un desplazamiento temporal en los recuentos bacterianos obtenido como resultado de comparación de la actividad enzimática de la proteína citosina desaminasa (comparación de la actividad de conversión 5FC a 5FU) en *Bifidobacterium longum*.

[Fig. 8]

La figura 8 es un diagrama que representa una concentración de 5-FU obtenida como resultado de comparación de la actividad enzimática de la proteína citosina desaminasa (comparación de la actividad de conversión 5FC a 5FU) en *Bifidobacterium longum*.

[Fig. 9]

La figura 9A es un diagrama que representa el resultado del análisis Southern, después de cultivar *Bifidobacterium longum*::pAV001-HU-eCD y *Bifidobacterium longum*::pBLES100-S-eCD, digiriendo los ADN extraídos de las células bacterianas respectivas con una enzima de restricción y separando los ácidos nucleicos por electroforesis en gel de agarosa para someter a análisis Southern utilizando reactivos de marcado directo AlkPhos (Amersham Bioscience). La figura 9B es un diagrama que representa el resultado de comparación de los números de copias del plásmido de *Bifidobacterium longum*::pAV001-HU-eCD y *Bifidobacterium longum*::pBLES100-S-eCD basado en la intensidad de señal.

### **MEJOR MODO DE PONER EN PRÁCTICA LA INVENCION**

Un vector lanzadera para un microorganismo del género *Bifidobacterium* y *Escherichia coli* de la presente invención no está particularmente limitado con tal que sea un vector lanzadera que comprende una parte de la región derivada de pTB6 que comprende un origen de replicación (oriV; los nucleótidos 305 a 664 en la secuencia nucleotídica representada por la SEC. ID. n<sup>o</sup> 1)-repB (nucleótidos 872 a 1564 en la secuencia nucleotídica representada por la SEC. ID. n<sup>o</sup> 1) región de pTB6 pero que no comprende MemBB (nucleótidos 1543 a 2355 en la

5 secuencia nucleotídica representada por la SEC. ID. nº 1), MobA (nucleótidos 2212 a 3300 en la secuencia nucleotídica representada por la ID. nº 1), OrfI (nucleótidos 3587 a 517 en la secuencia nucleotídica representada por la SEC. ID. nº 1) y oriT (nucleótidos 3454 a 3510 en la secuencia nucleotídica representada por la SEC. ID. nº 1) regiones de pTB6 y una parte del plásmido derivado de *Escherichia coli* que comprende una región del origen (ori) de replicación de. Sin embargo, una unidad de replicación que comprende una secuencia nucleotídica de 1260 pb constituida por una secuencia nucleotídica representada por los nucleótidos 305 a 1564 en la la SEC. ID. nº 1, por ejemplo, una unidad de replicación mínima de 1260 pb constituida por una secuencia nucleotídica representada por los nucleótidos 305 a 1564 en la SEC. ID. nº 1, una unidad de replicación de 1900 pb constituida por una secuencia de nucleótidos representada por los nucleótidos 1 a 1900 en la SEC. ID. nº 1 y una unidad de replicación máxima de 2355 pb constituida por una secuencia nucleotídica representada por los nucleótidos 1 a 2355 en la SEC. ID. nº 1, resultan preferidos. Por tanto, utilizando una unidad de replicación más pequeña sin las regiones MemB, MobA, OrfI y oriT, puede aumentarse el número de copias en las células hospedadoras. Resulta preferido que el vector lanzadera tenga un número de copias superior al de un vector lanzadera pBLES100 para *Bifidobacterium longum* y *Escherichia coli* que puede construirse por el procedimiento descrito en *Biosci. Biotech. Biochem.*, 61, 1211 (1997), y tiene un número medio de copias aumentado, por ejemplo, de 3 a 30, particularmente preferentemente 6 a 30.

20 En el vector lanzadera de la presente invención, resulta preferido que la parte del plásmido procedente de *Escherichia coli* que comprende una región de origen (ori) de replicación de *Escherichia coli* no comprenda un gen de resistencia a ampicilina (ampR) o, si existe, resulta preferido que se suprima una parte en la que el ADN que codifica la región del terminal N de su producto de expresión  $\beta$ -lactamasa. La expresión de carece de la región N-terminal de la  $\beta$ -lactamasa permite la expansión de un intervalo de hospedador en los microorganismos del género *Bifidobacterium*.

25 En el vector lanzadera de la presente invención, el microorganismo del género *Bifidobacterium* puede estar representado concretamente por *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium adolescents*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium animalis* y *Bifidobacterium bifidum*. En cambio, no está confirmada la replicación del vector lanzadera pBLES100 en otros microorganismos del género *Bifidobacterium* aparte de *Bifidobacterium longum*.

El vector lanzadera de la presente invención puede estar representado preferentemente por el vector lanzadera pAV001 descrito en el ejemplo 2.

30 Una unidad de replicación del plásmido derivado del pTB6 de un microorganismo del género *Bifidobacterium* de la presente invención no está particularmente limitada siempre que sea una parte de la región derivada del pTB6 que comprende un origen de replicación (oriV; nucleótidos 305 a 664 en la secuencia nucleotídica representada por SEC. ID. nº 1)- la región repB (nucleótidos 872 a 1564 en la secuencia nucleotídica representada por SEC. ID. nº 1) del pTB6 pero que no comprende MemB (nucleótidos 1543 a 2355 en la secuencia nucleotídica representada por SEC. ID. nº 1), MobA (nucleótidos 2212 a 3300 en la secuencia nucleotídica representada por SEC. ID. nº 1), OrfI (nucleótidos 3587 a 517 en la secuencia nucleotídica representada por SEC. ID. nº 1) y las regiones OriT (nucleótidos 3454 a 3510 en la secuencia nucleotídica representada por SEC. ID. nº 1) de pTB6. La unidad de replicación de plásmido puede estar ilustrada preferentemente por una unidad de replicación que comprende una secuencia nucleotídica de 1260 pb constituida por secuencia nucleotídica representada por los nucleótidos 305 a 1564 en la SEC. ID. nº 1, por ejemplo, una unidad de replicación mínima de 1260 pb constituida por una secuencia nucleotídica representada por los nucleótidos 305 a 1564 en la SEC. ID. nº 1, una unidad de replicación formada por una secuencia nucleotídica representada por los nucleótidos 1 a 1900 en la SEC. ID. nº 1 y una unidad de replicación máxima de 2355 pb formada por una secuencia nucleotídica representada por los nucleótidos 1 a 2355 en la SEC. ID. nº 1.

45 Un vector de expresión de la presente invención que puede expresar un gen deseado en un microorganismo del género *Bifidobacterium* no está particularmente limitado con tal que sea un vector que comprende el vector lanzadera para un microorganismo del género *Bifidobacterium* y *Escherichia coli* de la presente invención en el que se inserta una unidad de expresión del gen deseado ligado en el marco entre un activador y un terminador implicado en la expresión del gen derivado de *Bifidobacterium longum* que codifica una proteína de enlace al ADN (proteína HU) similar a la histona. El gen deseado no está particularmente limitado y puede ser ilustrado preferentemente por un gen que codifica una citocina o un inhibidor angiogénico con actividad antitumoral y un gen que codifica una enzima que puede convertir un precursor de la sustancia antitumoral poco tóxico en una sustancia antitumoral (en adelante abreviado como enzima conversora).

50 El activador y el terminador en la unidad de expresión pueden preferentemente estar ilustrados por un ADN representado por los nucleótidos 1 a 192 y un ADN representado por los nucleótidos 472 a 600, respectivamente, en la secuencia nucleotídica que puede estar representada por la SEC. ID. nº 2. El vector de expresión que presenta el activador y el terminados implicados en la expresión de un gen HU puede prepararse escindiendo un gen HU con una enzima de restricción procedente del ADN de *Bifidobacterium longum*, incorporando a continuación el gen HU en un vector de clonación, e incorporando además el gen deseado corriente abajo del activador implicado en la expresión del gen HU. El gen deseado puede expresarse de manera eficaz utilizando el activador y el terminador implicados en la expresión del gen HU. Los ejemplos de un procedimiento para aislar el gen HU incluyen un procedimiento que digiere el ADN cromosómico de *Bifidobacterium longum* con la enzima de restricción HindIII. Para ser más específico, el ADN cromosómico de *Bifidobacterium longum* se digiere en primer lugar con una enzima de restricción HindIII y a continuación se purifica mediante tratamiento con fenol y precipitación en

5 etanol. Por otra parte, pBR322 (TAKARA SHUZO) se digiere también con HindIII y se somete a tratamiento de  
 10 desfosforilación seguido de la purificación de la misma manera. Los ADN respectivos se ligan para obtener ADN  
 15 recombinante. A continuación el ADN recombinante se utiliza para transformar mH3 de *Escherichia coli* (*Gene*, 45,  
 37 (1986)) según un método convencional para obtener un transformante que presenta resistencia a la ampicilina y  
 20 sensibilidad a la tetraciclina. El ADN plásmido se extrae del transformante obtenido según un procedimiento  
 convencional y se introduce en una cepa YK2741 de *Escherichia coli* (*Gene*, 89, 133 (1990)) según un  
 procedimiento convencional para transformar la cepa bacteriana. La cepa YK2741, que tiene los genes para HU e  
 IHF (factor de hospedador de integración) suprimidos, presenta sensibilidad al frío, y con esta propiedad el  
 transformante se selecciona colocando en placas en medio agar-agar que contiene ampicilina y cultivando a 27°C.  
 Posteriormente, el transformante de la cepa YK2741 obtenido de este modo se cultiva más y el plásmido retenido  
 en la cepa se extrae según un procedimiento convencional y se introduce en YK1340 de *Escherichia coli* (*J. Mol.*  
*Biol.*, 204, 581 (1988)) según un procedimiento convencional para transformar la cepa bacteriana. El transformante  
 obtenido se somete a una prueba de infección con el fago Mu según un procedimiento convencional. La cepa  
 YK1340 es una cepa con los genes HU suprimidos, y como la proliferación del fago Mu requiere proteínas HU, un  
 transformante que es lisado por infección y proliferación del fago Mu puede ser un potente candidato de una cepa  
 que lleva el gen para HU procedente de *Bifidobacterium longum*. Por tanto, el plásmido pBLHU15 que tiene el  
 activador y el terminador implicados en la expresión del gen HU derivado de *Bifidobacterium longum* puede  
 obtenerse seleccionando un plásmido conservado en la cepa que presenta resistencia a la ampicilina y es lisado  
 por infección y proliferación del fago Mu. Además, una zona desarrollada utilizando NsvV y HpaI resulta preferida  
 como zona de introducción del gen deseado.

Para el gen que codifica un citocina con actividad antitumoral, los ejemplos incluyen interferón (IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ ,  
 IFN- $\gamma$ , factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), interleucina (IL)-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-  
 3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-18, IL-27, factor de necrosis tumoral (TNF)- $\alpha$ , linfotóxina (LT)- $\beta$ , factor  
 25 estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), factor  
 inhibidor de la migración de micrófagos (MIF), factor inhibidor de leucemia (LIF), factores coestimuladores B7  
 (CD80) y B7-2 (CD86) para la activación de linfocitos T, kit ligando y oncostatina M. Específicamente, es preferible  
 la IL-2. Alternativamente, estas citocinas pueden utilizarse en combinación de dos o más de ellas, y, por ejemplo, la  
 combinación de IL-6 con TNF- $\alpha$ , IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$  o IFN- $\gamma$ , la combinación de TNF- $\alpha$  con IFN- $\gamma$  y la combinación de  
 30 antiFas con IFN- $\gamma$  son preferibles. Los inhibidores angiogénicos tales como endostatina, angiostatina, rosquilla 1,  
 rosquilla 2, rosquilla 3, rosquilla 4, rosquilla 5 y NK4 pueden utilizarse de manera ventajosa como sustancias que  
 presentan otra actividad antitumoral aparte de la citocina.

Los ejemplos del gen que codifica una enzima conversora incluyen: una combinación de 5-fluorocitosina  
 (5-FC) como precursor de la sustancia antitumoral, 5-fluorouracilo (5-FU) como sustancia antitumoral y citosina  
 35 desaminasa como enzima conversora; una combinación de 5-aziridino-2,4-dinitrobenzamida (CB1954) como  
 precursor de la sustancia antitumoral, un agente alquilante conocido porque produce enlace en puente en el ADN  
 bicatenario como sustancia antitumoral, y nitrorreductasa como enzima conversora; y una combinación de  
 ganciclovir como precursor de la sustancia antitumoral, su metabolito como sustancia antitumoral y timidina cinasa  
 40 del virus tipo I del herpes simple (HSV1-TK) como enzima conversora. Además, convirtiendo una sustancia  
 antitumoral en un precursor (incluyendo un producto inactivado) poco tóxico para cuerpos humanos por  
 modificación tal como conjugación de glucurónido, conjugación de glicina o conjugación de lisina, y la enzima que  
 desmodifica el precursor puede utilizarse como enzima conversora. Cualquiera de los conocidos *per se* en la  
 técnica puede utilizarse como enzima que desmodifica el precursor. Por ejemplo, puede proporcionarse a título de  
 ejemplo la combinación de un precursor de sustancia antitumoral conjugado con glucurónido con  $\beta$ -glucuronidasa  
 como enzima conversora.

45 El microorganismo del género *Bifidobacterium* de la presente invención no está particularmente limitado  
 siempre que sea un microorganismo del género *Bifidobacterium* transformado con el vector de expresión de la  
 presente invención. Los ejemplos concretos del mismo incluyen *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium*  
*adolescentis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium pseudolongum*, *Bifidobacterium thermophilum*,  
*Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium infantis* y *Bifidobacterium animalis*. Entre éstos se resultan preferidos los  
 50 *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium bifidum* o *Bifidobacterium infantis* conocidos  
 por habitar en los intestinos de los seres humanos independientemente de la edad, y el *Bifidobacterium longum*  
 resulta el más preferido. Todas estas bacterias están disponibles en el mercado o pueden adquirirse fácilmente en  
 las instituciones depositarias. Por ejemplo, pueden utilizarse *Bifidobacterium longum* ATCC-15707, *Bifidobacterium*  
*bifidum* ATCC-11863 y *Bifidobacterium infantis* ATCC-15697.

55 La unidad de replicación del plásmido, el vector lanzadera, el vector de expresión y el microorganismo  
 transformado del género *Bifidobacterium* de la presente invención pueden prepararse según los procedimientos  
 descritos en los manuales de experimentación comercializados, por ejemplo, Gene Manual (Kodansha), Methods for  
 Experiments in Gene Manipulation (ed., Yasusaka Takagi, Kodansha), Molecular Cloning (Cold Spring Harbor  
 Laboratory (1982), Molecular Cloning 2ª ed. (Cold Spring Harbor Laboratory (1989), Methods in Enzymology, 194  
 60 (1991) y Gene Experiments Yeasts, Experimental Medicine Suppl. (Yodosha (1994)).

El microorganismo transformado del género *Bifidobacterium* puede proliferar solamente en tejidos  
 tumorales en un medio anaerobio y expresa sustancias con actividad antitumoral, enzimas conversoras y similares  
 en los tejidos tumorales. Por tanto, el microorganismo transformado del género *Bifidobacterium* se utiliza como

5 medicina eficaz para tratar el tumor que presenta un medio aerobio, preferentemente un tumor sólido. El agente antitumoral de la presente invención no está limitado de manera específica siempre que comprenda el microorganismo del género *Bifidobacterium* como principio activo. La administración del agente antitumoral de la presente invención no está particularmente limitada e incluye la administración oral y la administración parenteral, aunque resulta particularmente preferida la administración parenteral. Los ejemplos de administración parenteral pueden incluir la administración por las vías respiratorias, intrarrectal, subcutánea, intramuscular e intravenosa. Los ejemplos de preparaciones adecuadas para administración bucal incluyen comprimidos, gránulos, gránulos finos, polvos, jarabes, soluciones, cápsulas y suspensiones. Ejemplos de preparaciones adecuadas para administración parenteral incluyen inyecciones, infusiones, inhaladores, propulsores, supositorios, absorbentes transdérmicos y absorbentes a través de las mucosas. En la presente invención, resulta preferido que las preparaciones se utilicen como inyecciones, particularmente las inyecciones intravenosas.

10 El microorganismo transformado del género *Bifidobacterium* puede suministrarse tras el tratamiento conocido por sí mismo en la técnica. Por ejemplo, puede realizarse purificación parcial por centrifugación. Además, después de la purificación parcial, el microorganismo puede disolverse o ponerse en suspensión, en un disolvente utilizado convencionalmente en la técnica tal como PBS (solución salina tamponada con fosfato), o solución de Ringer lacteada, si se desea. Además, la liofilización o secado por atomización puede realizarse para preparar un producto en polvo o granulado, si se desea.

15 La solución o suspensión del microorganismo transformado del género *Bifidobacterium* o el polvo seco o el producto granulado del microorganismo transformado puede administrarse directamente como agente antitumoral de la presente invención. Sin embargo, es generalmente deseable que el agente antitumoral se administre en forma de composición farmacéutica que comprende las sustancias anteriores que actúan como principio activo y uno o más aditivos farmacéuticos. Dichas composiciones farmacéuticas pueden producirse según un procedimiento bien conocido o comúnmente utilizado por sí mismo en el campo farmacéutico.

20 Los ejemplos de aditivos farmacéuticos que pueden utilizarse en la producción de las preparaciones líquidas adecuadas para administración oral incluyen: agua; sacáridos tales como caña de azúcar, sorbita y azúcar de frutas; glicoles tales como polietilenglicol y propilenglicol; aceites tales como aceite de sésamo, aceite de oliva y aceite de soja; y conservantes tales como ésteres del ácido p-hidroxibenzoico. La producción de las preparaciones sólidas tales como cápsulas, comprimidos, polvos y gránulos comprende: excipientes tales como lactosa, glucosa, caña de azúcar y manita; disgregadores tales como almidón y alginato sódico; lubricantes tales como estearato de magnesio y talco; aglutinantes tales como alcohol polivinílico, hidroxipropilcelulosa y gelatina; tensioactivos tales como éster de ácido graso; y plastificantes tales como glicerina, pueden utilizarse.

25 De las preparaciones adecuadas para administración parenteral, pueden prepararse preferentemente preparaciones para administración intravascular tales como inyecciones e infusiones utilizando un medio acuoso isotónico con la sangre humana. Por ejemplo, pueden prepararse inyecciones en forma de solución, suspensión o dispersión junto con un auxiliar apropiado según un procedimiento convencional utilizando un medio acuoso seleccionado de entre solución salina, solución de glucosa o una mezcla de solución salina y solución de glucosa. Los supositorios para administración intestinal pueden prepararse utilizando un vehículo, por ejemplo, manteca de cacao, grasa hidrogenada o ácido bicarboxílico. Pueden prepararse propelentes utilizando un vehículo que no proporciona estimulación a la cavidad bucal humana ni a la mucosa de las vías respiratorias y que puede favorecer la absorción del microorganismo del género *Bifidobacterium* de la presente invención actuando como principio activo al dispersar al microorganismo en partículas finas. Por ejemplo, puede utilizarse lactosa o glicerina como vehículo. Además, pueden prepararse preparaciones en forma de aerosoles y polvos anhidros. Por ejemplo, uno o dos o más aditivos farmacéuticos seleccionados de entre diluyentes, aromatizantes, conservantes, excipientes, disgregadores, lubricantes, aglutinantes, tensioactivos y plastificantes pueden utilizarse en la producción de preparaciones para administración parenteral. La forma y el procedimiento de producción del agente antitumoral de la presente invención no se limitan a los ejemplos específicos mencionados anteriormente.

30 La dosis y la frecuencia de administración del agente antitumoral de la presente invención no están particularmente limitados y pueden seleccionarse de manera apropiada según varias condiciones tales como el tipo de gen retenido en el microorganismo del género *Bifidobacterium*, el tipo de una enfermedad mórbida que debe tratarse, las vías de administración, la edad y el peso corporal del paciente, los síntomas y la gravedad de la enfermedad. Por ejemplo, cuando el agente antitumoral se administra de forma generalizada por inyección intravenosa, la dosis diaria en el adulto es preferentemente aproximadamente  $2 \times 10^6$  a  $2 \times 10^7$  microorganismos/cuerpo. Cuando el agente antitumoral se administra localmente en el tumor, la dosis es preferentemente aproximadamente  $5 \times 10^8$  microorganismos/tumor. Sin embargo, la dosis no se limita a este ejemplo específico.

35 El agente antitumoral según la presente invención puede aplicarse al tumor que tiene un medio anaerobio, preferentemente a varios cánceres sólidos. Los ejemplos de cánceres sólidos incluyen cáncer del intestino delgado, tumor cerebral, cáncer de cráneo y cuello, cáncer de mama, cáncer pulmonar, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer hepático, cáncer de vesícula biliar, cáncer del conducto biliar, cáncer pancreático, insulinoma, coriocarcinoma, cáncer de colon, carcinoma de células renales, cáncer adrenocortical, cáncer de vejiga, cáncer de testículos, cáncer de próstata, tumor testicular, cáncer de ovarios, cáncer de útero, coriocarcinoma, cáncer de tiroides, tumor carcinoide maligno, cáncer de piel, melanoma maligno, osteosarcoma, sarcoma de tejido blando,

neuroblastoma, tumor de Wilms, retinoblastoma, melanoma y carcinoma espinocelular.

La medicina de la presente invención puede utilizarse con otras medicinas y similares. Particularmente, cuando se administra el microorganismo del género *Bifidobacterium* que incorpora en éste el gen que codifica una enzima convertora, resulta esencial la administración de un precursor de la sustancia antitumoral. No obstante, el precursor de la sustancia antitumoral puede formar una única preparación junto con el microorganismo del género *Bifidobacterium* que incorpora en éste el gen que codifica una enzima convertora; o sino, pueden ser preparaciones independientes que deben administrarse simultáneamente o a intervalos de tiempo. Además, resulta preferido que se utilice con lactulosa. La lactulosa es una fuente nutritiva para el microorganismo del género *Bifidobacterium* y no es metabolizada por seres humanos, ratones ni cerdos. Por lo tanto, administrando lactulosa el número de microorganismos del género *Bifidobacterium* en el tejido tumoral aumenta de manera específica. La dosis diaria de la misma en el adulto es preferentemente de aproximadamente 24 a 48 g/cuerpo, y la frecuencia de administración no está limitada. Además, la medicina de la presente invención puede utilizarse en combinación con otros agentes antitumorales y similares.

El microorganismo del género *Bifidobacterium* de la presente invención administrado a un paciente puede ser destruido fácilmente por un antibiótico. Esto es importante para aumentar más la seguridad del sistema de transferencia de genes según la presente invención.

A continuación, la presente invención se describirá con mayor detalle haciendo referencia a los ejemplos. Sin embargo, el alcance técnico de la presente invención está limitado a estas ilustraciones.

### EJEMPLO 1

(Análisis estructural del plásmido pTB6)

[Materiales y procedimientos]

1. Cepas bacterianas, plásmidos y medios

Las cepas bacterianas y los plásmidos utilizados en la presente invención se proporcionan en la Tabla 1. Se cultivó aeróbicamente *Escherichia coli* a 37°C en caldo de cultivo LB (10 g de Bacto-triptona, 5 g de extracto de levadura, 5 g de NaCl y 0,1% de glucosa por litro) y se permitió la formación de las colonias en el caldo de cultivo LB que contenía 1,5% de agar-agar. 105-A de *Bifidobacterium longum* (véase el documento 12 no de patente) se cultivó en medio anaerobio a 37°C en caldo de cultivo MRS (Difco Laboratories, EE.UU.) enriquecido con sacarosa 50 mM, cisteína al 0,34% y ascorbato de sodio al 0,02%. Se añadió un antibiótico (50 µg/ml de ampicilina (Ap) y/o 75 µg/ml de espectinomicina (Sp)) según la necesidad. Se permitió la formación de las colonias en el caldo de cultivo que contenía agar-agar al 1,5% utilizando el sistema anaerobio Gas-Pack (BL, EE.UU.) según el procedimiento descrito en el documento 12 no de patente.

[Tabla 1]

Cepas bacterianas y plásmidos utilizados en este estudio

Cepa o plásmidos	Características relevantes	Fuente de referencia
Cepas bacterianas		
HMS174 de <i>E.coli</i>	recA1 hsdR ri/Sp <sup>s</sup>	Sambrook <i>et al.</i> *
105-A de <i>B. longum</i>	Sp <sup>s</sup>	Matsumura <i>et al.</i> **
Plásmidos		
pUC18	2,7 kpb; ColE1 <i>ori</i> , <i>amp</i>	Sambrook <i>et al.</i> *
pBLES100	9,1 kpb; ColE1 <i>ori</i> , <i>whole</i> pT86, <i>spc</i>	Matsumura <i>et al.</i> **
pBRASTA100	5,6 kpb; ColE1 <i>ori</i> , pTB6 <i>oriV-repB</i> , <i>spc</i> , <i>amp</i>	Este estudio
pBRASTA101	5,0 kpb; ColE1 <i>ori</i> , pTB6 <i>oriV-repB</i> , <i>spc</i> ,	Este estudio
pBRASTA102	5,6 kpb; ColE1 <i>ori</i> , pTB6 <i>oriV-repB</i> , <i>spc</i> ,	Este estudio

pBRASTA103	6,2 kpb; ColE1 <i>ori</i> , pTB6 <i>oriV-repB</i> , <i>spc</i> ,	Este estudio
pDS044Sp	4,3 kpb; ColE1 <i>ori</i> , pTB6 <i>oriV-repB</i> , $\Delta$ <i>sso</i> , <i>spc</i> ,	Este estudio
pSS030Sp	5,4 kpb; ColE1 <i>ori</i> , pTB6 <i>mobA</i> , <i>spc</i> , <i>amp</i>	Este estudio

\*) Sambrook, J.E., Fritsch, F., y Maniatis, T., en "Molecular Cloning: a laboratory manual" 2ª ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York (1989).

\*\*\*) Matsumura, H., Takeuchi, A., y Kano, Y., Constructions of *Escherichia coli*-*Bifidobacterium longum* shuttle vector transforming *B. longum* 105-A y 108-A. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 61, 1211-1212 (1997).

## 2. Aislamiento de ADN plásmido y manipulación molecular

5 Se utilizó Plasmid Kit de Qiagen (QIAGEN, EE. UU.) según los procedimientos descritos en el manual adjunto para extraer ADN plásmido por un procedimiento de lisis alcalina modificada. Se lavó *Bifidobacterium longum* con NaCl al 0,9% y se trató a 37°C durante 30 minutos con lisozima (1 mg/ml) antes de la lisis alcalina y a 37°C durante 15 minutos con proteinasa K (0,1 mg/ml) antes del tratamiento con fenol.

10 Se prepararon células competentes de *Bifidobacterium longum* según el procedimiento descrito en el documento 12 no de patente. Las células recolectadas en la fase logarítmica tardía se lavaron tres veces con solución de sacarosa tamponada 50 mM y se pusieron en suspensión en glicerina enfriada en hielo (10% v/v) de aproximadamente una centésima del volumen del producto cultivado original. Además, se prepararon células competentes de *Escherichia coli* según el procedimiento descrito anteriormente (Takeuchi *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 66, 598-603 (2002)). Se utilizó el aparato GenePulser (Bio-Rad Labs., EE.UU.) en condiciones de 200  $\Omega$  de resistencia en paralelo, 2,5 kV/cm y 25  $\mu$ F según el procedimiento descrito en el documento 12 no de patente para realizar la electroporación utilizando 100 ng del ADN plásmido y 50  $\mu$ l de las soluciones bacterianas.

15 Se amplió el ADN utilizando GeneAmp PCR System 9600 y LA Taq Polimerasa (TAKARA). Dos cebadores [5'-GGCCGGAATTCTGAGCAAAAAGGCCAGCAAAAAGGCC-3'(SEC.ID.nº3)y5'-GGCCGGAATTCAGTACTCATATA TA CTTTAGATTGATTTA-3' (SEC. ID. nº 4)] se utilizaron para ampliar por RCP ColE1 *ori* del pUC18. A continuación, utilizando dos cebadores [5'- GCGGCGGATCCATTGAAAAAGGAAGAGTAT-3'(SEC.ID.nº5) y 5'- CGG CCGG ATCCTGCGCAACGTTGTTGCCAT-3' (SEC. ID. nº 6)] para construir pBRASTA102 y dos cebadores [5'-GCGGCAA GCTTATT-GAAAAAGGAAGAGTAT-3'(SEC.ID.nº7) y 5'-CGGCCAAGCTTTGCGCAACGTT-GTT GCCAT-3' (SEC. ID. nº 8)] para construir pBRASTA103, una media región de *amp* para el activador se amplió en pUC18. Se realizaron otras manipulaciones en el ADN todas según el procedimiento descrito anteriormente (Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: a laboratory manual*, 2ª ed. Cold Spring Harbor Laboratory, (1989)).

## 3. Secuenciado de ADN y análisis de la secuencia

25 Se escindió pBLES100 con PstI para preparar el ADN completo (3,6 kpb) de pTB6. Después de la digestión con Sau3AI o AluI, se subclonó el ADN en el punto de multiclonación de pUC18. ALF expresa el secuenciador de II ADN y el Thermo Sequenase Cycle Sequencing Kit of Thermo Sequenase CyTM 5 Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Amersham Pharmacia Biotech) se utilizó para realizar el secuenciado. Se utilizó el programa informático DNASIS-Mac v.2.2 y GENETYX-MAC para poner en práctica el montaje de la secuencia y el análisis de la secuencia utilizando ordenador. Se utilizaron los servidores FASTA y BLAST para buscar la homología.

[Resultados]

### 1. Estructura del plásmido

35 Se determinó la secuencia nucleotídica completa (3.624 pb) del pTB6 de la BK51 de *Bifidobacterium longum* que actúa como un componente del vector lanzadera pBLES100. Se predijo pTB6 (figura 1(a)) a partir de la búsqueda en la base de datos que contenía 4 marcos de lectura abiertos (Orf), es decir, RepB (872 a 1564), MemB (1543 a 2355), MobA (3300 a 2212) y una supuesta proteína Orf1 (3587 a 1 a 517). El contenido por GC de pTB6 fue 65,1 mol% y tenía un nivel observado normalmente en el ADN genómico y en el ADN plásmido de *Bifidobacterium longum*.

40 La secuencia nucleotídica completa de pTB6 presentó 95% de homología con los plásmidos pKJ36 (3625 pb) y pB44 (3624 pb) de *Bifidobacterium longum* que pertenecen al grupo 1 de la familia del plásmido tipo de replicación de círculo rodante (SCR) top NaC2 92% de homología a pNAC2 (3684pb) con 89% de homología a PBL01 (3626 pb). Hasta el 92% de homología se detectó también para un plásmido pDOJH10L (5308 a 8999 en 10073 pb) del grupo 1 (Tabla 2).

[Tabla 2]

Homología de nucleótidos e identidad de aa					
Plásmido	Homología nuc (%)*	Identidad de aa (%)			
		RepB**	MobA	MembB	Orf I ***
pKJ36	95	92	85	88	-
pB44	95	91	85	-	31
pNAC2	92	89	58	-	31
pDOJH10L	92	90	46	57	30
pBLO1	89	81	57	-	31

Las cifras representan el tanto por ciento de homología de nuc y la identidad de aa para pTB6.

\*; Las secuencias nuc completas se compararon con las de pTB6 (3.624 pb) excepto pDOJH10L en el que la posición 5308 a 8999 de nuc se comparó con la secuencia nuc de pTB6. \*\*; Secuencia de aminoácidos de RepB de las posiciones 1 a 230 de aa (pKJ36), desde 54 a 283 (pB44) y desde 54 a 281 (pNAC2, pBOJH10L y pBLO1) se comparó con la secuencia de aa de RepB completa (230 aa) de pTB6. El número de aa en RepB completo fue 230, 299, 297, 297, 297 para pKJ36, pB44, pNAC2, pDOJH10L y pBLO1, respectivamente. \*\*\*; Orf de pB44, Orf III de pNAC2, Orf II de pDOJH10L y Orf I de pBLO1, se compararon con Orf I. -; Homólogo de Orf con Orf I no se ha publicado. Los números de registro en el GenBank para las secuencias del ADN plásmido y el tamaño de nuc de plásmido son AF139129 para pKJ36 (3.625 pb), AY066026 para pB44 (3.624 pb), AY112723 para pNAC2 (3684 pb), AF538868 para pDOJH10L (10073 pb) y AF540971 para pBLO1 (3.626 pb).

## 2. RepB y oriV

La identidad de aminoácidos de Orf predicho de pTB6 se representa en la Tabla 2. RepB (230 aminoácidos (aa)) presentaba 92%, 91%, 90%, 89% y 81% de identidad con la secuencia de aminoácidos de RepB completa (230 aa de pKJ36, la región de aminoácidos de RepB de 54 a 283 aminoácidos de pB44 y la región de aminoácidos de RepB de 54 a 281 aminoácidos de pDOJH10L, pNAC2 y pBLO1, respectivamente. Dos zonas locales, la región 1 (117 a 138 aa) y la región 2 (183 a 188 aa) no se conservaron en estos plásmidos (figura 2(a)).

El origen de replicación oriV está constituido por dso (origen de la doble cadena) y sso (origen de la cadena individual) y es necesario para la iniciación de la replicación de la lectura y de las cadenas de aislamiento (DelSolaretal., *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62, 434-494, (1998)). Este origen de replicación fue predicho en una región entre los nucleótidos 305 y 664 de pTB6 (figura 1(b)). Se detectaron 2 series de IR (305 a 417) sso, mientras que IR (481 a 504) y DR (577 a 644) se detectaron en dso (figura 1(b)). DR constaba de cuatro secuencias idénticas de 22 monómeros (5'-AACCTACACAAAAGGGGAGCG-3'; SEC. ID. nº 9) con la excepción de que la última secuencia presentaba T en el terminal 3'. Sus 11 nucleótidos (5'-CAAAA-3' y 5'-GGAGCG-3') se conservaron en la DR de pKJ36, pB44, pNAC2, pDOJH10L y pBLO1 (figura 2(b)). La secuencia nucleotídica de IR en dso se conservó también en estos plásmidos salvo para 2 nucleótidos en la región del bucle (22 de 24 nucleótidos) (figura 2(c)).

## 3. MobA y oriT

MobA es una proteína primaria del tratamiento del ADN para la movilización conjugativa del plásmido (Becker *et al.*, *J. Bacteriol.*, 185, 3538-3546 (2003)). La identidad de aminoácidos de la supuesta MobA del pTB6 fue 85%, 85%, 58%, 57% y 46% de la supuesta MobA de pKJ36, pNAC2, pBLO1 y pDOJH10L, respectivamente (Tabla 2). MobA del pTB6 presentó también similitud notable con MobA del plásmido RSF 1010 de la familia Mob $\Omega$  (Francia *et al.*, *FEMS Microbiol. Rev.*, 28, 79-100 (2004)). El resto de tirosina del motivo I (Francia *et al.*, *FEMS Microbiol. Rev.*, 28, 79-100 (2004)), implicado en la acción de marcado-cierre del ADN y el motivo 3H del motivo III que ayuda al inicio de la transferencia por el motivo I se conservan en MobA del pTB6 (figura 3(a)). En oriT de RSF 1010, MobA escinde la secuencia nucleotídica de 13 monómeros 5'-GTAAGTGCGCCCT-3' (SEC. ID. nº 10) adyacente a la repetición invertida (figura 3(b)). La región de los nucleótidos 3454 a 3510 en oriT de pTB6 presentó similitud estructural con la secuencia nucleotídica observada en oriT de RSF1010 (Francia *et al.*, *FEMS Microbiol. Rev.*, 28, 79-100 (2004)). A partir de estos resultados, el oriT de pTB6 se estimó que escindía en el punto nic de la secuencia de 13 monómeros por MobA expresada en pTB6.

## 4. Memb y Orf1

Memb B de pKJ36 y pDOJH10L presentó 88% y 57% de identidad de aa, respectivamente, con la supuesta MembB de pTB6. El supuesto Orf1 del pTB6 está constituido por 184 aminoácidos y presentaba identidad de aa considerablemente baja (33% al 31%) para Orf de pB44, OrfIII de pNAC2, OrfII de pDOJH10L y OrfI de pBLO1 (Tabla 2). Las funciones de estas proteínas continúan sin explicarse.

## 5. Región esencial para la replicación del plásmido

Para comprender el control de la replicación del plásmido, es importante conocer la región del ADN esencial para la replicación del plásmido. Se construyeron plásmidos recombinantes constituidos por pUC18, la región oriV-RepB (nucleótidos 1 a 1872 de pTB6, y spc (1,1 kpb) de pBLES100 (Tabla 3, figura 4). Los plásmidos pBRASTA100 y pBRASTA101 resultantes se extrajeron en HMS174 de *Escherichia coli* y se transfirieron a 105-A de *Bifidobacterium longum*. Como se representa en la Tabla 3, ambos plásmidos transformaron eficazmente *Bifidobacterium longum*. El plásmido pBRASTA100 se transformó en 105-A de *Bifidobacterium longum* de manera eficaz ( $5,9 \times 10^4$  transformantes/ $\mu\text{g}$  de ADN). Esta eficacia fue tan alta como la obtenida por pBLES100 ( $2,2 \times 10^4$  transformantes/ $\mu\text{g}$  de ADN) publicado anteriormente. La eficacia de la transformación 40 veces mejor que la de pBRASTA100 se observó en pBRASTA101 ( $2,5 \times 10^6$  transformantes/ $\mu\text{g}$  de ADN). Estos plásmidos resultaban estables en los transformantes en cuanto a la estructura y la segregación de fenotipos. Un plásmido pDSO44Sp desprovisto de sso (Tabla 3, figura 4) constituido por pUC18, pTB6 dso-repB y *Bifidobacterium longum* transformado con spc a una eficacia de  $1,3 \times 10^6$  transformantes/ $\mu\text{g}$  de ADN (Tabla 3). Por otra parte, el plásmido recombinante pSSO30Sp portador de mobA y una parte de membB (1873 b a 3624 b) pero no portador de orfI, oriV y repB no pudieron transformar completamente *Bifidobacterium longum* (Tabla 3). Estos resultados concluyeron que solamente la presencia de la región dso-repB es suficiente para la replicación de pTB6 en *Bifidobacterium longum*, y la región sso no es esencial.

[Tabla 3]

Transformación de *B. longum* con plásmido

Plásmido	Transformantes obtenidos/ $\mu\text{g}$ de ADN	Relación
pBRASTA100	$5,9 \times 10^4$	1,0
pBRASTA101	$2,5 \times 10^6$	42,3
pDSO44Sp	$1,3 \times 10^6$	22,0
pDSO30Sp	-	-
pBRASTA102	$7,5 \times 10^4$	1,3
pBRASTA103	$7,3 \times 10^2$	0,012

Se prepararon plásmidos a partir de HMS 174 de *E. coli* y se transfirieron en 105-A de *B. longum*. Se seleccionaron los transformantes en la placa de agar-agar en presencia de Sp. N.D.; no se detectaron transformantes.

20 6. Transformación con gran eficacia de *Bifidobacterium longum*

Como se describió anteriormente, se demostró que el plásmido pBRASTA101 transforma *Bifidobacterium longum* con gran eficacia superior a 40 veces más a la del pBRASTA100 y 100 veces más a la del pBLES100. pBRASTA100 y pBLES100 conservó una secuencia amp normal, y pBRASTA101 presentaba mutación con la mitad de amp proximal al activador suprimido (supresión del segmento de ADN SpsI-FspI de 0,6 kpb) para confirmar que la supresión en amp influye realmente en la transformación, se insertó el fragmento de 0,6 kpb en la secuencia BamHI de pBRASTA101, y el pBRASTA102 obtenido (figura 4) se extrajo a su vez del HMS174 de *Escherichia coli* y se transformó en 105-A de *Bifidobacterium longum*. Como se muestra en la Tabla 3, casi la misma eficacia de transformación que la de pBRASTA100 se obtuvo en pBRASTA102 ( $7,5 \times 10^4$  transformantes/ $\mu\text{g}$  de ADN). Se construyó pBRASTA103 insertando el fragmento de 0,6 kpb en la secuencia HindIII de pBRASTA102. Se demostró que este plásmido presentaba 2 copias de este fragmento (figura 4), y la capacidad de transformación disminuyó además en proporción al número de copias del fragmento. Cuando estos plásmidos se transformaron en HMS174 de *Escherichia coli* no se observó dicha disminución en la eficacia de transformación. El mecanismo exacto que subyace a la restricción del plásmido inducido por el ADN de 0,6 kpb continúa sin explicarse. Sin embargo, estos resultados sugerían que la replicación del plásmido está limitada por la escisión del ADN de 0,6 kpb transfectedo en 105-A de *Bifidobacterium longum*.

[Exposición]

En la presente invención, se determinó la secuencia nucleotídica del plásmido pTB6 de *Bifidobacterium longum*, y se predijo la secuencia de aa del supuesto Orf. Los resultados del análisis de la secuencia pusieron de manifiesto que pTB6 es un plásmido asociado al grupo 1 de la familia del plásmido RCR descrito por Corneau *et al.*, (*Plasmid*, 51, 87-100 (2004)). La gran identidad de aa y la gran homología de las secuencias nucleotídicas de oriV entre los plásmidos del grupo 1, particularmente pKJ36 y pTB6, sugiere claramente que pTB6 se replica por el mecanismo del círculo rodante.

La secuencia nucleotídica conservada en oriT del plásmido lineal Mob $\Omega$  fue identificada en el supuesto oriT del pTB6. Además, la notable similitud del motivo I y del motivo III de la supuesta MobA con el motivo I y el motivo III del plásmido lineal Mob $\Omega$  se encontró en el pTB6. Este resultado sugiere que pTB6 se moviliza cuando el factor es además suministrado desde las células del hospedador o de otros plásmidos. Desde este punto de vista, se supone que los plásmidos pBRASTA101 y pDSO44Sp que tienen membB y orfI así como oriT y mobA suprimidos son útiles como vehículos seguros de transferencia génica.

Recientemente, Nakamura *et al.*, y Fujimori *et al.*, lograron la expresión del gen (codA) para la citosina desaminasa de *Escherichia coli* en *Bifidobacterium longum* utilizando el plásmido pBRES100 compuesto entre pBR322 y pTB6. Esto demostró que pTB6 es un vector útil para la expresión de un gen extraño en *Bifidobacterium longum*. Sin embargo, los microorganismos de *Bifidobacterium* son conocidos por generar endonucleasa específica para el sitio. Por tanto, el ADN inalterado puede dañarse cuando se introduce en las células de microorganismos de *Bifidobacterium* (Khosaka *et al.*, *Gene* 17, 117-122 (1982); Khosaka *et al.*, *FRBS Lett.*, 14, 63, 170-174 (1983); Khosaka *et al.*, *Gene* 31, 251-255 (1984) y Skripyna *et al.*, *Mol. Gen. Mikrobiol. Virusol.*, 5, 15-16 (1988)). Debido a que los pequeños plásmidos pBRASTA101 y pDSO44Sp carecen de oriT y mobA y tienen gran capacidad de transformación, se supone que estos plásmidos resultan prácticos para la clonación y expresión de un gen extraño en *Bifidobacterium longum*.

### EJEMPLO 2

(Construcción del vector lanzadera pAV001)

[Construcción del plásmido]

Se amplió la secuencia procedente de *Enterococcus faecalis* que contiene estreptomicina adeniltransferasa (casete AAD) a partir de pBLES100 por RCP y se subclonó en el vector pCR-BLUNT II-TOPO (Invitrogen) para preparar pCRTOPO-Scal-AAD-Eam1105I. Las secuencias Scal-AAD-Eam1105I de las enzimas de restricción se agregaron a los cebadores directo e inverso, respectivamente.

Como se muestra en la figura 5, un vector de clonación pGFPuv (DEFINICIÓN: Vector de clonación pGFPuv. REGISTRO: U62636 VERSION: U62636. GI: 1490528) adquirido en Invitrogen se compone de un gen GFPuv, secuencias de multiclonación (MCS) situadas a ambos extremos del mismo, un gen de resistencia a ampicilina, y un origen de replicación del plásmido Ori (pUC Ori) de *Escherichia coli*.

La secuencia del gen para la resistencia a la ampicilina se escindió con las enzimas de restricción Eam1105I y Scal para preparar un fragmento largo sin la secuencia. Del mismo modo, se escindió pCRTOPO-Scal-AAD-Eam1105I con las enzimas de restricción Eam1105I y Scal para preparar un fragmento (aproximadamente 1100 pb) que contiene la casete AAD. Estos dos fragmentos se ligaron mediante la utilización de T4 ADN ligasa para preparar pGFPuv-SpR. La adición de una propiedad de resistencia a la espectinomicina para el plásmido pGFPuv-SpR preparado y la insuficiencia de una propiedad de resistencia a la ampicilina del plásmido se confirmaron respectivamente en *Escherichia coli*.

Se digirió pGFPuv-SpR con las enzimas de restricción Sall (presentes en la secuencia de multiclonación del gen para GFPuv) y SpeI (presentes en la secuencia de multiclonación corriente abajo del gen para GFPuv) para preparar un plásmido pAVN en el que se suprimió el gen para GFPuv.

Una secuencia de aproximadamente 1900 pb que contiene RepB, SDO, DDO, repeticiones abundantes en AT y motivos de unión a DnaA se identificó como una unidad de replicación del plásmido de *Bifidobacterium longum* a partir de la información de la secuencia nucleotídica completa del plásmido pTB6 procedente de *Bifidobacterium longum* obtenido en el Ejemplo 1.

La secuencia de aproximadamente 1900 pb que contiene la unidad de replicación del plásmido de *Bifidobacterium longum* fue ampliada en pTB6 por RCP y se subclonó en el vector pCR-Blunt II-TOPO para preparar pCRTOPO-Apal-1900-Scal. Las secuencias Apal y Scal de la enzima de restricción se añadieron a los cebadores directo e inverso, respectivamente.

Un fragmento largo (de aproximadamente 2400 pb) obtenido a partir del pAUVN digerido con las enzimas de restricción Apal y Scal y un fragmento corto (aproximadamente 1900 pb) obtenido a partir del pCRTOPO-Apal-1900-Scal digerido con las enzimas de restricción Apal y Scal se ligaron utilizando T4 ADN ligasa para preparar un vector lanzadera pAV001 de *Bifidobacterium longum*-*Escherichia coli* (de aproximadamente 4300 pb).

### EJEMPLO 3

(Vector de expresión pAV001-HU-eCD para el gen de la citosina desaminasa)

[Construcción del vector de expresión]

A continuación, se escindió pBLES100-S-eCD con las enzimas de restricción HindIII y SpeI para extraer una secuencia de aproximadamente 2900 pb que contenía un activador del gen HU, un gen de la citosina desaminasa procedente de *Escherichia coli* y un terminador del gen HU. Un fragmento largo obtenido a partir del vector lanzadera pAV001 escindió a las secuencias de la enzima de restricción en la secuencia de multiclonación

con HindIII y Stel y el fragmento anterior de aproximadamente 2900 pb se ligaron mediante la utilización de T4 ADN ligasa para preparar pAV00-HU-eCD (aproximadamente 7100 pb).

[Comparación del número de copias del plásmido en *Bifidobacterium longum*]

5 Los pAV001-HU-eCD y pBLES100-S-eCD construidos esta vez se introdujeron respectivamente en *Bifidobacterium longum* para preparar dos organismos recombinantes *Bifidobacterium longum*::pAV001-HU-eCD y *Bifidobacterium longum*::pBLES100-S-eCD. La presencia de los respectivos plásmidos se confirmó por RCP *Bifidobacterium longum*::pAV001-HU-eCD y *Bifidobacterium longum*::pBLES100-S-eCD se subcultivaron respectivamente a 37°C durante 2 o más días en medio MRS (OXID) en condiciones anaerobias. Las células bacterianas respectivas ( $1 \times 10^9$  UFC) se separaron por centrifugación del medio de cultivo resultante y los ADN completos se extrajeron utilizando Puregene DNA Isolation Kit (Gentra Systems). Los ADN completos recogidos se digirieron con las enzimas de restricción HindIII y Eco811 y los ácidos nucleicos se separaron por electroforesis en gel de agarosa y se sometieron a análisis Southern utilizando reactivos de marcado directo AlkPhos (Amersham Bioscience) para comparar los números de copias del plásmido (véase la figura 9A). Para un procedimiento de sensibilización de señales, los ácidos nucleicos que se dejaron que desarrollaran quimioluminiscencia con fosfatasa alcalina se expusieron a películas de rayos X. En la comparación de la intensidad de señal, las películas de rayos X tras la exposición se escanearon utilizando un sistema de escaneado en gel (ATTO) y las imágenes escaneadas obtenidas se analizaron con el analizador CS (programa informático: ATTO) para determinar los números de copias del plásmido. Como resultado, el número de copias del plásmido de pBLES100-S-eCD fue aproximadamente de 3,26/célula, donde el número de copias del plásmido de pAV001-HU-eCD fue aproximadamente de 11,68/célula. Por consiguiente, el número de copias del plásmido de pAV001-HU-eCD se confirmó que era 3,6 veces mayor que el de pBLES100-S-eCD, y se observó diferencia significativa en el número del plásmido pAV001-HU-eCD que replican en comparación con el de pBLES100-S-eCD (véase la figura 9B).

[Comparación del nivel de expresión de la proteína citosina desaminasa en *Bifidobacterium longum*]

25 Se subcultivaron *Bifidobacterium longum*::pAV001-HU-eCD y *Bifidobacterium longum*::pBLES100-S-eCD respectivamente a 37°C durante 2 o más días en medio MRS en condiciones anaerobias. Las células bacterianas respectivas ( $1 \times 10^9$  UFC) se separaron por centrifugación del medio de cultivo resultante y se fragmentaron por ultrasonidos para extraer las proteínas respectivas en las células bacterianas. Las proteínas extraídas anteriormente se separaron por SDS-electroforesis en gel de poliacrilamida, y la intensidad de señal de las proteínas de citosina desaminasa se comparó por análisis Western. Un anticuerpo monoclonal desaminasa anticitocina en conejo (Sawaday Technology) y un complejo antiinmunoglobulina G en conejo conjugada con peroxidasa de rábano picante (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) se utilizaron como anticuerpos primario y secundario respectivamente. Para un procedimiento de sensibilización de señales, las proteínas que se dejaron que desarrollaran luz por el procedimiento ECL se expusieron a películas de rayos X. En la comparación de la intensidad de señal, las películas de rayos X después de la exposición se escanearon utilizando un sistema de escaneado en gel (ATTO) y las imágenes escaneadas obtenidas se analizaron con un analizador CS (programa informático: ATTO) para comparar los niveles de expresión. Estos resultados se representan en la figura 6. El resultado de comparación de la intensidad de señal puso de manifiesto que *Bifidobacterium longum*::pAV001-HU-eCD expresa la proteína citosina desaminasa 2 a 8 veces en comparación con *Bifidobacterium longum*::pBLES100-S-eCD.

40 [Comparación de la actividad enzimática de la proteína citosina desaminasa (comparación de actividad de la conversión de la conversión de 5FC en 5FU) en *Bifidobacterium longum*]

45 Además de *Bifidobacterium longum*::pAV001-HU-eCD (D) y *Bifidobacterium longum*::pBLES100-S-eCD (B), una cepa natural de *Bifidobacterium longum* (A) y *Bifidobacterium longum*::pAVN sin el gen (C) para citosina desaminasa introducido utilizado como referencia se subcultivaron respectivamente a 37°C durante 2 o más días en medio MRS en condiciones anaerobias. Las respectivas células bacterianas ( $2 \times 10^9$  UFC) se separaron por centrifugación del medio de cultivo resultante y se volvieron a poner en suspensión en 4,5 ml de medio MRS). Se enriquecieron a continuación las células con 0,5 ml de 5FC (20 mg/ml) a la concentración final de 2 mg/ml y se cultivaron a 37°C en condiciones anaerobias. Los sobrenadantes respectivos de los que se extrajeron las células bacterianas por centrifugación se recogieron del medio de cultivo en 0, 4, 8, 18 y 24 horas para medir una concentración de 5FU convertido por cromatografía de gases (métodos GC-MS para 5FU, BML). Un cambio temporal en los recuentos bacterianos se representa en la figura 7, y la concentración de 5-FU se representa en la figura 8. Los resultados de los análisis pusieron de manifiesto que la cantidad de 5FU convertida en *Bifidobacterium longum*::pAV001-HU-eCD (D) fue aproximadamente 1,83 veces (en 4 horas), aproximadamente 1,52 veces (en 8 horas), aproximadamente 1,34 veces (en 18 horas), aproximadamente 1,57 veces (en 24 horas) y aproximadamente 1,57 veces (de promedio) mayor que en *Bifidobacterium longum*::pBLES100-S-eCD (B).

(Transferencia génica del vector de expresión pAV001-HU-eCD en el gen de la citosina desaminasa para microorganismos del genero *Bifidobacterium*)

El vector de expresión pAV001-HU-eCD para el gen de la citosina desaminasa se introdujo en cepas bacterianas por electroporación representadas en la Tabla 4 para preparar cepas recombinantes de *Bifidobacterium*.

[Tabla 4]

	Cepas bacterianas
1	<i>Bifidobacterium longum</i> (cepa patrón de denominación común: <i>Bifidobacterium infantis</i> ) JCM1222
2	<i>Bifidobacterium longum</i> (cepa patrón de denominación común: <i>Bifidobacterium lactensis</i> ) JCM1210
3	<i>Bifidobacterium breve</i> (cepa patrón) JCM1190
4	Cepa aE-194b de <i>Bifidobacterium longum</i>
5	Cepa bs-601 de <i>Bifidobacterium longum</i>

Actualmente, *infantis* y *lactensis* están incluidas como subespecies de *longum* en *longum* desde el punto de vista de la taxonomía mientras que eran conocidas anteriormente como especies bacterianas distintas pertenecientes al género *Bifidobacterium*.

#### 5 (Medición de la actividad de citosina desaminasa de las cepas recombinantes de *Bifidobacterium*)

Después del cultivo de las cepas recombinantes de *Bifidobacterium*, se centrifugaron las células bacterianas respectivas en el medio de cultivo resultante, a continuación se pusieron en suspensión en soluciones tampón que contenían HEPES 50 mM, y se fragmentaron en un aparato de ultrasonidos. Estas soluciones de fragmentación se centrifugaron, y los sobrenadantes a partir de los que se eliminaron las fracciones innecesarias se utilizaron como muestras de proteínas extraídas. La alícuotas correspondientes a la cantidad total de proteínas de 0,05 mg se tomaron de las muestras de proteína extraídas y se enriquecieron con una solución tampón para ajustar exactamente la cantidad total a 250 µl. Además, se añadieron exactamente 250 µl de solución de 5FS 20 mM a las soluciones resultantes, que se incubaron a continuación a 37°C durante 60 minutos en un baño de agua. Después de la adición de ácido tricloacético a esto y extracción, en las muestras neutralizadas con hidróxido de sodio se midió por HPLC la cantidad de 5FU producida y la cantidad de 5FC restante. La medición por HPLC se realizó dos veces para confirmar que existía solamente un pequeño error de medición.

El vector de expresión pAV001-HU-eCD para el gen de la citosina desaminasa que utiliza el nuevo vector lanzadera pAV001 podía introducir cinco cepas bacterianas representadas en la Tabla 4. Además, la citosina desaminasa del transgén se expresó de hecho en gran medida como proteína con actividad y la actividad fue alta (véase la Tabla 5).

[Tabla 5]

Muestra	5FU (mM)	5FU medio	5FC (mM)	Cantidad de 5FC convertida (%)
<i>Bifidobacterium infantis</i> / pAV001-HU-eCD	1,767 1,768	<b>1,767</b>	8,024 8,119	<b>18,0</b>
<i>Bifidobacterium lactensis</i> / pAV001-HU-eCD	0,999 1,013		9,148 9,293	
<i>Bifidobacterium breve</i> / pAV001-HU-eCD	0,848 0,840	<b>0,844</b>	9,029 8,967	<b>8,6</b>
<i>Bifidobacterium longum</i> Cepa aE-194b / pAV001-HU-eCD	0,595 0,597		<b>0,596</b>	
<i>Bifidobacterium longum</i> Cepa bs-601/ pAV001-HU-eCD	0,637	<b>0,637</b>		9,543

**APLICABILIDAD INDUSTRIAL**

5 Según la presente invención, puede obtenerse un vector lanzadera para un microorganismo del género *Bifidobacterium* y *Escherichia coli* que presenta una amplia gama de hospedadores y un gran número de copias en microorganismos del género *Bifidobacterium* y que pueden expresar en gran medida una proteína deseada en un microorganismo del género *Bifidobacterium* utilizado como vector de expresión; un vector de expresión que puede expresar un gen deseado en un microorganismo del género *Bifidobacterium* mediante la utilización del vector lanzadera; un microorganismo del género *Bifidobacterium* transformado con el vector de expresión; un agente antitumoral que comprende el microorganismo del género *Bifidobacterium* como principio activo.

**LISTADO DE SECUENCIAS**

- <110> Anaeropharma Science Inc
- 10 <120> Novel Shuttle Vector
- <130> P029497EPA
- <150> JP2004-339677
- <151> 2004-11-24
- <160> 10
- 15 <170> Patente en version 3.1
- <210> 1
- <211> 3624
- <212> ADN
- <213> *Bifidobacterium longum*
- 20 <400> 1

```

gataggcagg ccagctcaag gccgcgaga acgacctcgt ggcgcggcgc agggaacgcg      60
aacgcaaggc ccgcaccaag cgctgatcg aggtcggcgc gatggccgag tcggccgcgg      120
gcttcgaggg aggcgacgag agggccaagg agcacatcgc ccgcctcgtg cagctcggct      180
ccctggtgga gtccctgtgc tccaccgacg tgatggccaa ctacacgagc cgcgaggacc      240
tcagggccac cgtcgccaag gctctggaac acaacgtcag gaccagcgat ggcatagaact      300
ggaacctcca ggacctcgtc tacgagggcg tgagcgagga atggcgcaaa agggacggcg      360
agatcagcga cccatgggcc aacgacgagg cggacggata ccagccgcc tcatacagc      420
cggtaaccc cgaacgcagg actccccaga cgccctccga tggcctgatc tgacgtccga      480
aaaaggcgc tgtgcgccct ttttaaatct tttataaatc tttttacatt cttttagccc      540
ctccgcagcc ttactctccc aacgggttcc agccgaaacc tacaccaaaa ggggagcgaa      600
cctacaccaa aaggggagcg aaacctacacc aaaaggggag cgaacctaca caaaagggg      660
agctatatac accttttgtt atttaaggty caagttgtgc tatgctgagg ccatgtccaa      720
tgagatcgtg aagttcagca accagttcaa caacgtcgcg ctgaagaagt tcgacgccgt      780
gcacctggac gtgctcatgg cgatcgctc aagggtgagg gagaagggca cggccacggt      840
ggagttctcg ttcgaggagc tgcgcggcct catgcgattg aggaagaacc tgaccaacaa      900
gcagctggcc gacaagatcg tgcagacgaa cgcgcgcctg ctggcgctga actacatgtt      960
cgaggattcg ggcaagatca tccagttcgc gctgttcacg aagttcgtca ccgaccgca      1020
ggaggcgact ctgcggttg gggtaacga ggagttcgcg ttcctgtca acgacctgac      1080
cagccagttc acgcgcttc agctggccga gttcgccgac ctcaagagca agtacgcaa      1140
ggagttctac cgcaggccca agcagtaccg cagctccgga atctggaaga tcggccgcga      1200
cgagttctgc cgactgcttg gcgttccacc gtcggcaata acccagacac gatattctgaa      1260
    
```

ES 2 357 372 T3

tcagaaggtt cttcagccaa ttcaggagga gtgtgggcct ctcttggcc tgaagatcga 1320  
gcgccagtac gtgaaacgca ggctgtcggg cttcgtgttc acattcgccc gcgagacccc 1380  
tccggtgatc gacgccaggc ccgtggaggc gaggaagacg gacggcgacg gcaagggcca 1440  
ttggacgagc gttgccgggt acggcgaggt gttcacgacc acggcgttgt tcgacgtgac 1500  
ggccgcccgg gctcaactcg acggcaccgt ggaggccggg gaatgccgtt tctcgcgct 1560  
ttgacgcgcg caaccgcgaa catcatgcgc ggaacgccgg aaggctgttc tagcggccgt 1620  
gtccgcgctt ctggggcggg tttgcgctg ccatgggtcg atctgccgct gttcggcctc 1680  
acgctggtct gtgcgctgcc tgatctccct gagcaggtcg gccttggctc tgggggcgct 1740  
tcgctcctcg aacgggcccgc tctccccag gtccctcgggc tcgctcaggt ccaacggctc 1800  
gtcaccggac ggctcgggcc ggttctctcc ctgtgccggg ttctccgctt gtgcgcttg 1860  
ttctggccat gcgcagtgcg agggccttca cctgttcggg gcttggcttc tcgttctcgg 1920  
cccgtcggc cctgttcgag ccgcctctcc agttcggcca cgagcccgtt ccttggctgc 1980  
atgtcgtggt cgtggatggt cttggtggtc ctcatgcgga acctgttggc ctggcccag 2040  
tcgctcggga tgtcggcgtc ttcgagccat ggcaccgccc cgcgagctt ctcggactgc 2100  
tccccggcca cctgttcggc gttccgcagc agcctgccgc gcttgaagac gttcgcgtcc 2160  
ctggcctcgc gcgaggcggc tcgcgccacg tcgatgatct gcttggcggc ctcaaaactcc 2220  
tcggtgccgt ggctcctcca ccaactctcg cggttcctca cgtcggcctt ggctcccatg 2280  
agttttccac ggatcgtgc cgtgtggtcg gccctgtcgg cttcgagctg gcggcgcgcg 2340  
tcgccctcga agtagcgcga gttcggctcc ctggccggtt ccggcctcgc ctggcgttgg 2400  
cgcagctgcc ctgatcttgg cggcgaacag ctgcgccagg cggtcgaata tccggccgag 2460  
ttcggtgccg atggagggtca gcaggccgtt gctgcgcctg atctcacggt tggcctcgea 2520  
cctctcgtg acgccccgg cccgttcgat ggccctggcc gcgtagccct cgtggatggt 2580  
gggttcgagg tcgctgccct ggtcctcag gctcctgtgg tcgattctcg cggctctcgc 2640  
cagccgcgcg ttacaggtct tcgcccagga ttcgcgcagg gccttgagct tggccttccg 2700  
gtcagcggg ttcagggaca cgctcgtgcg cttccactgc ctgcggcccc gcttgtcgg 2760  
cttctgctg ccggtctcgg ggtcgatcag cggcaccgc tctccccgt cgtccagcac 2820  
gtactccatg cgctgcttga gcctggccca gccgcccgtg gccgggtcga tctgccggtt 2880  
ggcgacgagg atgtgcgct gcggattgtt gccctccctg tcctcgtgga tggcgtaggt 2940  
ggccgcgtag ccgtccgct tcaggttctc gcggatgtac tcctccagcg cctgcacgcg 3000  
ctgcctgggg gtgaactcgc gcggcagggc caccacgatc ttcttggccg gcctcgcgct 3060  
ccgtccggtc tcgtgcagct cgaccgcgtt gaacagcacg gcggggtcgg cgaactcggc 3120  
cggcgcgccc tccggcagca ggggtccgac gcgcagcacg cgctccttgc gcccgtagtc 3180

gtaggtctcg ccgcccgt cgatcatgac ccgcttgccg gtgatgtacg agagcgtggc 3240  
 cgtggccctg gaaccgctcg cgcggetcac gttggagacg gacagatggt agatcgccat 3300  
 cggcttcggc tcctttcgtg atcggccagg gcgggtgggt gcggggcggc ggccctgcgg 3360  
 caaggggttc ctaggggtgc ggcgagcacc cgctgggctt gccgggaggc tccccggaa 3420  
 ggggtgggaat ccaaaggga aggcccgtgg cccccggagg gcgcgcttac ggaaaatgca 3480  
 acctccggtt gcatgtaagt gcgcccctaat ctttgattag ggatttcctt gctggtagaa 3540  
 tcatatcacc atacggatga tgcagaccat gtaaggagcc gtttcgatgg tgaagagcct 3600  
 ggatgagcag atcaagtccc tgca 3624

<210> 2

<211> 600

<212> ADN

5 <213> Bifidobacterium longum

<400> 2

gctgggcccg gcggccatga agtggcttga caagcataat cttgtctgat tcgtctat 60  
 tcaatacctt cggggaaata gatgtgaaaa cccttataaa acgcggggtt tcgagaaac 120  
 atgcgctagt atcattgatg acaacatgga ctaagcaaaa gtgcttgtcc cctgacccaa 180  
 gaaggatgct ttatggcata caacaagtct gacctcgttt cgaagatcgc ccagaagtcc 240  
 aacctgacca aggctcaggc cgaggctgct gtaaacgcct tccaggatgt gttcgtcgag 300  
 gctatgaagt ccggcgaagg cctgaagctc accggcctgt tctccgctga gcgctcaag 360  
 cgcccggctc gcaccggccg caaccgcgc actggcgagc agattgacat tccggcttcc 420  
 tacggcggtc gtatctccgc tggctccctg ctgaagaagg ccgtcaccga gtgaccttct 480  
 gctcgtagcg attacttoga gcattactga cgacaaaagac cccgaccgag atggtcgggg 540  
 tctttttgtt gtgggtgctg gacgtgttgt ccaaccgtat tattccggac tagttcagcg 600

<210> 3

<211> 35

10 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> cebador

<400> 3

15 ggccggaatt ctgagcaaaa ggccagcaaa aggcc 35

<210> 4

<211> 40

<212> ADN

<213> Artificial

20 <220>

<223> cebador

	<400> 4	
	ggccggaatt cagtactcat atatacttta gattgattta	40
	<210> 5	
	<211> 30	
5	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 5	
10	gcggcggatc cattgaaaaa ggaagagtat	30
	<210> 6	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
15	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 6	
	cggccggatc ctgcgcaacg ttgtgcat	30
	<210> 7	
20	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
25	<400> 7	
	gcggcaagct tattgaaaaa ggaagagtat	30
	<210> 8	
	<211> 30	
	<212> ADN	
30	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 8	
	cggccaagct ttgcgcaacg ttgtgcat	30
35	<210> 9	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	

<223> Secuencia de plásmido  
<400> 9  
aacctacacc aaaaggggag cg 22  
<210> 10  
5 <211> 13  
<212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Sitio de escisión MobA  
10 <400> 10  
gtaagtgcgc cct 13

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Vector lanzadera para un microorganismo del género *Bifidobacterium* y *Escherichia coli* que comprende una parte de la región procedente del pTb6 que comprende una región del origen de replicación (oriV)-repB del pTB6 pero que no comprende las regiones MembB, MobA, Orf1 y oriT del pTB6 y una parte del plásmido procedente de *Escherichia coli* que comprende una región del origen de replicación (ori) de *Escherichia coli*.
- 10 2. Vector lanzadera para un microorganismo del género *Bifidobacterium* y *Escherichia coli* según la reivindicación 1, en el que la parte de la región procedente del pTB6 está constituida por una parte de la región procedente del pTb6 que comprende una secuencia nucleotídica de 1260 pb constituida por una secuencia nucleotídica representada por los nucleótidos 305 a 1564 en la SEC. ID. nº 1.
- 15 3. Vector lanzadera para un microorganismo del género *Bifidobacterium* y *Escherichia coli* según la reivindicación 1 ó 2, en el que la parte del plásmido procedente de *Escherichia coli* que comprende una región del origen de replicación (ori) de *Escherichia coli* es una parte del plásmido, no comprendiendo la parte del plásmido un gen para la resistencia a la ampicilina (ampR) o que tiene ADN que codifica una región con terminal N que carece de  $\beta$ -lactamasa.
4. Vector lanzadera para un microorganismo del género *Bifidobacterium* y *Escherichia coli* según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el microorganismo del género *Bifidobacterium* es *Bifido bacterium longum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium bifidum* o *Bifidobacterium adolescentis*.
- 20 5. Vector lanzadera para un microorganismo del género *Bifidobacterium* y *Escherichia coli* según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el vector lanzadera presenta un número de copias medio de 6 a 30.
6. Vector lanzadera para un microorganismo del género *Bifidobacterium* y *Escherichia coli* según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el vector lanzadera se obtiene mediante las etapas siguientes:
- 25 (1) una etapa de preparación de un fragmento largo escindiendo y eliminando la secuencia del gen para la resistencia a la ampicilina del pGFPuv con las enzimas de restricción Eam1105I y Scal;
- (2) una etapa de preparación de un fragmento que contiene espectinomicina adeniltransferasa (casete AAD) permitiendo que actúen las enzimas de restricción Eam1105I y Scal en una secuencia procedente de *Enterococcus faecalis* que contiene la casete AAD;
- 30 (3) una etapa de preparación del plásmido pGFPuv\_Spr ligando los fragmentos de la etapa (1) y (2) mediante la utilización de T4 ADN ligasa;
- (4) una etapa de preparación del plásmido pAVN del que se ha suprimido el gen GFPuv, digiriendo pGFPuv-SpR con las enzimas de restricción Sall y SpeI;
- 35 (5) una etapa de realización de RCP para pTB6 destinada a ampliar la secuencia que contiene RepB, SDO, DDO, repeticiones abundantes en AT y motivos de unión a DnaA, y para añadir la secuencia Apal y la secuencia Scal a ambos extremos de los productos de la RCP;
- (6) una etapa de preparación del plásmido pCRTOTO-Apal-1900-Scal subclonando el fragmento ampliado en la etapa (5) en el vector pCR-BlunII-TOPO; y
- 40 (7) una etapa de preparación de un vector lanzadera ligando el fragmento obtenido digiriendo el plásmido pAVN con Apal y Scal, y el fragmento obtenido digiriendo pCRTOTO-Apal-1900-Scal con Apal y Scal mediante la utilización de T4 ADN ligasa.
- 45 7. Vector de expresión que puede expresar un gen deseado en un microorganismo del género *Bifidobacterium*, que comprende el vector lanzadera para un microorganismo del género *Bifidobacterium* y *Escherichia coli* según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que se inserta una unidad de expresión del gen deseado ligado en el marco entre un activador y un terminador implicados en la expresión de un gen procedente de *Bifidobacterium longum* que codifica una proteína de unión al ADN similar a una histona (proteína HU).
8. Vector de expresión según la reivindicación 7, en el que el gen deseado es un gen que codifica una citocina o un inhibidor angiogénico con actividad antitumoral o un gen que codifica una enzima que puede convertir un precursor de la sustancia antitumoral en una sustancia antitumoral.
- 50 9. Vector de expresión según la reivindicación 8, en el que el gen que codifica una enzima que puede convertir un precursor de la sustancia antitumoral en una sustancia antitumoral es un gen de la citosina desaminasa.
10. Microorganismo del género *Bifidobacterium* transformado con el vector lanzadera para un

microorganismo del género *Bifidobacterium* y *Escherichia coli* según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

11. Microorganismo del género *Bifidobacterium* según la reivindicación 10, que es *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium pseudolongum*, *Bifidobacterium thermophilum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium infantis* o *Bifidobacterium animalis*.

5 12. Microorganismo del género *Bifidobacterium* transformado con el vector de expresión según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9.

13. Microorganismo del género *Bifidobacterium* según la reivindicación 12, que es *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium pseudolongum*, *Bifidobacterium thermophilum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium infantis*, o *Bifidobacterium animalis*.

10 14. Agente antitumoral que comprende el microorganismo del género *Bifidobacterium* según la reivindicación 12 ó 13 como principio activo.

15. Unidad de replicación de plásmido procedente del pTB6 de un microorganismo del género *Bifidobacterium* que comprende una región repB del origen de replicación (oriV) de pTB6 pero que no comprende las regiones MembB, MobA, OrfI y oriT de pTB6.

15 16. Unidad de replicación del plásmido procedente de pTB6 del microorganismo del género *Bifidobacterium* según la reivindicación 15, que comprende la secuencia nucleotídica de 1260 pb constituida por una secuencia nucleotídica representada por los nucleótidos 305 a 1564 en la SEC. ID. nº 1.

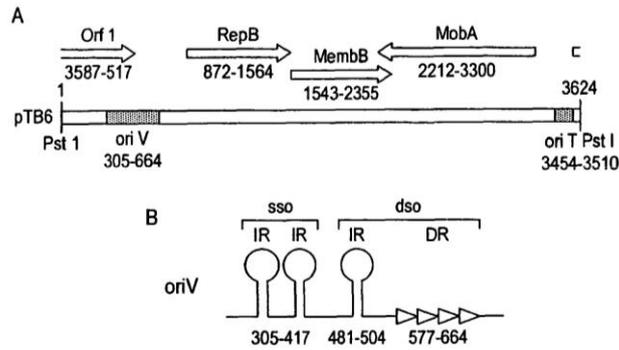


FIG. 1

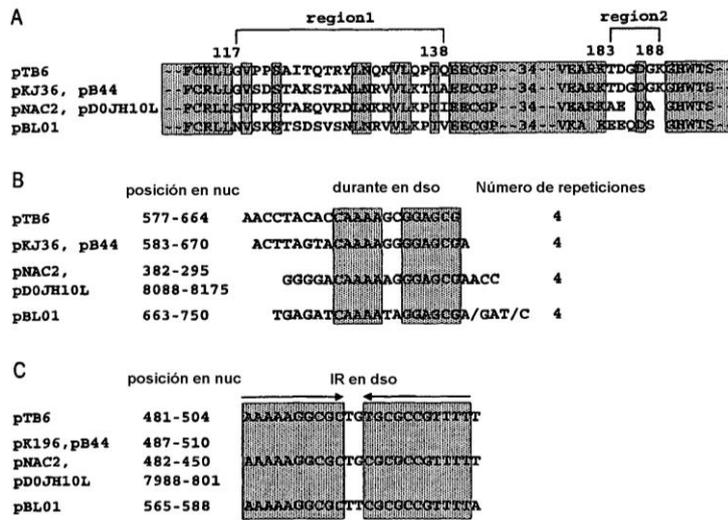


FIG. 2



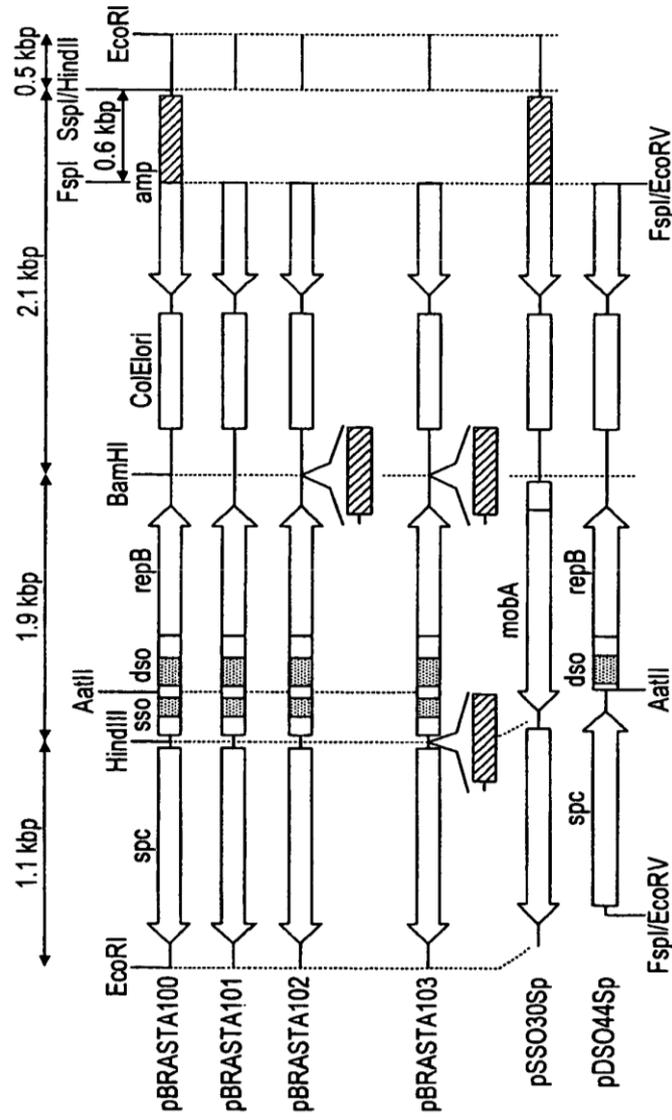


FIG. 4

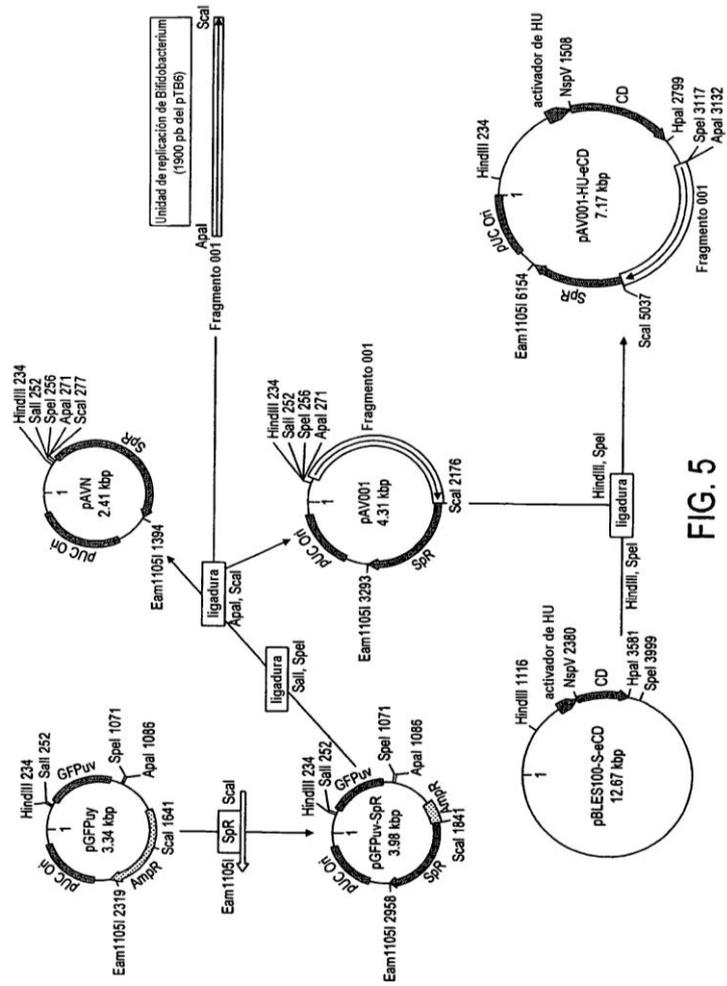
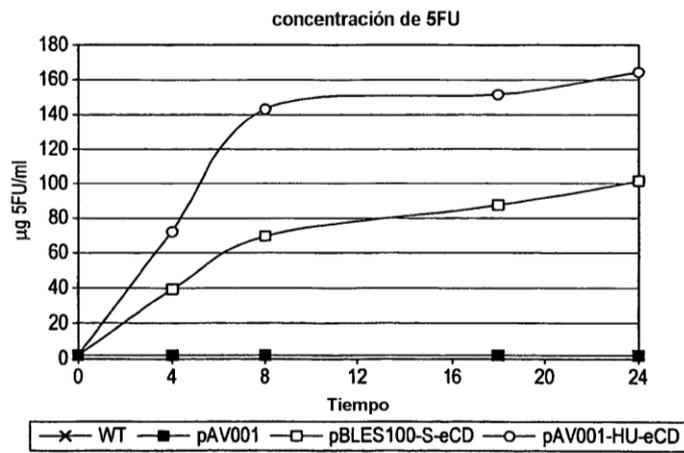
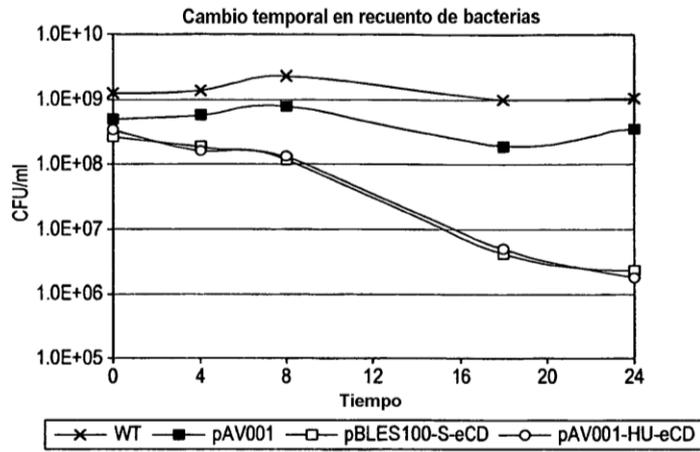


FIG. 5



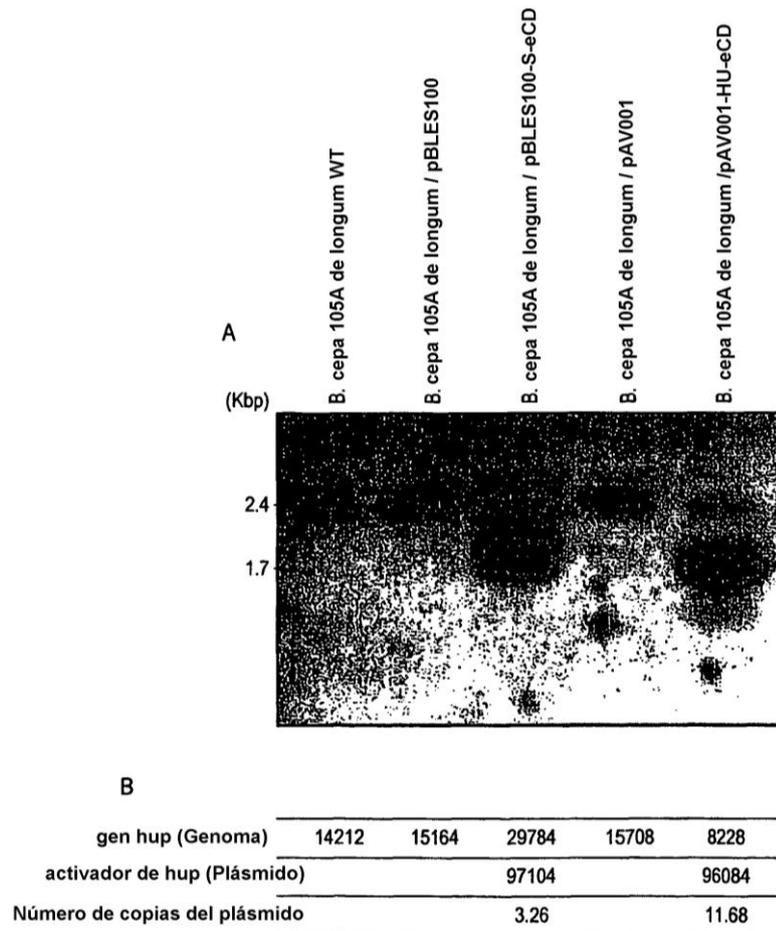


FIG. 9