

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 438 565**

51 Int. Cl.:

C12N 1/21 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.04.2006 E 06731050 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.09.2013 EP 1867714**

54 Título: **Bacterias resistentes a 5-fluorouracilo y método para su producción**

30 Prioridad:

08.04.2005 JP 2005112557

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

17.01.2014

73 Titular/es:

**ANAEROPHARMA SCIENCE INC. (100.0%)
4th Fl., Yaesu KH Bldg, 19-8 Nihonbashi Kabuto-
cho, Chuo-ku
Tokyo 103-0026, JP**

72 Inventor/es:

**TANIGUCHI, SHUNICHIROU;
AMANO, JUN;
FUJIMORI, MINORU y
HAMAJI, YOSHINORI**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 438 565 T3

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

DESCRIPCIÓN

Bacterias resistentes a 5-fluorouracilo y método para su producción

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un método para producir citosina desaminasa (EC3.5.4.1; denominada en lo sucesivo CD) que expresa bacterias entéricas resistentes a 5-fluorouracilo (denominado en lo sucesivo 5-FU), que es útil como agentes terapéuticos para tumores sólidos, puede crecer en tejidos tumorales anaeróbicos, puede expresar CD y tiene una resistencia a 5-FU presente a una concentración que es al menos eficaz para una actividad antitumoral. La presente invención se refiere también a una bacteria entérica resistente a 5-FU, una composición farmacéutica que contiene la bacteria entérica resistente y un agente terapéutico que contiene la bacteria entérica resistente para tratar tumores sólidos.

15 **Técnica antecedente**

La CD es una enzima que desamina citosina en uracilo (véase por ejemplo el documento no patente 1). La CD desempeña una función importante en el metabolismo de microorganismos. La CD ha sido aislada a partir de varios microorganismos diferentes, aunque habitualmente no es producida en células de mamíferos (véase por ejemplo el documento no patente 2). Muchas de las bacterias y hongos que producen CD convierten 5-fluoricitosina (en lo sucesivo denominada 5-FC) en 5-FU, que es un metabolito altamente tóxico y es mortal para las células. El 5-FU induce la generación de ARN anormal y la inhibición de la síntesis de ADN. La acción antifúngica de 5-FC es debida a esta generación de ARN anormal y la inhibición de la síntesis de ADN por la acción de 5-FU.

Específicamente, la 5-FC es absorbida por células fúngicas a través de citosina permeasa e inmediatamente convertida en 5-FU en la célula mediante CD. El 5-FU es seguidamente convertido a través de 5-FUMP en 5-FUDP mediante UMP-pirofosforilasa. La trayectoria de fosforilación posterior se bifurca en dos ramificaciones, produciendo 5-FUTP a través de una trayectoria y 5-FdUMP a través de la otra trayectoria. La incorporación de 5-FUTP, en lugar de UTP, en el ARN genera ARN anormal y, por tanto, inhibe la síntesis de proteínas normales, dando lugar a la inhibición del crecimiento fúngico. Además, la 5-FdUMP funciona como un potente inhibidor de timidilato sintasa e inhibe la síntesis de ADN y la división nuclear, conduciendo a un efecto antimicrobiano.

Sin embargo, como las células normales de mamífero no expresan una cantidad significativa de CD y, por tanto, la 5-FC no será desaminada en 5-FU metabolito tóxico, el 5-FC es no tóxico para las células de mamífero incluso a una concentración que muestra una potente actividad antifúngica. Por otra parte, el 5-FU es altamente citotóxico para células de mamífero también y es ampliamente usado como un agente anticancerígeno.

Los genes de CD han sido aislados y clonados a partir de *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae* (véanse por ejemplo los documentos no patente 3 y 4). Muchos investigadores han informado que la introducción de un gen de CD en una célula de mamífero conduce a una disminución de la sensibilidad selectiva de la célula para 5-FC in vitro (véanse por ejemplo los documentos no patente 3 y 5). Se ha informado también que las células tumorales introducidas con un gen de CD usando un vector retroviral pueden ser eliminadas in vivo mediante tratamiento sistémico del animal con 5-FC (véanse por ejemplo los documentos no patente 6-8). Un vector retroviral de replicación defectuosa (véase por ejemplo el documento no patente 9) y un liposoma catiónica (véase por ejemplo el documento no patente 10) son empleados también para la introducción de un gen de CD, respectivamente, en la línea celular de carcinoma de colon humano y cáncer de pulmón de células grandes de ratón. Estas expresiones génicas en células tumorales otorgan a las células una sensibilidad a 5-FC.

Es conocido que una resistencia a 5-FC, que es usada contra infecciones fúngicas, por ejemplo mediante *Candida*, surge fácilmente (véase por ejemplo el documento no patente 11). Como la resistencia a 5-FC podría surgir a través de pérdida o mutación de una enzima relativa a la conversión de 5-FC en 5-FU o la incorporación de 5-FU en ARN etc., hay teóricamente una diversidad de mecanismos para obtener la resistencia. Sin embargo, clínicamente, la adquisición de una resistencia va acompañada lo más frecuentemente de una pérdida o disminución de la actividad de UMP-pirofosforilasa en *Candida albicans*. Es conocido también que hay una correlación obvia entre la sensibilidad a 5-FC y la actividad enzimática de UMP-pirofosforilasa. Las cepas resistentes que tienen deficiencia de citosina permeasa o CD han sido descritas también en *Candida glabrata*, cuya fase nuclear es monoploide.

Por otra parte, *Bifidobacterium longum* es una bacteria anaeróbica gran-positiva y tiene un genoma con un contenido elevado de GC (véase por ejemplo el documento no patente 12). Este *Bifidobacterium longum* es no patógeno y constituye una gran parte de la microflora normal en el intestino grueso de seres humanos y otros animales (véase por ejemplo el documento no patente 13). El *Bifidobacterium longum* se dice que tiene propiedades favorecedoras de la salud para su hospedante, que implican una mejora de la respuesta inmune (véase por ejemplo el documento no patente 14), efecto inhibidor de carcinogénesis (véase por ejemplo el documento no patente 15), protección del hospedante contra infecciones virales (véanse por ejemplo los documentos no patente 16 y 17) y posibilidad de producir una sustancia antibacteriana (véase por ejemplo el documento no patente 18). Algunas especies de *Bifidobacterium* son ampliamente usadas en todo el mundo para preparar productos lácteos fermentados.

Además, los plásmidos para *Bifidobacterium* se espera que sean aplicados a vectores probióticos y vectores de vacunas orales contra enfermedades infecciosas. Por ejemplo, es conocido un método de transformación que comprende las etapas de (a) construir un vector de lanzamiento que es replicado en *Bifidobacterium* sp. y *E. coli* usando un plásmido originado a partir de *Bifidobacterium* sp. y el originado a partir de *E. coli*; (b) construir un vector recombinante insertando un gen diana que codifica una proteína diana en el vector de lanzamiento; y (c) transformar el *Bifidobacterium* sp. usado en la etapa (a) con el vector recombinante construido en la etapa (b) (véase por ejemplo el documento patente 1). Además, se revelado en informes recientes que el *Bifidobacterium longum* se acumula en tumores sólidos hipóxicos después de una aplicación sistémica (véanse por ejemplo los documentos no patente 19 y 20) y que el plásmido recombinante pBLES100-S-eCD que portan *codA* de *E. coli* fusionado a promotor *hup* de *Bifidobacterium longum* expresa CD en microorganismos (véanse por ejemplo documento patente 2, documentos no patente 21 y 22). Estos descubrimientos apoyan la eficacia de *Bifidobacterium longum* recombinante para terapia de profármacos de enzimas. pBLES 100, que se usó para la construcción del plásmido recombinante pBLES100-S-eCD, es un vector de lanzamiento construido a partir de pTB6 derivado de *Bifidobacterium longum* y pBR322 derivado de *E. coli*. El vector de lanzamiento pBLES100 transformó *Bifidobacterium longum* con una eficacia de $2,2 \times 10^4$ transformantes/ μg de ADN, y era estable en las células en estructura y segregación (véase por ejemplo el documento no patente 23). Sin embargo, para la clonación de un gen extraño, se requiere una eficacia de transformación incluso superior porque un plásmido que tiene un ADN no modificado puede ser escindido por una enzima de restricción en un microorganismo durante la transfección. Por tanto, los presentes inventores proponen los plásmidos pAV001 y pBRASTA101, que pueden transformar *Bifidobacterium longum* con 100 veces o más eficacia que pBLES100 (véase por ejemplo el documento no patente 24).

Como se mencionó anteriormente, 5-FU es altamente citotóxico para células de mamífero también y es ampliamente usado como un agente anticancerígeno. Sin embargo, para la administración de 5-FU por sí mismo a un paciente, debe ser administrado, por ejemplo, de forma que su concentración en sangre sea de aproximadamente $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ o menor, o incluso cuando es administrado para sobrepasar la concentración en sangre de $1 \mu\text{g}/\text{ml}$, el tiempo durante el cual la concentración en sangre sobrepasa $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ debe ser de aproximadamente 1 hora como máximo para evitar efectos adversos. Bajo estas situaciones, el 5-FU no se puede decir que ejerza completamente su efecto anticancerígeno con los métodos convencionales. Bajo tales circunstancias, han sido altamente deseadas medidas para tratar tumores con una concentración elevada de 5-FU mientras se superan al mismo tiempo los efectos adversos de 5-FU.

[Documento patente 1] Traducción de patente japonesa publicada de solicitud internacional PCT nº 2004-519236

[Documento patente 2] Solicitud de patente japonesa hecha pública nº 2002-97144

[Documento no patente 1] O'Donovan et al., *Bact.Rev.*34:278 (1970)

[Documento no patente 2] Nishiyama et al., *Cancer Res.*45:1753 (1985)

[Documento no patente 3] Austin et al., *Pharmacol.* 43: 380 (1992)

[Documento no patente 4] Anderson et al., *Arch. Microbiol.* 152:115 (1989)

[Documento no patente 5] Mullen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*89:33 (1992)

[Documento no patente 6] Huber et al. , *Cancer Res.* 53:4619 (1993)

[Documento no patente 7] Mullen et al., *Cancer Res.* 54: 1503 (1994)

[Documento no patente 8] Huber et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:8302 (1994)

[Documento no patente 9] Hirschowitz et al., *Human Gene Ther.* 6:1055 (1995)

[Documento no patente 10] Davis et al., *Proc. AACR Abstract No.*2355, p345 (1996)

[Documento no patente 11] *Clin. Microbiol. Rev.* 11:382-402. 1998

[Documento no patente 12] Scardovi, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* vol 2, eds. Sneath et al., pag. 1418-1434 (1986)

[Documento no patente 13] Mitsuoka, *Elsevier Applied Science*, pag. 69-114 (1992)

[Documento no patente 14] Yasui et al. *J. Dairy Sci.*, 74, 1187-1195 (1991)

[Documento no patente 15] Reddy et al., *Cancer Res.*, 53, 3914-3918 (1993)

[Documento no patente 16] Duffy et al., *Pediatr. Res.*, 35, 690-695 (1994)

[Documento no patente 17] Saaverdra et al., Lancet., 344, 1046-1049 (1994)

[Documento no patente 18] Ibrahim et al., J. Food Prot., 56, 713-715 (1993)

5

[Documento no patente 19] Yazawa et al. Cancer Gene Ther., 7, 269-274 (2000)

[Documento no patente 20] Yazawa et al. Breast Cancer Res. Treat., 66, 165-170 (2001)

[Documento no patente 21] Nakamura et al. , Biosci. Biotechnol. Biochem., 66, 2362-2366 (2002)

[Documento no patente 22] Fujimori et al., Curr. Opin. Drug Discov. Devel., 5, 200-203 (2002)

[Documento no patente 23] Matsumura et al., Biosci. Biotechnol. Biochem., 61, 1211-1212 (1997)

15

[Documento no patente 24] Tanaka et al., Biosci Biotechnol Biochem.;69(2): 422-425 (2005, febrero)

Exposición de la invención

20 Objetivo a resolver mediante la invención

Una terapia de enzimas/profármacos que usa CD/5-FC es una terapia ampliamente usada en experimentos con animales, ensayos clínicos, etc. En esta terapia de enzimas-profármacos, si se aumenta la resistencia a 5-FU de las células (microorganismos) introducidas en genes de CD, se espera que el efecto terapéutico de la terapia de enzimas/profármacos usando CD/5-FC será significativamente mejorada porque estas células (microorganismos) no serán erradicadas por 5-FU y, por lo tanto, tendrán una buena tasa de supervivencia. Un objeto de la presente invención es proporcionar un método para producir estos microorganismos resistentes a 5-FU, que expresan CD, útiles como agentes terapéuticos para la terapia de enzimas/profármacos, que son capaces de expresar CD y que tienen una resistencia a 5-FU a una concentración que es al menos eficaz para una actividad antitumoral. Otro objeto de la invención es proporcionar un microorganismo resistente a 5-FU que hace posible el tratamiento de tumores con una concentración elevada de 5-FU mientras se superan al mismo tiempo los efectos adversos de 5-FU, para proporcionar una composición farmacéutica que contiene el microorganismo resistente y un agente terapéutico de tumores sólidos que contiene los microorganismos resistentes.

35 Medios para resolver el objetivo

Los presentes inventores han estudiado a fondo la resolución de los objetivos anteriormente descritos y descubrieron que un microorganismo resistente a 5-FU que mantiene actividad de CD puede ser producido mediante subcultivo o aclimatación de un microorganismo que expresa CD, que es transformado con un gen de CD, en presencia de 5-FC. Específicamente, cuando son cultivados microorganismos que expresan CD en un medio de cultivo complementado con una cantidad especificada de 5-FC, la 5-FC es gradualmente convertida en 5-FU mediante la actividad enzimática de CD que ha expresado junto con la proliferación del microorganismo que expresa CD. Por lo tanto, aunque la cantidad especificada de 5-FC es añadida, inicialmente actúa como una concentración baja de 5-FU, evitando la erradicación de los microorganismos que expresan CD. Debido a este aumento gradual de 5-FU, que expresa CD, los microorganismos resistentes a 5-FU, que han adquirido una resistencia, pueden ser selectivamente cultivados. Alternativamente, los presentes inventores descubrieron que un microorganismo resistente a 5-FU, que expresa CD, puede ser producido también mediante subcultivo o cultivo de aclimatación de microorganismos que no expresan CD en presencia de 5-FU para producir un microorganismo resistente a 5-FU y transformar los microorganismos resistentes a 5-FU resultantes introduciendo un gen de CD. Además, los presentes inventores descubrieron que se puede conseguir el tratamiento de un tumor con una concentración elevada de 5-FU, mientras se superan los efectos adversos de 5-FU, mediante el uso del microorganismo resistente a 5-FU obtenido mediante estos métodos, y han completado la presente invención.

A saber, la presente invención se refiere a [1] un método para producir una bacteria entérica anaeróbica resistente a 5-fluorouracilo que puede crecer en tejidos tumorales anaeróbicos, que expresa citosina desaminasa y que tiene resistencia a 5-fluorouracilo a una concentración al menos eficaz para una actividad antitumoral, en que un gen de citosina desaminasa es introducido en una bacteria entérica que puede crecer en tejidos tumorales anaeróbicos y que no tiene un gen de citosina desaminasa, para obtener una bacteria que expresa citosina desaminasa transformada, y se realiza un subcultivo o cultivo de aclimatación de la bacteria que expresa citosina desaminasa transformada repitiendo al menos tres tandas de cultivo con un medio complementado con 2 a 5000 µg/ml de 5-fluorocitosina durante al menos 24 horas; [2] el método para producir una bacteria resistente según el apartado [1], en que la bacteria entérica que no tiene un gen de citosina desaminasa es una bacteria perteneciente al género Bifidobacterium; [3] el método para producir una bacteria resistente según el apartado [2], en que la bacteria perteneciente al género Bifidobacterium es Bifidobacterium longum, Bifidobacterium breve o Bifidobacterium infantis; [4] el método para producir una bacteria resistente según el apartado [3], en que la bacteria perteneciente al género Bifidobacterium es Bifidobacterium longum; [5] un método para producir una bacteria entérica anaeróbica resistente a 5-fluorouracilo que puede crecer en tejidos tumorales anaeróbicos, que expresa citoquina desaminasa y que tiene

una resistencia a 5-fluorouracilo a una concentración al menos eficaz para una actividad antitumoral, en que el método comprende las etapas de (1) realizar un subcultivo o cultivo de aclimatación de una bacteria entérica que puede crecer en tejidos tumorales anaeróbicos y que no tiene un gen de citosina desaminasa repitiendo al menos tres tandas de cultivo con un medio complementado con 1 a 100 µg/ml de 5-fluorouracilo durante al menos 24 horas para producir una bacteria resistente a 5-fluorouracilo y (2) transformar la bacteria resistente a 5-fluorouracilo producida en la etapa (1) anterior introduciendo un gen de citosina desaminasa; [6] el método para producir una bacteria resistente según el apartado [5], en el que la bacteria entérica que no tiene un gen de citosina desaminasa es una bacteria perteneciente al género *Bifidobacterium*; [7] el método para producir una bacteria resistente según el apartado [6], en el que la bacteria perteneciente al género *Bifidobacterium* es *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium breve* o *Bifidobacterium infantis*; [8] el método para producir una bacteria resistente según el apartado [7], en que la bacteria perteneciente al género *Bifidobacterium* es *Bifidobacterium longum*; [9] una bacteria entérica anaeróbica resistente a 5-fluorouracilo introducida en un gen de citosina desaminasa que crece en tejidos tumorales anaeróbicos, que expresa citosina desaminasa y que puede crecer en un medio complementado con al menos 2 µg/ml de 5-fluorocitosina o al menos 1 µg/ml de 5-fluorouracilo, en que la bacteria es una cepa de *Bifidobacterium longum* 105-A que porta el plásmido pAV001-HU-eCD; [10] una bacteria entérica anaeróbica resistente a 5-fluorouracilo introducida en un gen de citosina desaminasa que puede crecer en tejidos tumorales anaeróbicos, que expresa citosina desaminasa y que puede crecer en un medio complementado con al menos 2 µg/ml de 5-fluorocitosina o al menos 1 µg/ml de 5-fluorouracilo, en que la bacteria es una cepa de tipo *Bifidobacterium breve* que porta el plásmido pAV001-HU-eCD; [11] una bacteria entérica anaeróbica resistente a 5-fluorouracilo introducida en un gen de citosina desaminasa que puede crecer en tejidos tumorales anaeróbicos, que expresa citosina desaminasa y que puede crecer en un medio complementado con al menos 2 µg/ml de 5-fluorocitosina o al menos 1 µg/ml de 5-fluorouracilo, en que la bacteria es una cepa *Bifidobacterium breve* aS-1 que porta el plásmido pAV001-HU-eCD; [12] una bacteria entérica anaeróbica resistente a 5-fluorouracilo introducida en un gen de citosina desaminasa que puede crecer en tejidos tumorales anaeróbicos, que expresa citosina desaminasa y que puede crecer en un medio complementado con al menos 2 µg/ml de 5-fluorocitosina o al menos 1 µg/ml de 5-fluorouracilo, en que la bacteria es una cepa *Bifidobacterium breve* I-53-8W que porta el plásmido pAV001-HU-eCD; [13] una bacteria entérica anaeróbica resistente a 5-fluorouracilo introducida en un gen de citosina desaminasa que puede crecer en tejidos tumorales anaeróbicos, que expresa citosina desaminasa y que puede crecer en un medio complementado con al menos 2 µg/ml de 5-fluorocitosina o al menos 1 µg/ml de 5-fluorouracilo, en que la bacteria es una cepa *Bifidobacterium infantis* I-10-5 que porta el plásmido pAV001-HU-eCD; [14] una bacteria entérica anaeróbica resistente a 5-fluorouracilo introducida en un gen de citosina desaminasa que puede crecer en tejidos tumorales anaeróbicos, que expresa citosina desaminasa y que puede crecer en un medio complementado con al menos 2 µg/ml de 5-fluorocitosina o al menos 1 µg/ml de 5-fluorouracilo, en que la bacteria es una cepa *Bifidobacterium infantis* I-10-5 que porta el plásmido pAV001-HU-eCD; [15] un agente terapéutico para tratar tumores sólidos, que comprende la bacteria entérica anaeróbica resistente a 5-fluorouracilo introducida en un gen de citosina desaminasa según uno cualquiera de los apartados [9] a [14]; [16] el agente terapéutico para tratar dichos tumores según el apartado [15], combinado con 5-fluorocitosina; [17] el agente terapéutico para tratar un tumor sólidos según los apartados [15] o [16], adicionalmente combinado con lactulosa.

Breve descripción de los dibujos

[Fig. 1] Es un diagrama que muestra un procedimiento para producir un vector pAV001 de lanzamiento de *Bifidobacterium-E. coli* y un vector de lanzamiento pAV001-HU-eCD de expresión de CD.

[Fig. 2] Es una figura que muestra el resultado de comparación del nivel de expresión de proteína de CD entre un *Bifidobacterium longum* de tipo salvaje y *Bifidobacterium/pAV001-HE-eCD*.

[Fig. 3] Es un gráfico que muestra el perfil de recuento celular frente al tiempo obtenido a partir de la comparación de la actividad enzimática de CD (comparación de actividad para la conversión de 5-FC en 5-FU) entre *Bifidobacterium longum* de tipo salvaje y *Bifidobacterium/pAV001-HE-eCD*.

[Fig. 4] Es un gráfico que muestra las concentraciones de 5-FU obtenidas a partir de la comparación de la actividad enzimática de CD (comparación de la actividad para la conversión de 5-FC en 5-FU) entre *Bifidobacterium longum* de tipo salvaje y *Bifidobacterium/pAV001-HE-eCD*.

Mejor modo de llevar a cabo la invención

Los microorganismos usados en los métodos de producción de la presente invención, que pueden crecer en tejidos de tumores anaeróbicos, son bacterias entéricas pertenecientes a géneros como *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Peptococcus*, *Enterococcus*, *Bacteroides* y *Eubacterium*. Entre estos, se prefieren las bacterias pertenecientes al género *Bifidobacterium*.

Ejemplos específicos de las bacterias pertenecientes al género *Bifidobacterium* incluyen *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium lactentis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium pseudolongum*, *Bifidobacterium thermophilum*, *Bifidobacterium infantis* y *Bifidobacterium animalis*. Entre estas, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium bifidum* y *Bifidobacterium infantis*, que se conocen que se alojan en el intestino humano independientemente de la edad, son

preferidas como una bacteria hospedante, y *Bifidobacterium longum* es más preferida. Todas estas bacterias están disponibles en el comercio o pueden ser obtenidas fácilmente de instituciones de depósito. Por ejemplo, pueden ser usadas *Bifidobacterium longum* ATCC-15707, *Bifidobacterium bifidum* ATCC-11863 o *Bifidobacterium infantis* ATCC-15697.

5 Ejemplos de cepas de *Bifidobacterium longum* incluyen, sin limitación, *Bifidobacterium longum* 105-A, *Bifidobacterium longum* aE-194b, *Bifidobacterium longum* bs-601 y *Bifidobacterium longum* M101-2. Entre estas, puede ser preferentemente citada como ejemplo *Bifidobacterium longum* 105-A.

10 Además, ejemplos de cepas de *Bifidobacterium breve* incluyen, sin limitación, la cepa tipo *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium breve* aS-1 y *Bifidobacterium breve* I-53-8W.

Además, ejemplos de cepas de *Bifidobacterium infantis* incluyen, sin limitación, cepa tipo *Bifidobacterium* tipo (JCM 1222) y *Bifidobacterium infantis* I-10-5.

15 Además, ejemplos de cepas de *Bifidobacterium lactentis* incluyen, sin limitación, cepa de tipo *Bifidobacterium lactentis* (JCM 1220).

20 El subcultivo o cultivo de aclimatación en presencia de 5-FC se puede llevar a cabo realizando un cultivo anaeróbico a 37°C en un medio de cultivo (medio líquido o placa de agar) adecuado para el crecimiento y proliferación de bacterias u hongos, dicho medio complementado con 5-FC a una concentración en el intervalo, por ejemplo, de 2 a 5000 µg/ml, preferentemente de 2 a 2000 µg/ml.

25 Cuando los microorganismos son cultivados en un medio de cultivo complementado con 5-FC, el 5-FC es gradualmente convertido en 5-FU mediante CD, expresado junto con la proliferación del microorganismo. Por tanto, el 5-FU actúa a baja concentración en primer lugar, evitando la erradicación del microorganismo cultivado con el aumento gradual de la concentración de 5-FU. Por lo tanto, solamente los microorganismos que han obtenido una resistencia pueden ser selectivamente cultivados. De esta manera, el microorganismo resistente a 5-FU de la presente invención puede ser recolectado de forma reproducible.

30 El subcultivo o cultivo de aclimatación en presencia de 5-FU en presencia de 5-FU se puede llevar a cabo realizando un cultivo anaeróbico a 37°C en un medio de cultivo (medio líquido o placa de agar) adecuado para el crecimiento y proliferación de bacterias u hongos, complementado dicho medio con 5-FU a una concentración en el intervalo, por ejemplo, de 1 a 100 µg/ml, preferentemente de 2 a 100 µg/ml. De esta manera, puede ser recolectado de forma reproducible microorganismo resistente a 5-FU.

35 Un microorganismo que expresa CD transformado mediante la introducción de un gen de CD y un vector de expresión de CD y un transformante usado para preparar un microorganismo transformado mediante la introducción de un gen que otorga al microorganismo una capacidad de crecer en un estado anaeróbico puede ser preparado según los métodos descritos en manuales experimentales disponibles en el comercio como *Idenshi Manyuaru* (Gene Manual (Kodansha)); *Idenshi Sosa Jikkenhou* (Methods for Experiments in Gene Manipulation (ed., Yasutaka Takagi, Kodansha)); *Molecular Cloning* (Cold Spring Harbor Laboratory (1982)); *Molecular Cloning*, 2nd ed. (Cold Spring Harbor Laboratory (1989)); *Methods in Enzymology*, 194 (1991); y *Jikken Igaku bessatsu, Kobo niyoru Idenshi Jikkenhou* (Gene Experiments Using Yeasts, Experimental Medicine Suppl (Yodosha (1994))). Preferentemente, debe ser usado un vector de expresión adecuado para un microorganismo hospedante.

40 Para un ADN que codifica CD, por ejemplo, puede ser usado ADN aislado a partir de un plásmido pAdex1 CSCD (Riken Gene Bank, RDB No. 1591), que contiene un ADN que codifica una CD derivada de *E. coli*, o un plásmido pMK116, que contiene también un ADN que codifica la CD derivada de *E. coli* (D.A.Mead et al., *Protein Engineering* 1:67-74(1986)).

45 En particular, ejemplos de vectores de expresión de CD para las bacterias pertenecientes al género *Bifidobacterium* incluyen preferentemente un plásmido recombinante pBLES100-S-eCD que porta un *E. coli* *codA* insertado en dirección descendente de un promotor *hup* de *Bifidobacterium longum* (véanse el documento patente 1 y documento no patente 21), pAV001-HU-eCD, que ha sido preparado mejorando el pBLES100-S-eCD y capaz de transformar *Bifidobacterium longum* y *Bifidobacterium breve*, y mutantes de estos plásmidos.

50 Un mutante del plásmido pBLES100-S-eCD se refiere a un mutante de una secuencia de ácidos nucleicos de plásmido derivado de pBLES-S-eCD, que puede ser usado de la misma forma que pBLES100-S-eCD en la presente invención. Análogamente, los mutantes del plásmido pAV001-HU-eCD se refieren a mutantes de secuencia de ácidos nucleicos de plásmido derivado de pAV001-HU-eCD, en la que los mutantes pueden ser usados de la misma forma que pAV001-HU-eCD en la presente invención.

55 Un microorganismo resistente a 5-FU, que expresa CD de la presente invención puede crecer en un tejido tumoral anaeróbico, puede expresar CD y tiene una resistencia a 5-FU a una concentración que es al menos eficaz para una actividad antitumoral. Aunque la concentración eficaz de 5-FU para una actividad antitumoral varía dependiendo de los tejidos objetos, pacientes y similares, puede ser ilustrada la concentración de al menos 0,05 a 0,1 µg/ml.

Adicionalmente, una instrucción de una formulación de 5-FU disponible en el comercio (para inyección) describe una inyección intravenosa continua de la formulación de 5-FU que se realizó a un paciente de cáncer gástrico avanzado de forma que la concentración en sangre de 5-FU resultó ser de aproximadamente 0,6 µg/ml.

5 Para una resistencia a 5-FU más específica de un microorganismo resistente a 5-FU de la presente invención, es una capacidad para crecer cuando es anaeróbicamente cultivado a 37°C en un medio de cultivo (medio líquido o placa de agar) que contiene al menos 1 a 2000 µg/mg, preferentemente 2 a 2000 µg/ml de 5-FU.

10 Además, cuando la resistencia a 5-FU de un microorganismo resistente a 5-FU que expresa CD de la presente invención es expresada específicamente en relación a la concentración de 5-FC, es una capacidad para crecer cuando es anaeróbicamente cultivado a 37°C en un medio de cultivo (medio líquido o placa de agar) que contiene 2 a 500 µg/ml, preferentemente 3 a 5000 µg/ml de 5-FC.

15 Aunque la resistencia a 5-FU de un microorganismo resistente a 5-FU, que expresa CD de la presente invención, puede ser una capacidad para crecer cuando es anaeróbicamente cultivado a 37°C en un medio de cultivo (medio líquido o placa de agar) que contiene 5-FU a una concentración dentro del intervalo anteriormente descrito, o una capacidad para crecer cuando es anaeróbicamente cultivado a 37°C en un medio de cultivo (medio líquido o placa de agar) que contiene 5-FC a la concentración dentro del intervalo anteriormente descrito, la resistencia del
20 microorganismo resistente a 5-FU, que expresa CD, de la presente invención es una capacidad para crecer en un medio que contiene al menos 1 µg/ml o más de 5-fluorouracilo o una capacidad para crecer en un medio que contiene al menos 2 µg/ml o más de 5-fluorocitosina.

25 Un microorganismo resistente a 5-FU que expresa CD de la presente invención puede ser un microorganismo recombinante producida mediante los métodos anteriormente descritos.

Un microorganismo resistente a 5-FU que expresa CD de la presente invención puede crecer en tejidos tumorales anaeróbicos, puede expresar CD y tiene una resistencia a 5-FU a una concentración que es al menos eficaz para una actividad antitumoral y es una bacteria entérica, perteneciente a los géneros *Bifidobacterium*, *Clostridium*,
30 *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Peptococcus*, *Enterococcus*, *Bacteroides* o *Eubacterium*. Entre éstos, son más preferentemente ilustradas las bacterias pertenecientes al género *Bifidobacterium*.

Ejemplos específicos de bacterias pertenecientes al género *Bifidobacterium* incluyen *Bifidobacterium* incluyen *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium lactentis*,
35 *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium pseudolongum*, *Bifidobacterium thermophilum*, *Bifidobacterium infantis* y *Bifidobacterium animalis*. Entre estas, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium bifidum* y *Bifidobacterium infantis*, que se conocen que se alojan en el intestino humano independientemente de la edad, son preferidas. Todas estas bacterias están disponibles en el comercio o pueden ser fácilmente obtenidas a partir de instituciones de depósito. Por ejemplo, pueden ser usadas *Bifidobacterium*
40 ATCC-15707, *Bifidobacterium bifidum* ATCC-11863 y *Bifidobacterium infantis* ATCC-15697.

Ejemplos de cepas de *Bifidobacterium longum* incluyen, pero sin limitación, *Bifidobacterium longum* 105-A, *Bifidobacterium longum* aE-194b, *Bifidobacterium longum* bs-601 y *Bifidobacterium longum* M101-2. Entre estas, puede ser preferentemente citada como ejemplo *Bifidobacterium longum* 105-A.
45

Además, ejemplos de cepas de *Bifidobacterium breve* incluyen, sin limitación, la cepa tipo *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium breve* aS-1 y *Bifidobacterium breve* I-53-8W.

50 Además, ejemplos de cepas de *Bifidobacterium infantis* incluyen, sin limitación, cepa tipo *Bifidobacterium* tipo (JCM 1222) y *Bifidobacterium infantis* I-10-5.

Además, ejemplos de cepas de *Bifidobacterium lactentis* incluyen, sin limitación, cepa de tipo *Bifidobacterium lactentis* (JCM 1220).

55 Más específicamente, ejemplos preferidos que bacterias que tienen las propiedades anteriores y pertenecientes al género *Bifidobacterium* incluyen una cepa de *Bifidobacterium longum* 105-A resistente a 5-FU que expresa CD que porta el plásmido pBLES100-S-eCD o un plásmido mutante del mismo (una cepa de *Bifidobacterium longum* 105A transformada con el plásmido pBLES100-S-eCD o un plásmido mutante del mismo); una cepa de *Bifidobacterium longum* 105-A resistente a 5-FU que porta el plásmido pAV001-HU-eCD o un plásmido mutante del mismo; una cepa de *Bifidobacterium breve* aS-1 resistente a 5-FU que porta el plásmido pAV001-HU-eCD o un plásmido mutante del mismo; una cepa de *Bifidobacterium I-53-8W* resistente a 5-FU que porta el plásmido pAV001-HU-eCD o un plásmido mutante del mismo; una cepa de tipo *Bifidobacterium infantis* resistente a 5-FU que porta el plásmido pAV001-HU-eCD o un plásmido mutante del mismo y una cepa *Bifidobacterium infantis* I-10-5 resistente a 5-FU que porta el plásmido pAV001-HU-eCD o un plásmido mutante del mismo.
60
65

Un agente terapéutico de la presente invención contiene el microorganismo resistente a 5-FU, que expresa CD, de la presente invención. Además, el agente terapéutico de la presente invención puede contener uno o más tipos de un

microorganismo resistente a 5-FU, que expresa CD, de la presente invención.

La dosificación de un microorganismo resistente a 5-FU, que expresa CD, contenida en un agente terapéutico de la presente invención es una cantidad suficiente para la expresión de CD en una cantidad que pueda convertir 5-FC en una cantidad terapéuticamente eficaz de 5-FU. Sin embargo, preferentemente la dosificación debe ser tan baja como sea posible.

Un agente terapéutico de la presente invención puede contener cualquier componente opcional distinto del microorganismo resistente a 5-FU, que expresa CD, de la presente invención, en la medida en que no obstaculice el efecto de la presente invención. Estos componentes opcionales incluyen, por ejemplo, vehículos, excipientes y diluyentes farmacéuticamente aceptables. Los agentes terapéuticos de la presente invención son usados en combinación con 5-FC en una cantidad que pueda ser convertida en una cantidad eficaz de 5-FU o mediante un microorganismo resistente a 5-FU, que expresa CD, de la presente invención. Aunque puede estar contenida 5-FC en el agente terapéutico de la presente invención, es preferido usar otra composición farmacéutica que contenga 5-FC en combinación con el agente terapéutico de la presente invención. Además, el agente terapéutico de la presente invención puede ser combinado con azúcares que pueden favorecer la proliferación de los microorganismos resistentes a 5-FU, que expresan CD, de la presente invención. Ejemplos de estos azúcares incluyen lactulosa.

La expresión "combinación de X e Y" (X combinado con Y)" usada en la presente memoria descriptiva incluye los dos casos en que X e Y están en formas diferentes y en que X e Y están en la misma forma (por ejemplo, una forma que contiene X e Y). En el caso de que X e Y estén en formas diferentes, tanto X como Y pueden contener adicionalmente otros componentes.

Cuando un agente terapéutico de la presente invención es administrado a un paciente, el microorganismo resistente a 5-FU, que expresa CD de la presente invención crece en tejidos tumorales. Si se administra 5-FC mientras los microorganismos resistentes existen en el tumor, la 5-FC será convertida en 5-FU mediante la acción de CD en el tumor. El 5-FU resultante puede destruir las células tumorales. Como los microorganismos resistentes a 5-FU, que expresan CD, pueden sobrevivir en presencia de 5-FU a una concentración que puede destruir células tumorales, la actividad enzimática de CD puede ser mantenida. Por tanto, pueden ser obtenidos excelentes fármacos antitumorales que contienen los microorganismos resistentes a 5-FU, que expresan CD, de la presente invención como un ingrediente activo. Además de ello, los microorganismos resistentes a 5-FU, que expresan CD, de la presente invención no pueden sobrevivir en las partes distintas de los tejidos tumorales anaeróbicos en las que pueden crecer los microorganismos resistentes a 5-FU, que expresan CD. Por tanto, la 5-FC no se convertirá en 5-FU allí y los efectos secundarios sistémicos de 5-FU pueden ser restringidos a un nivel enormemente bajo en comparación con la administración de 5-FU por sí mismo. Además de ello, los efectos antitumorales de los agentes terapéuticos de la presente invención para tratar tumores sólidos tienen una elevada especificidad para tumores. Por tanto, se pueden conseguir niveles enormemente elevados de 5-FU en tumores en comparación con la administración de 5-FU por sí mismo, produciendo consecuentemente unos efectos antitumorales excepcionalmente excelentes.

Para una forma de dosificación de un agente terapéutico de la presente invención, se pueden citar como ejemplos una formulación líquida y una formulación sólida que contenga un microorganismo resistente a 5-FU, que expresa CD, de la presente invención. La formulación líquida puede ser preparada purificando la solución de cultivo del microorganismo resistente a 5-FU, que expresa CD, de la presente invención, añadiendo opcionalmente solución salina fisiológica adecuada o sustituto fluido, o aditivos farmacéuticos, y rellenar una ampolla o vial, etc. Para una preparación de una formulación sólida, puede ser añadida una formulación líquida con un protector adecuado, rellenar una ampolla o vial etc. y ser liofilizada o L-secada. Alternativamente, la formulación líquida puede ser añadida con un protector adecuado, liofilizada o L-secada e introducida en una ampolla o vial. Como para un método de administración de un agente terapéutico de la presente invención, la administración parenteral es preferida y pueden citarse como ejemplos la inyección subcutánea, inyección intravenosa, inyección localizada y administración intraventricular. Entre estas, la inyección intravenosa es la más preferida.

Un agente terapéutico de la presente invención es usado en combinación con 5-FC. El agente terapéutico de la presente invención y 5-FC pueden ser administrados en un mismo método de administración o en métodos diferentes, y pueden ser administrados de forma simultánea o separada. Preferentemente, la administración de 5-FC debe ser después de un agente terapéutico de la presente invención para permitir que los microorganismos resistentes a 5-FU, que expresan CD, de la presente invención, crezcan suficientemente en tejidos tumorales.

La dosificación de 5-FC usada en combinación con los agentes terapéuticos de la presente invención no está particularmente limitada en la medida en que pueda ser convertida una cantidad suficiente de 5-FC en una cantidad terapéuticamente eficaz de 5-FU por los microorganismos resistentes a 5-FU, que expresan CD, de la presente invención. Sin embargo, preferentemente debe ser tan baja como sea posible. La dosificación puede ser seleccionada apropiadamente a partir del intervalo, por ejemplo de 5 a 200 mg/kg.

Además de ello, un agente terapéutico de la presente invención puede ser usado con combinación con azúcares para favorecer la proliferación de los microorganismos resistentes a 5-FU, que expresan CD, de la presente

invención. Ejemplos de estos azúcares incluyen lactulosa. Estos azúcares pueden ser administrados como un componente de un agente terapéutico de la presente invención, o como una composición farmacéutica diferente, de forma simultánea o separada con un agente terapéutico de la presente invención.

- 5 La presente invención será explicada más específicamente haciendo referencia a los ejemplos siguientes, pero el alcance tecnológico de la presente invención no está limitado a estos ejemplos.

[Ejemplo de referencia 1]

- 10 [Producción de *Bifidobacterium longum* que expresa CD]

El *Bifidobacterium longum* que expresa CD se produjo como se describe en la solicitud de patente japonesa nº 2004-339677.

- 15 1. Construcción de vector pAV001 de lanzamiento

(Construcción del plásmido)

- 20 Una secuencia que incluye gen que codifica espectinomicina adeniltransferasa (cassette AAD) de *Enterococcus faecalis* fue amplificada mediante PCR a partir de pBLES100, que es un vector de lanzamiento de *Bifidobacterium longum* y *E. coli* (véanse el documento patente 2 y documento no patente 23) y subclonada en vector pCR-BluntII-TOPO (Invitrogen) para preparar pCRTOPO-Scal-ADD-Eam1105I. Se añadieron sitios de restricción Scal y Eam1105I a cebadores directos e inversos, respectivamente.

- 25 Como se muestra en la figura 1, un vector de clonación pGFPuv (DEFINICIÓN: vector de clonación pGFPuv. ACCESO: U62636; VERSIÓN: U62636.1 GI: 1490528) adquirido de la entidad Invitrogen está compuesto por gen GFPuv con sitios de clonación múltiple (MCS) en los dos extremos del gen, un gen de resistencia a la ampicilina, y un origen de replicación de plásmido de *E. coli*.

- 30 El gen de resistencia a la ampicilina en el pGFPuv fue extraído escindiendo con enzimas de restricción Eam1105I y Scal para producir un fragmento largo. Análogamente, fue scindido pCRTOPO-Scal-ADD-Eam1105I con Eam1105I y Scal para producir un fragmento (aproximadamente 1100 bp) que contiene un cassette AAD. Estos dos fragmentos fueron ligados mediante T4 ADN ligasa para producir pGFPuv-SpR. La adición de propiedad de resistencia a la espectinomicina y la pérdida de resistencia a la ampicilina en el pGFPuv-SpR están respectivamente confirmadas en
- 35 *E. coli*.

- El pGFPuv-SpR fue digerido con enzimas de restricción Sall (ubicadas en el sitio de clonación múltiple en dirección ascendente del gen GFPuv) y SpeI (ubicado en el sitio de clonación múltiple en dirección descendente del gen GFPuv) para producir plásmido pAVN que está desprovisto de gen GFPuv.
- 40

- Una secuencia de aproximadamente 1900 bp que contiene repeticiones con elevado contenido de RepB, SDO, DDO, AT y restos de unión de DnaA fue identificada como una unidad de replicación de plásmidos de *Bifidobacterium longum* a partir de la información de la secuencia de nucleótidos completa del plásmido pTB6 derivada de *Bifidobacterium longum*. La secuencia de aproximadamente 1900 bp que contiene la unidad de replicación de plásmido fue amplificada mediante PCR a partir de pTB6 y subclonada en vector pCR-BluntII-TOPO para producir pCRTOPO-Apal-1900-Scal. Los sitios de reconocimiento de enzimas de restricción de Apal y Scal fueron añadidos a cebadores directos e inversos, respectivamente.
- 45

- Un fragmento largo producido digiriendo pAVN con enzimas de restricción Apal y Scal (aproximadamente 2400 bp) y un fragmento corto producido digiriendo análogamente pCRTOPO-APAI-1900-Scal (aproximadamente 1900 bp) fueron ligados conjuntamente usando T4 ADN ligasa para producir un *Bifidobacterium longum*-vector pAV001 de lanzamiento de *E. coli* (aproximadamente 4300 bp).
- 50

- 55 2. Vector de expresión génica de CD pAV001-HU-eCD

(Construcción de vector de expresión)

- Seguidamente, fue escindido pBLES100-S-eCD con enzimas de restricción Hinc III y SpeI para extraer un fragmento de aproximadamente 2900 bp que contiene un promotor génico HU, un gen de CD derivado de *E. coli* y un terminador génico HU. Análogamente, el vector pAV001 de lanzamiento fue extraído con enzimas de restricción HindIII y SpeI en los sitios de restricción en el sitio de clonación múltiple. El fragmento largo obtenido y el fragmento de aproximadamente 2900 bp anterior fueron ligados usando T4 ADN ligasa para producir pAV001-HU-eCD (aproximadamente 7100 bp).
- 60

- 65 3. Introducción del vector de expresión génica de CD pAV001-HU-eCD en el género *Bifidobacterium*

Se cultivó *Bifidobacterium longum* de tipo salvaje en medio MRS a 37°C bajo condiciones anaeróbicas y el medio de

cultivo resultante se centrifugó para aislar las células bacterianas, que seguidamente se pusieron en suspensión en un tampón apropiado para preparar una suspensión bacteriana. Seguidamente, el vector de expresión pAV001HU-eCD del gen de citosina-desaminasa fue introducido en las células en la suspensión bacteriana mediante el método de electroporación descrito en el documento no patente 23. Se seleccionó *Bifidobacterium longum* recombinante transformado (*Bifidobacterium longum*/pAV01-HU-eCD) basado en la formación de colonias en medio de agar que contenía el antibiótico espectinomicina.

(Expresión de citosina desaminasa en *Bifidobacterium longum* recombinante)

10 *Bifidobacterium longum*/pAV02-HU-eCD y *Bifidobacterium longum* tipo salvaje fueron subcultivados, respectivamente, en medio MRS que contiene el antibiótico espectinomicina a 37°C bajo condiciones anaeróbicas durante dos o más días. Las células bacterianas fueron separadas (1×10^9 CFU) del medio de cultivo mediante centrifugación, y fueron seguidamente sometidas a ultrasonidos y a continuación sometidas a extracción de proteínas intracelulares, respectivamente. Las proteínas extraídas fueron separadas mediante electroforesis de gel de SDS-poliacrilamida. La expresión de una proteína de citosina desaminasa fue confirmada mediante transferencia Western usando anticuerpo monoclonal anti-citosina desaminasa de conejo (Sawaday Technology) como el anticuerpo e inmunoglobulina Ge de conejo conjugada a peroxidasa de rabanillo (Santa Cruz Biotechnology, Inc) como el anticuerpo secundario. Las señales fueron visualizadas mediante el sistema ECL y detectadas como señales luminiscentes con una cámara CCD enfriada Fluoro-S-MAX (BIO-RAD). Las señales fueron detectadas a partir de *Bifidobacterium longum* (pAV001-HU-eCD), mostrando la expresión de proteínas de citosina desaminasa, mientras que no se detectó ninguna señal a partir de *Bifidobacterium longum* tipo salvaje, mostrando la no expresión de citosina desaminasa (véase la figura 2).

(Medición de actividad enzimática de citosina desaminasa (actividad de conversión 5-FC→5-FU) en *Bifidobacterium longum*/pAV001-HU-eCD.)

30 *Bifidobacterium longum*/pAV001-HU-eCD y *Bifidobacterium longum* de tipo salvaje fueron respectivamente subcultivados en medio MRS que contenía el antibiótico espectinomicina a 37°C bajo condiciones anaeróbicas durante dos o más días. Las células bacterianas fueron separadas de la solución de cultivo por centrifugación (2×10^9 CFU), se volvieron a poner en suspensión en 4,5 ml de medio MRS y se añadieron 0,5 ml de 5-FC (20 mg/ml) hasta la concentración final de 2 mg/ml y seguidamente se cultivó a 37°C bajo condiciones anaeróbicas. Después de 0, 4, 8, 18 y 24 horas, las soluciones de cultivo se centrifugaron y las materias sobrenadantes se recogieron y se separaron de ellas las células bacterianas. La concentración de 5-FU convertido en las materias sobrenadantes se midió mediante análisis de cromatografía de gases (métodos GC-MS de 5-FU, MBL). El perfil de recuento de células viables frente al tiempo se muestra en la figura 3. Las concentraciones de 5-FU se muestran en la figura 4. Como consecuencia, en *Bifidobacterium longum*/pAV001-HU-eCD, se detectó 5-FU en 39,2 µg/ml después de 4 horas y en 102,1 µg/ml después de 24 horas, mientras que se detectó una cantidad extremadamente baja de 5-FU en *Bifidobacterium* de tipo salvaje.

40 Ejemplo 1

[Microorganismos resistentes a 5-FU de *Bifidobacterium longum*/pAV001-HU-eCD]

45 *Bifidobacterium longum*/pAV001-HU-eCD obtenido en el ejemplo de referencia 1 fue inoculado en 5 ml de medio MRS que contenía el antibiótico espectinomicina y 50 µm/ml de 5-FC, seguido de cultivo anaeróbico a 37°C durante 72 horas. Seguidamente, se inoculó análogamente 1 ml de medio de cultivo en 9 ml de medio MRS que contenía el antibiótico espectinomicina y 50 µg/ml de 5-FC, y se cultivó durante 24 horas bajo las mismas condiciones. Esta etapa de inoculación se repitió tres tandas para producir el *Bifidobacterium longum*/pAV001-HU-eCD resistente a 5-FU. Seguidamente, el crecimiento resistente a 5-FU del *Bifidobacterium longum*/pAV001-HU-eCD resistente a 5-FU producido se confirmó inoculando en medio MRS que contenía 20 µg/ml de 5-FU y el antibiótico espectinomicina y cultivando durante 24 horas bajo las mismas condiciones de cultivo que anteriormente. Seguidamente, las bacterias se pusieron en suspensión con glicerol y se almacenaron a -80°C mientras haya existencias de glicerol. La muestra de bacterias almacenada y el *Bifidobacterium longum* de tipo salvaje fueron inoculados respectivamente en medios MRS que contiene 250 µg/ml de 5-FU y se compararon el antibiótico espectinomicina y sus crecimientos. El crecimiento de bacterias a partir de la muestra almacenada se observó al día siguiente, indicando el mantenimiento de resistencia a 5-FU, mientras que el tipo salvaje no creció. Los recuentos de células viables del cultivo bacteriano posterior al cultivo se determinaron mediante el método de recuento de placas. El recuento de células viables fue de 2 a 3×10^9 CFU/ml para el cultivo bacteriano de la muestra almacenada, mientras que el de tipo salvaje estuvo por debajo del límite de detección (por debajo de 10^3 CFU/ml).

[Medición de concentración de 5-FU, a la que el *Bifidobacterium longum* resistente a 5-FU es resistente]

65 *Bifidobacterium longum*/pAV001-HU-eCD resistente a 5-FU anteriormente obtenida y *Bifidobacterium longum* de tipo salvaje fueron respectivamente subcultivados en medio MRS a 37°C bajo condiciones anaeróbicas durante dos o más días. La solución cultivada se diluyó con diluyente anaeróbico, se extendió en medio de agar BL que contenía 0, 25, 50, 100, 250, 500, 1000 ó 2000 µg/ml de 5-FU y se cultivó anaeróticamente a 37°C durante 2 ó 3 días. Seguidamente, se determinaron los recuentos de células viables. Los experimentos usando agar BL exento de 5-FU

5 se realizaron por quintuplicado y los otros experimentos usando medios de agar BL que contienen 5-FU se realizaron por triplicado. Los resultados se muestran en las tablas 1 (Bifidobacterium longum/pAV001-HU-eCD resistente a 5-FU) y 2 (Bifidobacterium longum de tipo salvaje). Como se muestra en la tabla 1, el Bifidobacterium longum/pAV001-HU-eCD resistente a 5-FU tiene una resistencia a 5-FU, cuya concentración es al menos de 2000 µg/ml. Por el contrario, el Bifidobacterium de tipo salvaje no creció en presencia de 5-FU a una concentración de al menos 25 µg/ml o más (tabla 2).

[Tabla 1]. Bifidobacterium longum/pAV001-HU-eCD resistente a 5-FU

Contenido de 5-FU (µg/ml)	1	2	3	4	5	Media	d.t.	CV (%)	Velocidad de crecimiento (%)
0	144	126	175	138	165	149,6	20,0	13,4	
25	116	148	124			129,3	16,7	12,9	86%
50	129	129	128			128,7	0,6	0,4	86%
100	118	139	107			121,3	16,3	13,4	81%
250	100	107	114			107,0	7,0	6,5	72%
500	175	116	153			148,0	29,8	20,1	99%
1000	168	123	147			146,0	22,5	15,4	98%
2000	127	128	124			126,3	2,1	1,6	84%

d,t.: desviación típica

10 CV: coeficiente de variación

[Tabla 2]. Bifidobacterium de tipo salvaje

Contenido de 5-FU (µg/ml)	1	2	3	4	5	Media	d.t.	CV (%)	Velocidad de crecimiento (%)
0	108	117	104	126	137	118,4	13,43	11,34	
25	0	0	0			0,0	0,0	-	0%
50	0	0	0			0,0	0,0	-	0%
100	0	0	0			0,0	0,0	-	0%
250	0	0	0			0,0	0,0	-	0%
500	0	0	0			0,0	0,0	-	0%
1000	0	0	0			0,0	0,0	-	0%
2000	0	0	0			0,0	0,0	-	0%

d,t.: desviación típica

15 CV: coeficiente de variación

[Mantenimiento de tratamiento resistente a 5-FU en Bifidobacterium longum resistente a 5-FU]

20 El Bifidobacterium longum/pAV001-HU-eCD resistente a 5-FU anteriormente obtenido fue subcultivado anaeróticamente en medio MRS que contenía el antibiótico espectinomicina a 37°C durante dos o más días. Se inocularon 5 µl de la solución cultivada en 5 ml de medio MRS que estaba exento del antibiótico espectinomicina y se cultivó anaeróticamente a 37°C durante 24 horas. La solución cultivada fue análogamente subcultivada durante 30 días continuamente. Después del subcultivo continuo de 30 días, la solución cultivada se diluyó con un diluyente anaeróbico, se extendió en medio de agar BL que contenía 250 µ/ml de 5-FU o medio de agar BL exento de 5-FU y se cultivó anaeróticamente a 37°C durante 2 ó 3 días. Seguidamente se determinaron recuentos de células viables. 25 Los experimentos se realizaron por quintuplicado. Los resultados se muestran en la tabla 3. Como se muestra a partir de la tabla 3, el tratamiento resistente a 5-FU o Bifidobacterium longum resistente a 5-FU se mantuvo al menos después de un subcultivo continuo de 30 días.

[Tabla 3]

Contenido de 5-FU (µg/ml)	1	2	3	4	5	Media	d.t.	CV (%)	Velocidad de crecimiento (%)
0	146	197	134	153	149	155,8	24,10	15,47	
250	166	152	124	137	194	154,6	27,09	17,52	99%

d,t.: desviación típica
CV: coeficiente de variación

5 [Cultivo de *Bifidobacterium longum* resistente a 5-FU y *Bifidobacterium longum* no resistente a 5-F/ en medios líquidos que contienen 5-FC]

10 El *Bifidobacterium longum*/pAV001-HU-eCD obtenido en el ejemplo 1 (*Bifidobacterium longum* no resistente a 5-FU) y el *Bifidobacterium longum*/pAV001-HU-eCD anteriormente obtenido (*Bifidobacterium longum* resistente a 5-FU) fueron respectivamente subcultivados bajo condiciones anaeróbicas a 37°C en medios MRS que contenían el antibiótico espectinomina durante dos o más días. Seguidamente se inocularon 50 µl de cada una de las soluciones cultivadas en medios MRS que contenían 5-FC a la concentración de 5, 25, 50, 100, 250 ó 500 µg/ml y se cultivaron a 37°C bajo condiciones anaeróbicas durante 24 horas. Después del cultivo, se determinó el crecimiento de cada bacteria midiendo la turbidez de la solución posterior al cultivo (OD = 600 nm) (tabla 4). El crecimiento de *Bifidobacterium longum* no resistente a 5-FU fue apreciablemente inhibido en medios que contenían 15 50 µg/ml o más de 5-FC. Por el contrario, el *Bifidobacterium longum* resistente a 5-FU creció para todas las concentraciones de 5-FC.

[Tabla 4]

Medición de la turbidez (OD = 600nm)		Contenido de 5-FC (µg/ml)					
		5	25	50	100	250	500
Ejemplo de referencia 1	<i>Bifidobacterium longum</i> no resistente a 5-FU	6,43	4,29	1,92	0,68	0,19	0,09
Ejemplo 1	<i>Bifidobacterium longum</i> resistente a 5-FU	5,73	5,38	4,11	5,41	5,15	4,29

20 **Ejemplo 2**

[Bacterias resistentes a 5-FU de *Bifidobacterium longum*/pAV001-HU-eCD producido mediante el uso de medios que contienen 5-FU]

25 Se inoculó *Bifidobacterium longum* en 50 ml de medio MRS que contenía 1, 5, 10, 50, 100 ó 500 µg/ml de 5-FU y se cultivó anaeróbicamente a 37°C durante uno a cinco días. Se midieron las turbideces (OD = 600 nm) para cada cultivo para examinar el crecimiento (tabla 5). Para el medio que contenía 500 µg/ml de 5-FU, no se observó ningún crecimiento incluso después de 5 días y no pudo obtenerse cepa de bacteria resistente. Para otros medios, en lo que se observó el crecimiento, se inoculó 1 ml de cada medio posterior al cultivo en 9 ml de medios MRS que contenía la misma concentración de 5-FU y se cultivó durante 24 horas bajo las mismas condiciones de cultivo. Esta etapa de inoculación se repitió tres tandas para producir *Bifidobacterium longum* resistente a 5-FU en cada concentración de 5-FU. Seguidamente, se inoculó cada *Bifidobacterium longum* resistente a 5-FU en medios MRS. Cada solución posterior al cultivo fue inoculada en medios MRS que contenían 250 µg/ml de 5-FU. Después de 24 horas de incubación, se midieron turbideces (OD = 60 nm) para determinar el crecimiento (tabla 6). Como consecuencia, el *Bifidobacterium longum* resistente a 5-FU producido a partir de medios que contienen 1 a 100 35 µg/ml de 5-FU tienen el mismo nivel de resistencia 5-FU que la cepa resistente a 5-FU obtenida en el ejemplo 1.

[Tabla 5]

OD = 600 nm		Concentración de 5-FU usada para otorgar resistencia (µg/ml)						
		1	5	10	50	100	500	1000
Días de cultivo	1	4,94	0,22	0,09	0,00	-0,05	-0,05	-0,06
	2	4,94	4,39	5,51	0,44	0,01	-0,07	-0,08
	3	4,94	4,39	5,51	4,99	0,12	-0,08	-0,06
	4	4,94	4,39	5,51	4,99	5,88	0,07	0,01
	5	4,94	4,39	5,51	4,99	5,88	0,08	0,02

40 [Tabla 6]

Velocidad de crecimiento de cepas resistentes a 5-FU	Concentración de 5-FU usada para otorgar resistencia (µg/ml)						
	1	5	10	50	100	500	1000
	20%	55%	62%	90%	95%	0%	0%

Las cepas resistentes a 5-FU obtenidas en el ejemplo 2 fueron transformadas mediante el mismo método que el ejemplo de referencia 1 y se confirmó la expresión de citosina desaminasa. Las cepas resistentes a 5-FU, que

expresan citosina desaminasa producidas tienen una resistencia a 5-FU análogamente a las cepas resistentes a 5-FU obtenidas en el ejemplo 1. Además, la resistencia a 5-FU se mantuvo durante al menos 7 días o más.

Ejemplo 3

5

Bacterias resistentes a 5-FU o *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium infantis* y *Bifidobacterium lactentis*

Se produjeron cepas resistentes a 5-FU a partir de *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium infantis* y *Bifidobacterium lactentis* mediante el mismo método del ejemplo 1. Una lista de cepas de *Bifidobacterium* resistentes a 5-FU se muestra en la tabla 7 siguiente.

10

[Tabla 7]

Lista de cepas de resistencia requerida producidas mediante el mismo método que el del ejemplo 1		
Especia	Cepa	Plásmido introducido
<i>B. longum</i>	105-A	pBLES100-S-eCD
<i>B. longum</i>	105-A	pAV001-HU-eCD
<i>B. longum</i>	aE-194b	pAV001-HU-eCD
<i>B. longum</i>	bs-601	pAV001-HU-eCD
<i>B. longum</i>	M101-2	pAV001-HU-eCD
<i>B. lactentis</i>	Cepa tipo JCM1220	pAV001-HU-eCD
<i>B. infantis</i>	Cepa tipo JCM1222	pAV001-HU-eCD
<i>B. infantis</i>	I-10-5	pAV001-HU-eCD
<i>B. breve</i>	Cepa tipo JCM1192	pAV001-HU-eCD
<i>B. breve</i>	aS-1	pAV001-HU-eCD
<i>B. breve</i>	I-53-8W	pAV001-HU-eCD

Aplicabilidad industrial

15

La presente invención hace posible producir fácilmente microorganismos resistentes a 5-FU, como bacterias pertenecientes al género *Bifidobacterium*, que contienen actividad de CD y que muestran resistencia a 5-FU, que son muy útiles para una terapia de enzimas/profármacos que emplea CD/5-FC. Por ejemplo, después de la administración de las bacterias pertenecientes al género *Bifidobacterium* que muestran actividad de CD y que muestran resistencia a 5-FU para un paciente de cáncer, las bacterias pertenecientes al género *Bifidobacterium* proliferan en tumores. Si se administra 5-FC por vía oral mientras existen las bacterias en tumores, la 5-FC será absorbida a través del tracto intestinal y convertida en 5-FU por la actividad de CD en tumores y el 5-FU resultante destruirá las células tumorales. Sin embargo, las bacterias resistentes a 5-FU pertenecientes al género *Bifidobacterium* pueden sobrevivir en presencia de 5-FU a una concentración que es suficientemente elevada para destruir células tumorales y puede mantener la actividad enzimática de CD. Por lo tanto, puede ser obtenido un excelente fármaco antitumoral que contiene las bacterias pertenecientes al género *Bifidobacterium* como un ingrediente activo.

20

25

30

La 5-FC no se convertirá en 5-FU en lugares distintos de tumores en los que prolifera un microorganismo resistente a 5-fluorouracilo, que expresa CD, de la presente invención. Por tanto, los efectos adversos de 5-FU pueden ser considerablemente suprimidos en un nivel bajo, en comparación con la administración de 5-FU por sí mismo. Además, un agente terapéutico para tratar tumores sólidos de acuerdo con la presente invención tiene efectos antitumorales de elevada especificidad para tumores. Por lo tanto, el agente puede conseguir una concentración apreciablemente elevada de 5-FU en tumores, dando lugar a excelentes efectos antitumorales.

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir una bacteria entérica anaeróbica resistente a 5-fluorouracilo que puede crecer en tejidos tumorales anaeróbicos, que expresa citosina desaminasa y que tiene resistencia a 5-fluorouracilo a una concentración al menos eficaz para una actividad antitumoral, en el que un gen de citosina desaminasa es introducido en una bacteria entérica que puede crecer en tejidos tumorales anaeróbicos y que no tiene un gen de citosina desaminasa, para obtener una bacteria que expresa citosina desaminasa transformada, y un subcultivo o cultivo de aclimatación de la bacteria que expresa citosina desaminasa transformada se realiza repitiendo al menos tres tandas de cultivo con un medio complementado con 2 a 5000 $\mu\text{g/ml}$ de 5-fluorocitosina durante al menos 24 horas.
2. El método para producir una bacteria resistente según la reivindicación 1, en que la bacteria entérica que no tiene un gen de citosina desaminasa es una bacteria perteneciente al género *Bifidobacterium*.
3. El método para producir una bacteria resistente según la reivindicación 2, en que la bacteria perteneciente al género *Bifidobacterium* es *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium breve* o *Bifidobacterium infantis*.
4. El método para producir una bacteria resistente según la reivindicación 3, en que la bacteria perteneciente al género *Bifidobacterium* es *Bifidobacterium longum*.
5. Un método para producir una bacteria entérica anaeróbica resistente a 5-fluorouracilo que puede crecer en tejidos tumorales anaeróbicos, que expresa citoquina desaminasa y que tiene una resistencia a 5-fluorouracilo a una concentración al menos eficaz para una actividad antitumoral, en que el método comprende:
- (1) realizar un subcultivo o cultivo de aclimatación de una bacteria entérica que puede crecer en tejidos tumorales anaeróbicos y que no tiene un gen de citosina desaminasa, repitiendo al menos tres tandas de cultivo con un medio complementado con 1 a 100 $\mu\text{g/ml}$ de 5-fluorouracilo durante al menos 24 horas para producir una bacteria resistente a 5-fluorouracilo, y
- (2) transformar la bacteria resistente a 5-fluorouracilo producida en el apartado (1) anterior introduciendo un gen de citosina desaminasa.
6. El método para producir una bacteria resistente según la reivindicación 5, en el que la bacteria entérica que no tiene un gen de citosina desaminasa es una bacteria perteneciente al género *Bifidobacterium*.
7. El método para producir una bacteria resistente según la reivindicación 6, en el que la bacteria perteneciente al género *Bifidobacterium* es *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium breve* o *Bifidobacterium infantis*.
8. El método para producir una bacteria resistente según la reivindicación 7, en que la bacteria perteneciente al género *Bifidobacterium* es *Bifidobacterium longum*.
9. Una bacteria entérica anaeróbica resistente a 5-fluorouracilo que puede crecer en tejidos tumorales anaeróbicos, en que un gen que expresa citosina desaminasa ha sido introducido y que puede crecer en un medio complementado con al menos 2 $\mu\text{g/ml}$ de 5-fluorocitosina o al menos 1 $\mu\text{g/ml}$ de 5-fluorouracilo, en que la bacteria es un a cepa de *Bifidobacterium longum* 105-A que porta el plásmido pAV001-HU-eCD, como se muestra en la figura 1.
10. Una bacteria entérica anaeróbica resistente a 5-fluorouracilo que puede crecer en tejidos tumorales anaeróbicos, en que ha sido introducido un gen que expresa citosina desaminasa y que puede crecer en un medio complementado con al menos 2 $\mu\text{g/ml}$ de 5-fluorocitosina o al menos 1 $\mu\text{g/ml}$ de 5-fluorouracilo, en que la bacteria es una cepa de tipo *Bifidobacterium breve* que porta el plásmido pAV001-HU-eCD, como se muestra en la figura 1.
11. Una bacteria entérica anaeróbica resistente a 5-fluorouracilo que puede crecer en tejidos tumorales anaeróbicos, en que ha sido introducido un gen que expresa citosina desaminasa y que puede crecer en un medio complementado con al menos 2 $\mu\text{g/ml}$ de 5-fluorocitosina o al menos 1 $\mu\text{g/ml}$ de 5-fluorouracilo, en que la bacteria es una cepa de *Bifidobacterium breve* aS-1 que porta el plásmido pAV001-HU-eCD, como se muestra en la figura 1.
12. Una bacteria entérica anaeróbica resistente a 5-fluorouracilo introducida que puede crecer en tejidos tumorales anaeróbicos, en que ha sido introducido un gen que expresa citosina desaminasa y que puede crecer en un medio complementado con al menos 2 $\mu\text{g/ml}$ de 5-fluorocitosina o al menos 1 $\mu\text{g/ml}$ de 5-fluorouracilo, en que la bacteria es una cepa *Bifidobacterium breve* *Bifidobacterium breve* I-53-8W que porta el plásmido pAV001-HU-eCD, como se muestra en la figura 1.
13. Una bacteria entérica anaeróbica resistente a 5-fluorouracilo que puede crecer en tejidos tumorales anaeróbicos, en que ha sido introducido un gen que expresa citosina desaminasa y que puede crecer en un medio complementado con al menos 2 $\mu\text{g/ml}$ de 5-fluorocitosina o al menos 1 $\mu\text{g/ml}$ de 5-fluorouracilo, en que la bacteria es una cepa de tipo *Bifidobacterium infantis* que porta el plásmido pAV001-HU-eCD, como se muestra en la figura 1.

14. Una bacteria entérica anaeróbica resistente a 5-fluorouracilo que puede crecer en tejidos tumorales anaeróbicos, en que ha sido introducido un gen que expresa citosina desaminasa y que puede crecer en un medio complementado con al menos 2 µg/ml de 5-fluorocitosina o al menos 1 µg/ml de 5-fluorouracilo, en que la bacteria es una cepa *Bifidobacterium infantis* I-10-5 que porta el plásmido pAV001-HU-eCD, como se muestra en la figura 1.
- 5
15. Un agente terapéutico para ser usado en el tratamiento de tumores sólidos, que comprende la bacteria entérica anaeróbica resistente a 5-fluorouracilo según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 14.
- 10
16. El agente terapéutico para ser usado en el tratamiento de tumores sólidos según la reivindicación 15, combinado con 5-fluorocitosina.
17. El agente terapéutico para tratar un tumor sólido según las reivindicaciones 15 ó 16, adicionalmente combinado con lactulosa.

Fig. 1

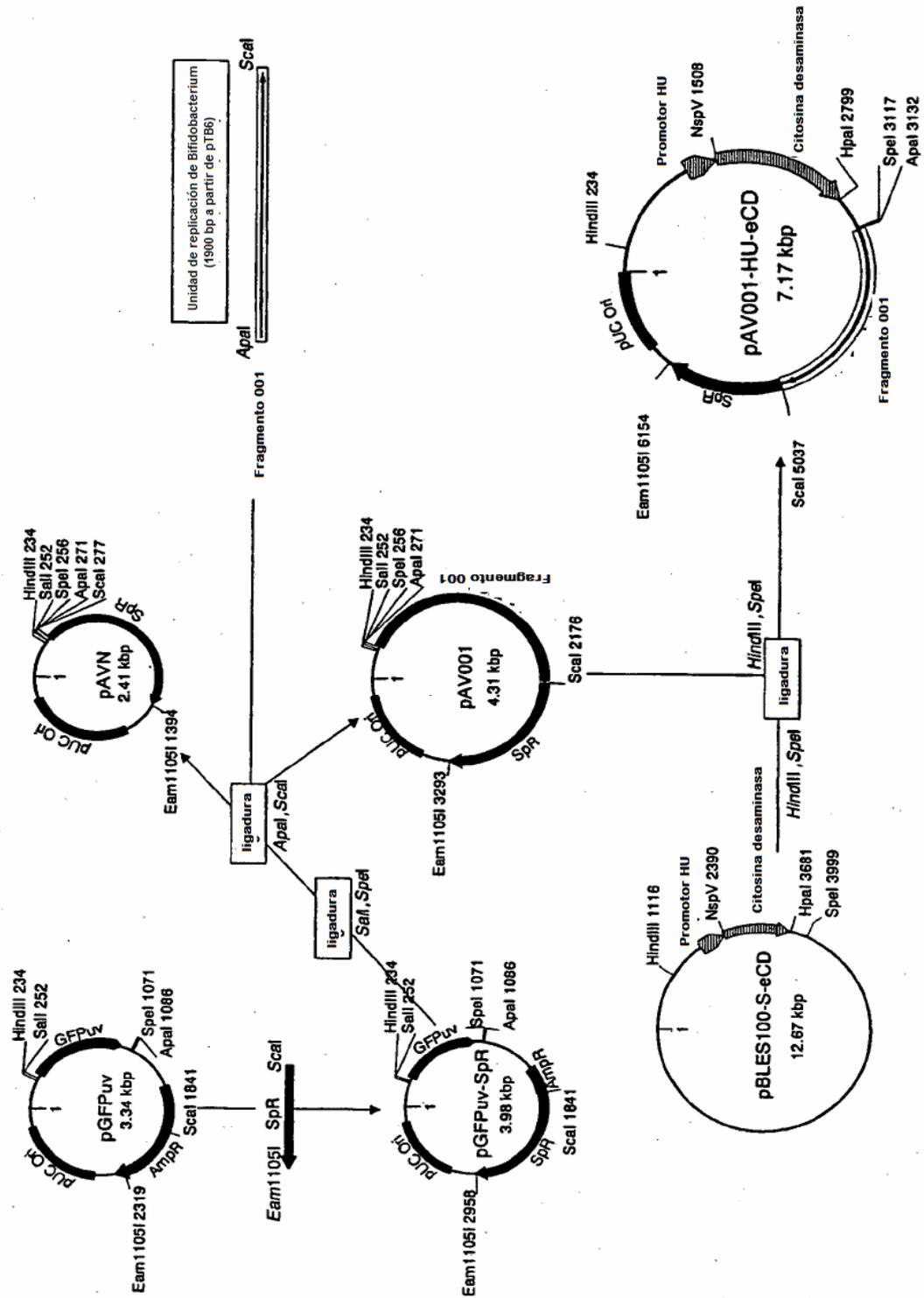
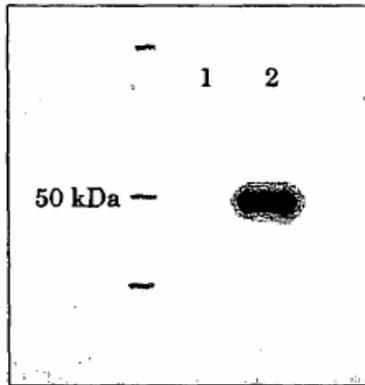


Fig. 2



1. *Bifidobacterium longum* de tipo salvaje
2. *Bifidobacterium longum*/pAV001-HU-eCD

Fig. 3

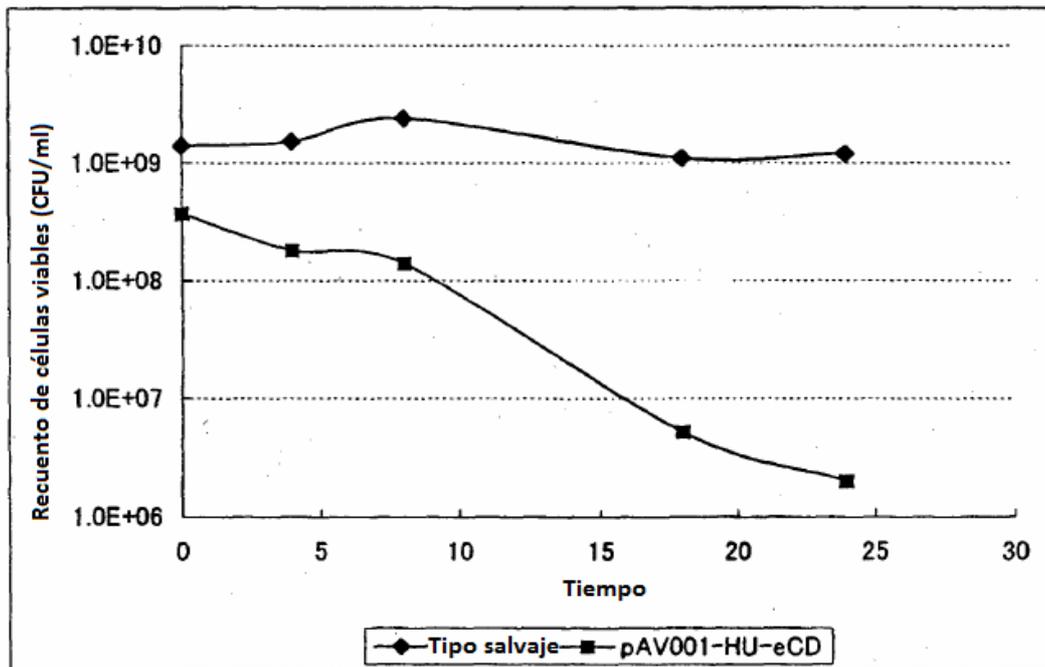


Fig.4

