

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 513 440**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/86** (2006.01)

**C12N 15/03** (2006.01)

**C12N 15/37** (2006.01)

**A61K 39/12** (2006.01)

**C12N 15/74** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.01.2010 E 10729333 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.07.2014 EP 2386645**

54 Título: **Vector de alta expresión constitutivamente estable para preparar vacuna contra el VPH y bacterias de ácido láctico recombinante transformadas de ese modo**

30 Prioridad:

**08.01.2009 KR 20090001510**

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

**27.10.2014**

73 Titular/es:

**BIOLEADERS CORPORATION (50.0%)**

**559 Yongsan-dong Yuseong-gu**

**Daejeon 305-500, KR y**

**KOOKMIN UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC**

**COOPERATION FOUNDATION (50.0%)**

72 Inventor/es:

**SUNG, MOON-HEE;**

**POO, HARYOUNG y**

**LEE, IL HAN**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

ES 2 513 440 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

Vector de alta expresión constitutivamente estable para preparar vacuna contra el VPH y bacterias de ácido láctico recombinante transformadas de ese modo.

**Campo técnico**

5 La presente invención se refiere a un vector de expresión de superficie para preparar vacunas terapéuticas contra el VPH, en que el vector de expresión de superficie contiene un gen que codifica una proteína mutante repE que tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 1, un activador, un gen de complejo poli-gamma-glutamato sintetasa y un gen que se liga con el gen de complejo poli-gamma-glutamato sintetasa y codifica una proteína antígeno asociada por inducción a tumores de virus del papiloma humano.

**10 Antecedentes**

Se sabe que la producción de proteínas extrañas útiles en intentos para expresar grandes cantidades de las proteínas extrañas depende del número de copias de los genes, esto es, el número de plásmidos y la concentración de activadores que se usan para controlar la transcripción. Se indicó que la expresión de proteínas diana se puede aumentar cambiando el número de vectores plásmido en bacterias individuales, además de activadores de alta expresión que se usan convencionalmente con frecuencia (Tomio, M. et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 28: 170, 1.988). También, se indicó que las mutaciones de RepE en el plásmido mini-F pueden cambiar el número de 25 plásmidos en bacterias individuales (Yasuo, K. et al., *J. Biol. Chem.*, 267: 11.520, 1.992).

Se estima que el virus del papiloma humano (VPH) infecta a más del 50% de los adultos en el mundo. En particular, se indicó que cuatro tipos de VPH incluyendo VPH 16, 18, 31 y 45 causan más del 80% de los casos de cáncer cervical (Lowy, D. R. et al., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 91: 2.436, 1.994).

El cáncer cervical es el segundo cáncer más común en la mujer a continuación del cáncer de mama y según la OMS (Organización Mundial de la Salud), se estima que tienen lugar más de 500.000 nuevos casos de cáncer cervical en el mundo cada año y más de 300.000 pacientes en el mundo cada año mueren de cáncer cervical. Especialmente en los países en desarrollo, el cáncer cervical es una causa principal de muerte en la mujer (Pisani, P. et al., *Int. J. Cancer*, 55: 891, 1.993). El informe de la IARC mostró que el número de pacientes por infección por VPH crónicos en los países en desarrollo es significativamente mayor que en los países avanzados y que la manera más eficaz para erradicar la infección por el VPH es administrar vacunas profilácticas contra el VPH.

El desarrollo de vacunas asociadas al cáncer cervical se ha centrado en dos tipos de vacunas profilácticas y vacunas terapéuticas. Las vacunas profilácticas pretenden producir un anticuerpo de neutralización más fuerte por antígeno L1/L2 de VPH, evitando así un huésped de infección por VPH y evitando que la enfermedad progrese más, incluso si ya está infectado. Por otra parte, la vacuna terapéutica fija como objetivo E6/E7 de VPH y pretende inducir inmunorespuestas celulares específicas para degenerar lesiones formadas o tumores malignos.

Debido a que la proteína E6/E7 de VPH es un antígeno específico del cáncer asociado a la carcinogénesis de células infectadas por VPH, se han continuado los estudios sobre el uso de la proteína E6/E7 como una diana para inmunoterapia de cáncer cervical. Por supuesto, hay un informe de que cuando se administró una proteína E6/E7 de VPH en un sistema microbiano a ratones a los que se inyectaron células tumorales, se inhibió o retardó la formación de tumores (Gao, L. et al., *J. Gen. Virol.*, 75: 157, 1.994, Meneguzzi, G. et al., *Virology*, 181: 62, 1.991). Sin embargo, en el caso en que se usen vacunas de virus vivos, pueden surgir problemas asociados a una excesiva replicación vírica, similar a otros casos. Así, las vacunas de virus vivos se usan sólo para fines de investigación en muchos casos y presentan desventajas por que lleva un largo periodo de tiempo para que se comercialicen y requieren considerables estudios clínicos.

Mientras tanto, los estudios sobre el desarrollo de vacunas incluyendo vectores bacterianos también se han estado realizando activamente y hay un informe de que VLP de VPH 16 sintetizado en *Salmonella typhimurium* atenuado induce la producción de anticuerpos específicos del antígeno en la mucosa o el cuerpo completo de los ratones (Denis, N. et al., *Infection and immunity*, 65: 3.328, 1.997). En el caso de vacunas que constan de péptidos sintéticos, sólo se sintetizan epítopos requeridos para inducir inmunorespuestas para vacunación y ya se han elucidado epítopos que causan respuestas a linfocito T citotóxico (CTL, por sus siglas en inglés) para E6/E7 de VPH 16 (Ressing, M. E. et al., *J. Immunol.*, 154: 5.934, 1.995).

Además de dichos intentos, se están realizando estudios sobre usar verduras transgénicas mismas (obtenidas de verduras incluyendo tomate y patata) como vacunas orales o vacunas comestibles para producir antígenos víricos en las plantas. Ejemplos específicos de las mismas incluyen partículas de antígeno de superficie de hepatitis B (Thavala Y. F. y Artzen, C. J., *Pro. Natl. Acad. Sci. USA.*, 92: 3.358, 1.995) y las proteínas L1 y L2 de la cápside de virus del papiloma (Patente Coreana N° Registro 0366608). Sin embargo, los sistemas vegetales presentan un problema por que el uso comercial de los mismos es limitado, debido a que la cantidad de proteína L1 de VPH expresada es pequeña y tienen lugar problemas asociados a la purificación.

La entrada de la base de datos recuperada de EBI n° de acceso UNIPROT: Q52249 describe el plásmido beta 1 de

pAM de *Streptococcus faecalis* (*Enterococcus faecalis*).

El documento de patente internacional WO 2004/035795 describe vectores de expresión que pueden producir de manera eficaz la proteína de la cápside de virión, la proteína asociada a tumores de virus del papiloma humano, en una superficie microbiana y en cepas bacterianas que albergan dichos vectores indicadores de la superficie.

5 El documento Matsunaga F. et al.: "DNA-binding domain of the RepE initiator protein of mini-F plasmid: involvement of the carboxyl-terminal region.", *Journal of Bacteriology*, vol. 177, nº 8, 1 de abril de 1.995, páginas 1.994-2.001 describe que la proteína iniciadora RepE es esencial para la replicación de mini-F en *Escherichia coli* y presenta dos funciones principales, es decir, iniciación de replicación de ADN de *ori2* y represión autógena de transcripción de *repE*.

10 Así, a la vista del hecho de que la población infectada por el VPH se concentra principalmente en los países en desarrollo, se requiere urgentemente el desarrollo de un método para preparar antígenos de VPH de una manera más económica y estable para prevenir y tratar los tumores procedentes de virus del papiloma en la mucosa de la piel de las cavidades orales u órganos genitales.

15 Los presentes autores desarrollaron previamente un vector para expresar de manera eficaz una proteína antígeno de VPH sobre la superficie de microorganismos recombinantes transformados y un método para expresar una proteína antígeno de VPH en la superficie de los microorganismos (Patente Coreana Nº Registro 0609866).

20 De acuerdo con esto, los presentes autores han hecho grandes esfuerzos para desarrollar un vector capaz de expresar de una manera más estable y constitutivamente un alto nivel de una proteína antígeno de VPH en la superficie de bacterias de ácido láctico recombinante transformadas y, como resultado, han encontrado que la proteína antígeno de VPH se expresa de manera más estable en un nivel alto en microorganismos recombinantes transformados con un vector que contiene un gen mutante *repE*, completando se ese modo la presente invención.

### Descripción de la invención

25 Es un objeto principal de la presente invención proporcionar un vector capaz de expresar de manera estable y constitutivamente un alto nivel de una proteína antígeno de VPH en la superficie de bacterias de ácido láctico recombinantes transformadas usando un gen mutante *repE*.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar bacterias de ácido láctico recombinantes transformadas con dicho vector de expresión y un método para preparar la proteína antígeno de VPH usando dichas bacterias de ácido láctico.

30 Otro objeto más de la presente invención es proporcionar una vacuna para tratar cáncer cervical, que comprende dichas bacterias de ácido láctico recombinantes transformadas.

Para conseguir los objetos anteriores, la presente invención proporciona un vector de expresión de superficie que contiene: un gen mutante *repE* que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 1; un activador; un gen de complejo poli-gamma-glutamato sintetasa y un gen que se liga con el gen de complejo poli-gamma-glutamato sintetasa y codifica una proteína antígeno asociada por inducción a tumores de virus del papiloma humano.

35 La presente invención también proporciona un microorganismo recombinante transformado con dicho vector.

La presente invención también proporciona una vacuna para uso en el tratamiento de cáncer cervical, que contiene, como ingrediente activo, un microorganismo recombinante que tiene una proteína antígeno de VPH expresada en la superficie del mismo.

40 La presente invención también proporciona un método para preparar un microorganismo que tiene un antígeno de VPH expresado en la superficie del mismo, comprendiendo el método las etapas de: cultivar un microorganismo recombinante transformado con dicho vector para expresar un antígeno de VPH en la superficie del microorganismo; y recoger el microorganismo recombinante que tiene el antígeno de VPH expresado en la superficie del mismo.

45 La presente invención también proporciona una vacuna para uso en el tratamiento de cáncer cervical, que contiene, como ingrediente activo, el microorganismo preparado por dicho método y que tiene un antígeno de VPH expresado en la superficie del mismo.

### Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 muestra un mapa de escisión de un vector de pKV-Pald-PgsA-Amilasa introducido con un gen mutante *repE*.

50 La FIG. 2 muestra mapas de escisión de dos clases de vectores de expresión que expresan el gen E7 en la superficie de microorganismos.

La FIG. 3 muestra los resultados de análisis por los métodos Western para la expresión de E7 en la superficie de

bacterias de ácido láctico transformadas con pKV-Pald-PgsA-E7.

La FIG. 4 muestra un plan para administrar bacterias de ácido láctico a ratones para examinar la capacidad para inducir inmunorespuesta de bacterias de ácido láctico recombinantes transformadas que expresan E7 en la superficie del mismo.

- 5 La FIG. 5 muestra cambios en IgG e IgA en la administración oral de bacterias de ácido láctico recombinantes transformadas que expresan E7 en la superficie del mismo.

La FIG. 6 muestra los resultados de análisis de secreción de IFN-gamma específica de E7 en la administración oral de bacterias de ácido láctico recombinantes transformadas que expresan E7 en la superficie del mismo.

- 10 La FIG. 7 muestra los resultados de un ensayo de estimulación tumoral realizado por administración por vía oral de bacterias de ácido láctico recombinantes transformadas que expresan E7 en la superficie del mismo y determinación de si aumentaba el tamaño del tumor.

La FIG. 8 muestra un mapa de escisión de un vector de expresión que expresa un gen E7 (Rb) en la superficie de los microorganismos.

- 15 La FIG. 9 muestra los resultados de análisis de la expresión de E7 (Rb) en la superficie de bacterias de ácido láctico recombinantes transformadas con pKV-Pald-PgsA-E7 (Rb).

La FIG. 10 muestra los resultados de ELISA específico de E7.

La FIG. 11 muestra los resultados de análisis de secreción de IFN-gamma específico de E7 (Rb) en la administración oral de bacterias de ácido láctico transformadas que expresan E7 (Rb) en la superficie del mismo.

#### Mejor modo de llevar a cabo la invención

- 20 En un aspecto, la presente invención se refiere a un vector de expresión de superficie que contiene: un gen mutante repE que tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 1; un activador; un gen de complejo de poli-gamma-glutamato sintetasa y un gen que se liga con el gen de complejo de poli-gamma-glutamato sintetasa y codifica una proteína antígeno asociada por inducción a tumores de virus del papiloma humano.

- 25 En la presente invención, un gen mutante repE que tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 1, que se puede mantener de manera estable en microorganismos transformados, se introdujo en los microorganismos transformados junto con un activador de aldolasa (Pald) procedente del gen aldolasa de *Lactobacillus casei*. Como resultado, se observó que aumentó la expresión de una proteína diana en los microorganismos. Para confirmar que se mantiene de manera estable un vector lanzadera de la presente invención en los microorganismos recombinantes y que se expresa una proteína diana en los microorganismos recombinantes, se introdujo un gen amilasa como un gen diana en los microorganismos recombinantes y se analizó la expresión de amilasa en los microorganismos recombinantes.
- 30

- Además, para expresión de superficie de una proteína diana, se situó un gen de complejo poli-gamma-glutamato sintetasa que es una unidad de anclaje de superficie de manera que se expresó en un estado ligado con una proteína diana. En la presente memoria, el gen de complejo poli-gamma-glutamato sintetasa es preferiblemente pgsBCA y más preferiblemente pgsA (Patente Coreana N° Registro 469800).
- 35

- En una realización de la presente invención, se fusionó un gen codificador de E7 de VPH16 con pgsA de manera que se fusionó la proteína E7 de VPH16 como una proteína diana con el extremo C-terminal de PgsA, preparando de ese modo un vector pKV-Pald-PgsA-E7 capaz de expresar constitutivamente una proteína antígeno de VPH en la superficie de bacterias de ácido láctico. También, se insertó el vector de expresión en *Lactobacillus casei*, preparando así las bacterias de ácido láctico recombinantes transformadas que expresan la proteína antígeno de VPH.
- 40

- Como se usa en la presente memoria, el término "proteína diana" o "proteína extraña" se refiere a una proteína que no se puede encontrar normalmente en células huéspedes transformadas que expresan la proteína. Por ejemplo, cuando se realiza manipulación de manera que una proteína procedente de virus o procedente de tumor se expresa de manera artificial en bacterias de ácido láctico, la proteína se refiere como una proteína extraña o una proteína diana.
- 45

- En otro aspecto, la presente invención se refiere también a un microorganismo recombinante transformados con dicho vector, expresando el microorganismo recombinante una proteína antígeno de VPH en la superficie del mismo y una vacuna para tratar cáncer cervical, que contiene, como ingrediente activo, el microorganismo recombinante transformado.
- 50

Como se usa en la presente memoria, el término "huéspedes" o "microorganismos" se refiere Una bacteria de ácido láctico que son bacterias gram-positivas probióticas y los criterios comunes usados para seleccionar microorganismos probióticos incluyen lo siguiente: (i) un microorganismo procedente de ser humano; (ii) estabilidad frente a bilis, ácido,

enzima y oxígeno; (iii) capacidad para adherirse a mucosa intestinal; (iv) colonización potencial en el tubo digestivo humano; (v) producción de sustancias antimicrobianas y (vi) eficacia y seguridad demostrables. Sobre la base de dichos criterios, es evidente que las bacterias de ácido láctico son favorables e inofensivas para el cuerpo humano. Así, cuando se aplican transformantes que usan bacterias de ácido láctico como huéspedes al cuerpo humano para suministrar un gen o proteína para prevenir o tratar enfermedad, no se requiere una etapa de detoxificación de cepas bacterianas, a diferencia de un método convencional para preparar vacunas que usen cepas bacterianas.

En la presente invención, las bacterias de ácido láctico que se usan como huéspedes incluyen *Lactobacillus* sp., *Streptococcus* sp. y *Bifidobacterium* sp. Típicamente, dicho *Lactobacillus* sp. incluye *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. delbrueckii*, *L. johnsonii* LJI, *L. reuteri* y *L. bulgaricus*, dicho *Streptococcus* sp. incluye *S. thermophilus* y *Bifidobacterium* sp. incluye *B. infantis*, *B. bifidum*, *B. longum*, *B. psuedolongum*, *B. breve*, *B. lactis* Bb-12 y *B. adolescentis*. Preferiblemente, se usa *Lactobacillus* sp. como huésped.

En otro aspecto más, la presente invención se refiere a un método para preparar un microorganismo con un antígeno de VPH expresado en la superficie del mismo, comprendiendo el método las etapas de: cultivar un microorganismo recombinante transformado con dicho vector para expresar un antígeno de VPH en la superficie del microorganismo y recoger el microorganismo recombinante con el antígeno de VPH expresado en la superficie del mismo.

El cultivo de los microorganismos recombinantes según la presente invención se pueden llevar a cabo según un método conocido en la técnica y se pueden controlar convenientemente las condiciones de cultivo, incluía o temperatura de cultivo y tiempo y el pH del medio. La recogida de células microbianas recombinantes del caldo de cultivo se puede llevar a cabo usando técnicas de aislamiento convencionales, por ejemplo, centrifugación o filtración.

En otro aspecto más, la presente invención se refiere a una vacuna para uso en el tratamiento de cáncer cervical, que contiene, como ingrediente activo, el microorganismo preparado por dicho método y que tiene un antígeno de VPH expresado en la superficie del mismo.

Además, la presente invención se refiere a una vacuna para uso en el tratamiento de cáncer cervical, que es oral.

Las vacunas son fármacos que usan organismos vivos para fines preventivos frente a enfermedades para estimular el sistema inmunitario. Inmunoactivación se refiere a un procedimiento para retirar de manera eficaz antígenos por producción de anticuerpos en organismos, estimulación de linfocitos T o estimulación de otras células inmunitarias (por ej., macrófagos). Una visión general detallada de inmunología relativa a dichos detalles se entiende fácilmente por los expertos en la materia (Barrett, J. T., *Textbook of Immunology*, 1.983). Se puede administrar una vacuna de microorganismo transformados que expresan una proteína diana como un antígeno a mamíferos y preferiblemente seres humanos.

La preparación de la composición de vacuna se puede llevar a cabo usando técnicas clásicas. Una dosis adecuada para administración varía dependiendo de la antigenicidad de productos génicos y puede ser una cantidad en que la vacuna puede inducir de manera suficiente típicas respuestas inmunitarias. La dosis se puede determinar fácilmente por procedimientos experimentales normales. La dosis inicial típica de la vacuna es 0,001-1 mg de antígeno/kg de peso. Si es necesario, se puede aumentar la dosis de manera que ofrezca un nivel de protección preferido, o se usa la vacuna en una dosis múltiple. La dosis puede ser determinada por los expertos en la materia y puede variar dependiendo del método de formulación, tipo de administración, edad del paciente, peso corporal, sexo, importancia de la enfermedad, dieta, frecuencia de administración, vía de administración, velocidad de excreción y sensibilidad de respuesta.

La realización más preferida del vector de expresión de superficie inventivo para preparar una vacuna contra VPH codificando la proteína E7 de antígeno de VPH es un vector de expresión de superficie que contiene: un gen que codifica una proteína mutante repE que tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 1; un activador de aldolasa procedente de bacterias de ácido láctico; un gen de complejo poli-gamma-glutamato sintetasa seleccionado del grupo que consiste en *pgsB*, *pgsC* y *pgsA* para expresión de superficie y un gen que codifica la proteína E7 de antígeno asociado a inducción de tumor de virus del papiloma humano y se liga con el gen de complejo poli-gamma-glutamato sintetasa. Se pueden cultivar bacterias de ácido láctico recombinantes transformadas con el vector para expresar la proteína E7 de antígeno de VPH en la superficie del mismo y usarse después directamente como una vacuna.

La realización más preferida del vector de expresión de superficie inventivo para preparar una vacuna contra VPH que codifica la proteína E7 (Rb) de antígeno de VPH es un vector de expresión de superficie que contiene: un gen que codifica proteína mutante repE que tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 1; un activador de aldolasa procedente de bacterias de ácido láctico; un gen de complejo poli-gamma-glutamato sintetasa seleccionado del grupo que consiste en *pgsB*, *pgsC* y *pgsA* para expresión de superficie y un gen que codifica la proteína E7 (Rb) de antígeno asociada a inducción de tumor de virus del papiloma humano y se liga con el gen de complejo poli-gamma-glutamato sintetasa. Se pueden cultivar bacterias de ácido láctico recombinantes transformadas con el vector para expresar la proteína E7 (Rb) de antígeno de VPH en la superficie del mismo y usarse después directamente como una vacuna.

Para que la vacuna sea eficaz en la producción de un anticuerpo, se puede liberar una sustancia antigénica *in vivo*, de manera que pueda entrar en juego el mecanismo de producción de anticuerpos de individuos vacunados. Así, un portador microbiano de un producto génico se puede introducir preferentemente *in vivo* para respuestas inmunitarias. Para estimular una respuesta preferida por un antígeno que se presenta en las bacterias de ácido láctico recombinantes transformadas de la presente invención, la vacuna se administra preferiblemente por vía oral o directamente al cuello uterino en forma de un aerosol.

Para administración oral de la composición de vacuna a individuos, la composición de vacuna se proporciona preferiblemente en una forma liofílica, por ejemplo, una forma de cápsula. La cápsula se proporciona como un recubrimiento entérico que contiene Eudragate S, Eudragate L, acetato de celulosa, ftalato de celulosa o hidroxipropilmetilcelulosa. La cápsula se puede usar tal cual o se puede administrar después de que se haya reconstituido en un material liofílico tal como una suspensión. La reconstitución se realiza preferiblemente en un tampón que tiene un valor de pH adecuado para la supervivencia de los microorganismos recombinantes transformados. Para proteger el microorganismo recombinante transformado y vacuna de ácido gástrico, es preferible administrar una formulación de bicarbonato de sodio cada vez antes de administrar la vacuna. La vacuna se puede preparar de manera selectiva para administración parenteral, administración intranasal o administración intramamaria.

### Ejemplos

De ahora en adelante, la presente invención se describirá con más detalle con referencia a los ejemplos.

Ejemplo 1: Preparación de vector de expresión de superficie (pKV-Pald-PgsA-Amilasa) que contiene gen mutante repE.

En este Ejemplo, para estabilizar un vector de expresión en células huéspedes, se construyó un vector de expresión de superficie que contiene un gen mutante repE y que muestra un nivel de expresión aumentado de una proteína diana.

Primero, para aumentar más la expresión de una proteína diana en bacterias de ácido láctico, se obtuvo un fragmento de un activador de aldolasa que es un activador procedente de *Lactobacillus casei*. El activador de aldolasa se obtuvo por PCR usando pDT-PgsA-Amilasa (descrito en la Publicación de Patente Coreana N° 10-2008-0086161) como un molde y cebadores de la SEC ID N° 2 y la SEC ID N° 3.

SEC ID N° 2: 5'-cgc gca tgc aat acc cac tta ttg cg-3'

SEC ID N° 3: 5'-cag ttc ttt ttt cat gta gat atc ctc c-3'

Como resultado, se obtuvo un fragmento de ADN de 421-pb que contiene un activador de aldolasa, un sitio de enzima de restricción *SphI* en el extremo 5' y una región N-terminal de 17 pb de *pgsA* en el extremo 3'. También, se obtuvo un fragmento de gen *pgsA* que se puede ligar con el fragmento activador de aldolasa construido anterior por PCR usando el vector descrito anteriormente como un molde y cebadores de la SEC ID N° 4 y la SEC ID N° 5.

SEC ID N° 4: 5'-gga gga tat cta cat gaa aaa aga act g-3'

SEC ID N° 5: 5'-ggc gct ggc ggt cgt ttg g-3'

El fragmento de ADN obtenido fue un fragmento de 782 pb que contenía un extremo 3' de 13 pb del activador de aldolasa y que tenía *pgsA* conectado directamente al mismo. La región de *pgsA* de este fragmento incluía un sitio de enzima de restricción de *PstI*.

Los dos fragmentos obtenidos se ligaron entre sí y se sometieron a PCR usando los cebadores en ambos extremos, obteniendo así un fragmento de ADN de 1.175 pb. Se digirió el fragmento de ADN con *SphI* y *PstI*, obteniendo así un fragmento que contenía el activador de aldolasa y la porción N-terminal de *pgsA*.

pBT:pgsA-Amilasa (pAT-PslpA-pgsA-amilasa; véase el Ejemplo Indirecto de la Patente Coreana N° Registro 0872042) se digirieron con *SphI* y *PstI* para retirar la región activadora de SlpA7 y la región N-terminal de *pgsA*, obteniendo así la cadena principal del vector de expresión.

El fragmento de ADN que contiene activador de aldolasa digerido con *SphI* y *PstI* se ligaron con el pBT: PslpA-Amilasa digerido con las mismas enzimas de restricción, construyendo así pAT-Pald-PgsA-Amilasa. El vector pAT-Pald-PgsA-Amilasa se sometió a mutagénesis dirigida al sitio para sustituir el codón TTA que codifica el 475 aminoácido leucina del gen repE con un codón de terminación TGA a fin de cortar 21 aminoácidos C-terminales de la proteína RepE, construyendo así pKV-Pald-PgsA-Amilasa con una secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 1 (FIG. 1).

Ejemplo 2: Preparación de vector de expresión de superficie E7 de VPH16 (pKV-Pald-PgsA-E7).

Usando el vector de expresión de superficie (pKV-Pald-PgsA-Amilasa) preparado en el Ejemplo 1, se insertó un gen que codifica la proteína E7 de VPH16 en el extremo C-terminal de PgsA, preparando así un vector pKV-Pald-PgsA-E7 capaz de expresar una proteína diana en la superficie de bacterias de ácido láctico.

- 5 Para este fin, se retiró el gen amilasa fusionado con *pgsA* en el vector pKV-Pald-PgsA-Amilasa preparado en el Ejemplo 1 y se insertó el gen que codifica E7 de VPH16 en el vector. Como se muestra en la FIG. 1, se obtuvo un fragmento que contiene el gen E7 de VPH16 realizando PCR usando pHAT:PgsA-E7 (Poo *et al.*, *Int. J. Cancer*, 119: 1.702, 2.006) como un molde y cebadores de la SEC ID N° 6 y la SEC ID N° 7.

SEC ID N° 6: 5'-gcg gga tcc cat gga gat aca cct aca ttg c-3'

SEC ID N° 7: 5'- acg cag aag cgg tct gat aa -3'

- 10 Como resultado, se obtuvo un fragmento de 386 pb que contenía el gen E7 de VPH16. El fragmento contenía un sitio de enzima de restricción *BamHI* en el extremo 5' y un sitio de la enzima de restricción *XbaI* en el extremo 3'. El fragmento de ADN obtenido fue digerido con *BamHI* y *XbaI*, obteniendo así un fragmento de 306 pb.

Se digirió el vector pKV-Pald-PgsA-Amilasa con *BamRI* y *XbaI* para retirar la región del gen amilasa, obteniendo así un fragmento de vector.

- 15 El fragmento de ADN que contiene gen E7 digerido con *BamRI* y *XbaI* se ligó con el vector digerido con las mismas enzimas de restricción, construyendo así pKV-Pald-PgsA-E7 (FIG. 2A).

Ejemplo 3: Examen de expresión de pHAT:PgsA-E7 y pKV-Pald-PgsA-E7 en bacterias de ácido láctico transformadas.

- 20 En este ejemplo, se transformó *Lactobacillus casei* con cada uno de pHAT:PgsA-E7 y pKV-Pald-PgsA-E7, contruidos en el Ejemplo 2. Se cultivó la cepa *Lactobacillus casei* recombinante transformada y se examinó la expresión de la proteína E7 en la cepa recombinante. Se examinó la expresión de la proteína E7 fusionada con PgsA en la cepa *Lactobacillus casei* recombinante transformada.

- 25 La cepa *Lactobacillus casei* recombinante, transformada con cada uno de pHAT:PgsAE7 y pKV-Pald-PgsA-E7, se cultivó de manera estacionaria en medio MRS (*Lactobacillus* MRS, Becton Dickinson y Company Sparks, USA) a 30°C para inducir la expresión de superficie de la proteína E7 del VPH16 fusionada con el extremo C terminal del gen *pgsA* poli-gamma-glutamato sintetasa.

La célula completa de la cepa de *Lactobacillus casei* cultivada se sometió a electroforesis en gel de poliacilamida SDS y métodos de Western usando un anticuerpo específico de PgsA.

- 30 Específicamente, se desnaturalizó la célula completa de la cepa de *Lactobacillus casei* recombinante transformada en que se había inducido la expresión del gen E7 con una proteína obtenida en la misma concentración de células a fin de preparar una muestra. Se analizó la muestra por electroforesis en gel de poliacrilamida SDS y después se transfirieron las fracciones de proteínas a membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF) (Bio-Rad). Las membranas de PVDF a que se habían transferido las fracciones de proteínas se bloquearon por agitación en un tampón de bloqueo (Tris HCl 50 mM, leche desnatada al 5%, pH 8,0) durante 1 hora y después se incubó durante 1 hora con anticuerpos primarios anti-PgsA policlonales procedentes de conejo que se habían diluido 1.000 veces en un tampón de bloqueo. Después de terminación de la incubación, se lavaron las membranas con disolución tampón y se incubaron durante 1 hora con Anticuerpos secundarios anti-conejo conjugados con HRP que se habían diluido 10.000 veces en un tampón de bloqueo. Después de terminación de la incubación, se lavaron las membranas con disolución tampón y se desarrolló el color de las membranas lavadas durante aproximadamente 1 minuto por adición de un sustrato (lumigen PS-3 acridan, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y se observó la unión específica entre el anticuerpo específico de PgsA y la proteína de fusión con una cámara CCD (FIG. 3).

- 45 En la FIG. 3, la línea C representa la cepa *Lactobacillus casei* recombinante transformada en que sólo se expresó PgsA (pKV-Pald-PgsA), la línea 1 representa la expresión de proteínas de la cepa *Lactobacillus casei* recombinante transformada con pHAT:PgsA-E7 y la línea 2 representa la expresión de proteínas de la cepa *Lactobacillus casei* recombinante transformada con pKV-Pald-PgsA-E7. Como se muestra en la FIG. 3, se pudo observar la expresión de una proteína de fusión PgsA-E7 de 54,4 kDa en las líneas 1 y 2 usando el Ab específico de PgsA y se observó que la expresión de la proteína de fusión de PgsA-E7 por pKV-Pald-PgsA-E7 fue más fuerte que la expresión de la proteína de fusión de PgsA-E7 por pHAT:PgsA-E7.

- 50 En el caso de la estructura en que se sustituyó la región de PslpA-PgsA-E7 de pHAT: PgsA-E7 que contiene *RepE* normal con Pald-PgsA-E7, no se pudieron obtener bacterias de ácido láctico transformadas por el método de preparación de bacterias de ácido láctico transformadas realizado de la misma manera que se describió anteriormente.

Ejemplo 4: Comparación de la capacidad para inducir inmunorespuestas humorales entre cepas *Lactobacillus* que expresan antígeno E7 de VPH16 en la superficie del mismo.

Se transformaron cepas *Lactobacillus casei* con cada uno de los vectores de expresión de superficie y se indujo la expresión de antígeno E7 de VPH en la superficie de las cepas de la misma manera que en el Ejemplo 2. Después, se compararon las dos clases de cepas *Lactobacillus casei* recombinantes transformadas con respecto a la capacidad de la proteína de fusión E7 de PgsA-VPH16 para inducir inmunorrespuestas humorales. También, se administraron las dos cepas transformadas con diferentes niveles de expresión de la proteína de fusión a ratones en cantidades variables (1, 1/5 y 1/10) y se compararon con respecto a la capacidad para inducir inmunorrespuestas.

Se transformó la cepa *Lactobacillus casei* con cada uno de los vectores, se cultivó, se recogió y se liofilizó para preparar polvo. Se disolvió el polvo en tampón (PBS, pH 7,4) y después se administró por vía oral a ratones Balb/c hembra de 6 semanas.

Específicamente, se disolvió en PBS cada uno de los polvos liofilizados de las cepas *Lactobacillus casei* recombinantes transformadas (pHAT-E7 y pKV-E7) que expresan el antígeno E7 de VPH16 y de la cepa *Lactobacillus casei* (pAT) que no expresa el antígeno E7 de VPH 16, a varias concentraciones ( $5 \times 10^9$  células/200  $\mu$ l,  $1 \times 10^9$  células/200  $\mu$ l y  $5 \times 10^8$  células/200  $\mu$ l) y se inmunizaron en ratones cinco veces una semana durante 2 semanas (días 0-4 y días 7-11). Después de 1 semana, se proporcionó un primer reforzante por vía oral (días 21-25) y después de 1 semana, se proporcionó un segundo reforzante por vía oral (días 35-39). Para medir anticuerpo IgG específico de E7 de VPH16 en el suero de ratón y anticuerpo IgA específico de E7 de VPH16 segregado de la mucosa de ratón, se recogieron un lavado intestinal y un lavado vaginal de cada uno de los ratones a los 14 días, 28 días y 42 días (FIG. 4). Específicamente, se obtuvo sangre del ojo de ratón usando un tubo microcapilar recubierto de heparina y se recogieron un lavado intestinal y un lavado vaginal en cantidades de 0,8 ml y 250  $\mu$ l, respectivamente, usando tampón PBS que contiene PMSF 1 mM. Después, se centrifugó cada uno de los lavados a 1.361 rad/s (13.000 rpm) durante 20 minutos y se aisló el sobrenadante y se sometió a análisis ELISA.

En el análisis ELISA, se diluyó la proteína E7 de VPH16 en tampón de recubrimiento (carbonato de sodio 0,1 M, azida de sodio 0,02%, pH 9,6) a una concentración de 500 ng/100  $\mu$ l por pozo y después se añadieron 100  $\mu$ l de la dilución a placas ELISA de 96 pozos y se incubó a 4°C durante la noche. Se lavaron las placas ELISA tres veces por adición de PBST (PBS+Tween20 al 0,05%) a las mismas en una cantidad de 300  $\mu$ l/pozo y después se bloquearon las placas ELISA con 100  $\mu$ l de leche desnatada al 5% a 37°C durante 1 hora, seguido por eliminación del tampón de bloqueo. Después, se lavaron las placas tres veces con PBST y se añadieron 100  $\mu$ l de cada uno de los sueros diluidos y lavados de mucosa a las placas. Después de que se añadieran las muestras, se incubaron a 37°C durante 2 horas y después se lavaron tres veces con tampón de lavado. Después, se diluyó anticuerpo IgG o IgA anti-ratón conjugado con peroxidasa de rábano a 1:5.000, se añadió a cada pozo y se incubó a 37°C durante 1 hora. Después, se lavó cada pozo con tampón de lavado y se desarrolló el color con disolución de TMB y se detuvo el desarrollo de color con ácido sulfúrico 2,5 M. La cantidad de antígeno específico de E7 de VPH16 se analizó por medición con una lectora de ELISA a 450 nm.

Como resultado, como se muestra en la FIG. 5A, cuando se midió el valor medio de DO de IgG de suero específico de E7 después de 2 semanas de inmunización, los grupos a los que se administró cada uno de pAT-E7 y pKV-E7 mostraron valores de DO mayores que los del grupo de control pAT. También, se observó que la cantidad del anticuerpo específico de E7 aumentó dependiendo de la cantidad de cepa administrada. El valor medio de DO de IgG de suero específico de E7 después del primer refuerzo aumentó tanto en el grupo a que se administró pAT-E7 como en el grupo a que se administró pKV-E7 comparado con el valor medido después de 2 semanas de inmunización e indicó un efecto de refuerzo. El valor medio de DO de IgG de suero específico de E7 después del segundo refuerzo también indicó un efecto de refuerzo en los dos grupos administrados. En particular, en el caso del grupo a que se administró pKV-E7, la expresión de superficie de proteína de fusión E7 de la que fue significativamente mayor que la del grupo al que se administró pAT-E7, el grupo al que se administró pKV-E7 en una cantidad de 1/5 mostró un efecto de refuerzo de IgG similar al del grupo al que se administró pAT-E7 en una cantidad de 1/1.

Mientras tanto, para medir inmunorrespuestas mucosales, se midieron los anticuerpos IgA específicos de E7 en los lavados intestinal y vaginal por ELISA. Como resultado, como se muestra en la FIG. 5B y la FIG. 5C, el valor medio de DO (es decir, IgA específico de E7) después de 2 semanas de inmunización aumentó tanto en el grupo a que se administró pAT-E7 como el grupo a que se administró pKV-E7 comparado con el grupo de control pAT y el anticuerpo específico de E7 aumentó dependiendo de la cantidad de cepa administrada. El valor medio de DO después del primer refuerzo aumentó además y el segundo efecto de refuerzo fue ligeramente mayor que el primer efecto de refuerzo.

En conclusión, cuando se administraron las cepas *Lactobacillus casei* recombinantes transformadas inventivas que expresan E7 de VPH16 por vía oral a los ratones, pudieron inducir inmunorrespuestas humorales específicas de E7 de VPH16 (inducción de IgG en suero) e inmunorrespuestas mucosales (inducción de IgA intestinal/vaginal). En particular, el grupo a que se administró pKV-E7 que expresa un nivel mayor de E7 podía inducir con más eficacia inmunorrespuestas comparado con el grupo al que se administró pAT-E7.

Ejemplo 5: Comparación de la capacidad para inducir inmunorrespuestas celulares entre cepas *Lactobacillus* que expresan antígeno de E7 de VPH16 en la superficie del mismo.

Para examinar si dos clases de cepas *Lactobacillus casei* recombinantes transformadas (pHAT-E7 y pKV-E7) con diferentes niveles de expresión de superficie de antígeno de E7 de VPH 16 difieren con respecto a la capacidad para inducir inmunorrespuestas mediadas por células T CD8+ específicas de antígeno E7 e inmunorrespuestas de células T, cada tinción de citocina intracelular y ELISPOT de IFN- $\gamma$  se llevó a cabo usando ratones a los que se administró por vía oral cada una de las cepas, examinado así la capacidad de las cepas para inducir inmunorrespuestas celulares.

Para este fin, se aislaron esplenocitos de ratones a los que se administró por vía oral cada una de las cepas *Lactobacillus casei* recombinantes transformadas que expresan E7 en la superficie de los mismos como se menciona en el Ejemplo 4. Se suspendieron los esplenocitos medio RPMI-1640 que contiene FBS al 10% y se sembraron en placas de 24 pozos a una densidad de  $5 \times 10^6$  células/pozo. Cada pozo fue tratado con un péptido E7 que contenía epítipo de clase I del MHC (a.a 49-57, AniGen, Korea) y GolgiPlug (BD Biosciences) y se cultivaron las células 37°C durante 16 horas. Se tiñeron las células cultivadas con anticuerpo CD8 de rata anti-ratón monoclonal conjugado con ficoeritrina (PE) a 4°C durante 40 minutos y se tiñó IFN- $\gamma$  en las células con anticuerpo de IFN- $\gamma$  de rata anti-ratón monoclonal conjugado con FITC usando el estuche Cytotfix/Cytoperm.

Como se describió anteriormente, después de que se hubiera administrado a los ratones por vía oral cada una de las dos cepas *Lactobacillus casei* recombinantes, se llevó a cabo tinción con citocinas intracelulares para medir el número de células T CD8+ que segregan IFN- $\gamma$  específico de E7. Como resultado, como se puede ver en la FIG. 6, el número de precursores de células T 25 CD8+ que segregan IFN- $\gamma$  específicos de E7 aumentó por las cepas *Lactobacillus casei* recombinantes transformadas que expresan E7. En particular, en la fase inicial en que se indujeron inmunorrespuestas, se observó que las inmunorrespuestas mediadas por células inducidas por la cepa pKV-E7 de *Lactobacillus casei* recombinante que tiene un mayor nivel de expresión de superficie aumentaron ligeramente comparado con las inducidas por las bacterias de ácido láctico pHAT-E7, pero las inmunorrespuestas mediadas por las células inducidas por las bacterias de ácido láctico pHAT-E7 aumentaron a un nivel similar al de la cepa de pKV-E7 después de refuerzo.

Para examinar la inducción de inmunorrespuestas de células T específicas de E7, se llevó a cabo ELISPOT de IFN- $\gamma$  para medir el número total de T células que segregan IFN- $\gamma$  específicamente para estimulación de péptido E7. Para este fin, un día antes de aislamiento de los esplenocitos, se recubrió una placa de 24 pozos con anticuerpo de captura de IFN- $\gamma$  anti-ratón y se sembraron los esplenocitos aislados el día del experimento en cada pozo de la placa a una densidad de  $2 \times 10^5$  células/pozo. Cada pozo sembrado con las células fue tratado con el péptido E7 o PHA-M y se cultivaron las células durante 2 días. Después de 2 días, se retiró el contenido de la placa y se lavó dos veces con agua destilada y tres veces con PBS que contiene tween-20 al 0,05% y se añadió IFN- $\gamma$  anti-ratón biotinilado a cada pozo de la placa y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de la terminación de la incubación, se retiró el contenido de la placa, se lavó cada pozo tres veces con PBS que contenía tween-20 al 0,05% y después se añadió estreptavidina-HRP a cada pozo de la placa y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de que se hubiera eliminado el contenido de la placa, se lavó cada pozo cuatro veces con PBS que contenía tween-20 al 0,05% y dos veces con PBS. Después, se añadió un sustrato a cada pozo y se observó el desarrollo de color en cada pozo durante 5-60 minutos. Se detuvo la reacción de desarrollo de color por agua destilada y se midió el número de pintas en cada pozo usando la lectora de ELISPOT.

Como resultado, como se muestra en la FIG. 6, aumentó en los ratones a los que se administraron por vía oral las bacterias de ácido láctico recombinantes transformadas con pHAT-E7 o pKV-E7, el número de células que segregaban IFN- $\gamma$  específicamente para el péptido E7. También, el número de células que segregan IFN- $\gamma$  en el grupo al que se administró la cepa *Lactobacillus casei* recombinante transformada con pKV-E7 fue ligeramente mayor que en el grupo al que se administró la cepa *Lactobacillus casei* recombinante transformada con pHAT-E7.

Ejemplo 6: Estimulación de células tumorales en ratones inmunizados con *Lactobacillus* que expresan antígeno E7 de VPH en la superficie del mismo.

Para confirmar el efecto anticáncer de dos clases de cepas de *Lactobacillus* recombinantes transformadas (pHAT-E7 y pKV-E7) con diferentes niveles de expresión de superficie de antígeno E7 de VPH 16 y confirmar el efecto anticáncer según la cantidad de las mismas, se llevó a cabo estimulación de células tumorales usando un modelo de células tumorales de TC-1 que expresan la proteína E7.

Para este fin, se dividieron ratones C57BL/6 hembra de 6-8 semanas en varios grupos, consistiendo cada uno en 5 animales y cada una de las cepas de *Lactobacillus casei* recombinantes transformadas que expresan E7 en la superficie del mismo se administró por vía oral a los ratones. La administración oral se realizó cinco veces una semana y se trataron los ratones según el siguiente plan : 1 semana de administración oral seguido por 1 semana de reposo, después de 1 semana de primer refuerzo seguido por 1 semana de reposo y después de 1 semana de segundo refuerzo. Después de 1 semana de administración oral, se inyectaron  $2 \times 10^4$  células tumorales TC-1 por vía subcutánea en el muslo izquierdo de cada ratón para inducir tumores. El tamaño del tumor formado se midió tres veces una semana usando soportes.

Como resultado, como se puede ver en la FIG. 7, en el grupo al que se administró por vía oral la cepa de *Lactobacillus casei* recombinante transformada con pHAT-E7 o pKV-E7, el tamaño del tumor formado fue

aproximadamente 50 por ciento más pequeño que el tamaño del tumor del grupo de control. También, el grupo al que se administró la cepa de *Lactobacillus casei* recombinante pKV-E7 en una cantidad reducida de 1/5 mostró un tamaño de tumor menor que el del grupo de control.

5 Ejemplo 7: Preparación de bacterias de ácido láctico inmunizadas (pKV-Pald-PgsA-E7 (Rb) que expresan en la superficie de las mismas una proteína que tiene mutaciones de aminoácidos introducidas en E7 de VPH de tipo 16.

10 Si se infectan las células con virus del papiloma, la proteína E7 expresada se puede unir a la proteína supresora de crecimiento de retinoblastoma (pRb) para causar cáncer. Por esta razón, se indujeron las mutaciones en la secuencia de bases de una región que se une al pRb del gen E7. Se fusionó el gen E7 (Rb) inducido por mutación al extremo de PgsA usando un vector lanzadera pKV que se expresa de manera estable en *E. coli* y bacterias de ácido láctico, preparando de ese modo un vector pKV-Pald-PgsA-E7 (Rb) capaz de expresarse en la superficie de las bacterias de ácido láctico.

15 Los resultados del examen para el sitio de unión de Rb de E7 de VPH tipo 16 revelaron que el sitio de unión de la proteína supresora del crecimiento del retinoblastoma (pRb) (DLxCxE) consiste en los restos 21-26 de aminoácidos del gen E7 de VPH16 (Smahel M. *et al.*, *Virology*, 281: 231, 2.001). Para sustituir todos los aminoácidos 21° (D), 24° (C) y 26° (E) entre los restos 21-26 de aminoácido con glicina, la capacidad de la proteína E7 para unirse a la proteína pRb se eliminó por mutagénesis del punto usando cebadores. Específicamente, se realizó PCR usando el vector pKV-Pald-PgsA-E7 preparado en el Ejemplo 2 como un molde y cada uno de una primera serie de las SEC ID NOS: 8 y 9 y una primera serie de las SEC ID NOS: 10 y 11.

SEC ID N° 8: 5'-tct gga tcc atg cat gga gat aca cct ac-3'

20 SEC ID N° 9: 5'-ttg ccc ata acc gta gag acc agt tgt c-3'

SEC ID N° 10: 5'-act ggt ctc tac ggt tat ggg caa tta aat g-3'

SEC ID N° 11: 5'-cat tct aga tca tta tgg ttt ctg aga aca g-3'

25 Como resultado, se obtuvo un fragmento de ADN de 87 pb que contenía el gen E7 de VPH16 mediante los cebadores de las SEC ID NOS: 8 y 9 y contenía un sitio de enzima de restricción *Bam*RI en el extremo 5'. También, se obtuvo un fragmento de ADN de 249 pb mediante los cebadores de las SEC ID NOS: 10 y 11 y contenía un sitio de enzima de restricción *Xba*I en el extremo 3'. Se mezclaron entre sí los dos fragmentos de ADN obtenidos y se sometieron a 10 ciclos de PCR que consistían en 30 s a 95°C, 30 s a 42°C y 30 s a 72°C. Después, se añadieron cebadores de las SEC ID NOS: 8 y 11 al producto PCR, que se sometió después a PCR (30 s a 95°C, 30 s a 53°C y 30 s a 72°C). Los fragmentos de ADN de 312 pb obtenidos contenían un sitio de enzima de restricción *Bam*HI en el extremo 5' y un sitio de enzima de restricción *Xba*I en el extremo 3'. El fragmento fue digerido con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Xba*I para obtener un fragmento de gen mutante E7 (Rb) de 306 pb. Se digirió pKV-Pald-PgsA-Amilasa con *Bam*HI y *Xba*I para eliminar la región del gen amilasa, obteniendo así una región del vector. El fragmento de ADN que contenía gen mutante E7 (Rb) digerido con *Bam*HI y *Xba*I se ligó con el vector digerido con las mismas enzimas de restricción, construyendo así pKV-Pald-PgsA-E7 (Rb) (FIG. 8).

35 La construcción pKV-Pald-PgsA-E7 (Rb) se transformó en *Lactobacillus casei* por electroporación, obteniendo así bacterias de ácido láctico transformadas con la construcción.

Ejemplo 8: Examen de expresión de pKV-Pald-PgsA-E7 (Rb) en bacterias de ácido láctico transformadas.

40 Para examinar si la proteína de fusión PgsA-E7 que tiene las mutaciones en el sitio de unión Rb se expresa en la *Lactobacillus casei* recombinante transformada con el vector pKV-Pald-PgsA-E7 (Rb) obtenido para expresión en la superficie de las bacterias de ácido láctico, se llevó a cabo el siguiente experimento.

45 Se cultivó de manera estacionaria el *Lactobacillus casei* recombinante transformado en medio MRS (*Lactobacillus* MRS, Becton Dickinson y Company Sparks, USA) a 30°C y se recogieron y se analizaron las células microbianas por métodos de Western de la misma manera que en el Ejemplo 3. Como resultado, se confirmó que se expresó la proteína de fusión en la cepa microbiana. Específicamente, se realizaron métodos de Western usando anticuerpo específico de PgsA y anticuerpo específico de E7 de VPH16 (Ab monoclonal de E7, Invitrogen, USA) y, como resultado, como se muestra en la FIG. 9, se confirmó la expresión de una proteína E7 mutante de aproximadamente 54,7 kDa fusionada con PgsA.

Ejemplo 9: Inducción de inmunorespuestas humerales por *Lactobacillus* que expresa antígeno mutante E7 (Rb) de VPH16 en la superficie del mismo.

50 La cepa *Lactobacillus casei* recombinante confirmada para expresar la proteína mutante E7 fusionada a PgsA fue administrada por vía oral a ratones para examinar si se inducían inmunorespuestas humerales. Para este fin, se transformó *Lactobacillus casei* con el vector, se cultivó y después se liofilizó para preparar polvo. Se disolvió el polvo en tampón (PBS, pH 7,4) y se administró por vía oral a ratones Balb/c hembra de 6 semanas.

Específicamente, cada uno de los polvos de la cepa de *Lactobacillus casei* recombinante transformada (E7-Rb) que expresa E7 (Rb) de VPH16 y de una cepa de *Lactobacillus casei* (L525) que no expresan E7 (Rb) de VPH16 se disolvió en PBS en una concentración de  $2-5 \times 10^9$  células/200  $\mu$ l y se inmunizaron después en ratones cinco veces a la semana durante 2 semanas (días 0-4 y días 7- 11). Después de una semana, se proporcionó un primer reforzante por vía oral (días 21-25) y después de una semana, se proporcionó un segundo reforzante por vía oral (días 35 - días 39). Para medir anticuerpo IgG específico de E7 de VPH16 en el suero de ratón y anticuerpo IgG específico de E7 de VPH16 segregado de la mucosa de ratón, se recogieron un lavado intestinal y un lavado vaginal de cada ratón los días 14, 28 y 42 como se muestra en la FIG. 3. Como se describió en el Ejemplo 4, se obtuvo sangre del ojo de ratón usando un tubo microcapilar recubierto de heparina y se recogieron un lavado intestinal y un lavado vaginal de cada ratón en cantidades de 0,8 ml y 250  $\mu$ l, respectivamente, usando tampón de lavado PBS que contiene PMSF 1 mM. Se centrifugó cada uno de los lavados recogidos a 1.361 rad/s (13.000 rpm) durante 20 minutos y se aisló el sobrenadante y se analizó por ELISA de la misma manera que en el Ejemplo 4.

Como resultado, como se muestra en la FIG. 10A, cuando se midió el valor medio de la DO de IgG de suero específico de E7 después de 2 semanas de inmunización, el grupo al que se administró E7-Rb mostró un valor de DO mayor que la del grupo al que se administró L525 (grupo de control negativo). El valor medio de la DO de IgG de suero específico de E7 después del primer refuerzo aumentó en el grupo al que se administró E7-Rb comparado con el valor de la DO medido después de 2 semanas de inmunización e indicó un efecto de refuerzo. El valor de la DO promedio de suero específico de E7 también indicó un efecto de refuerzo. Sin embargo, el grupo al que se administró L525 no mostró un efecto de refuerzo especial. También, para medir inmunorepuestas humorales inducidas en la mucosa, se midió el anticuerpo IgA específico de E7 en cada uno del intestinal y vaginal por ELISA. Como resultado, como se muestra en la FIG. 10B y la FIG. 10C, el valor medio de la DO (IgA específico de E7) después de 2 semanas de la inmunización aumentó en el grupo al que se administró E7-Rb comparado con el grupo al que se administró L525 (grupo de control negativo). También, el valor medio de la DO después del primer refuerzo aumentó comparado con el valor medido después de 2 semanas de la inmunización y el segundo efecto de refuerzo aumentó comparado con el primer efecto de refuerzo.

En conclusión, cuando la cepa *Lactobacillus casei* recombinante transformada con E7-Rb se administró por vía oral a los ratones, pudo inducir todas las inmunorepuestas humorales sistémicas específicas de E7 de VPH16 (inducción de IgG en suero) e inmunorepuesta humoral mucosal (inducción de IgA intestinal/vaginal).

Ejemplo 10: Inducción de inmunorepuestas celulares por *Lactobacillus* que expresa antígeno mutante E7 (Rb) de VPH16 en la superficie del mismo.

Para si la cepa de *Lactobacillus* (E7-Rb) recombinante transformada que expresa el antígeno mutante E7 (Rb) de VPH 16 en la superficie del mismo tiene la capacidad de inducir inmunorepuestas mediadas por células T específicas de antígeno E7 (Rb), se llevó a cabo ELISPOT de IFN- $\gamma$  usando ratones a los que se administró por vía oral la cepa, examinando así la capacidad de la cepa para inducir inmunorepuestas celulares. Para este fin, la cepa *Lactobacillus casei* recombinante transformada que expresa E7 (Rb) en la superficie del mismo, construida en el Ejemplo 7, se administró por vía oral a ratones y se aislaron esplenocitos de los ratones. Se suspendieron los esplenocitos aislados en medio RPMI-1640 que contenía FBS al 10% y se sembraron en cada pozo de una placa de 24 pozos a una densidad de  $5 \times 10^6$  células. Cada pozo fue tratado con un péptido E7 que contenía epítipo de clase I de MHC (a.a 49-57, AniGen, Korea) y GolgiPlug (BD Biosciences) y se cultivaron las células a 37°C durante 16 horas. Se tiñeron las células cultivadas con anticuerpo CD8 de rata anti-ratón monoclonal conjugado con ficoeritrina (PE) a 4°C durante 40 minutos y se tiñó IFN- $\gamma$  en la células con anticuerpo de IFN- $\gamma$  de rata anti-ratón monoclonal conjugado con FITC usando el estuche Cytotif/Cytoperm.

Como se describió anteriormente, cada una de las dos cepas de *Lactobacillus casei* recombinantes se administró por vía oral a los ratones y después se llevó a cabo tinción con citocinas intracelulares para medir el número de células T CD8+ que segregan IFN- $\gamma$  específico de E7 (Rb). Como resultado, como se puede ver en la FIG. 11, el número de precursores de 15 células T CD8+ que segregan IFN- $\gamma$  específico de E7 (Rb) aumentó por el *Lactobacillus casei* recombinante transformado que expresa E7 (Rb). En particular, en la fase inicial en que se indujeron inmunorepuestas, se observó que las inmunorepuestas mediadas por células inducidas por la cepa de *Lactobacillus casei* recombinante pKV-E7 (Rb) con un mayor nivel de expresión de superficie aumentaron ligeramente comparado con las inducidas por las bacterias de ácido láctico pHAT-E7 (Rb), pero las inmunorepuestas mediadas por células inducidas por las bacterias de ácido láctico pHAT-E7 (Rb) aumentaron a un nivel similar al de la cepa pKV-E7 (Rb) después de refuerzo.

Para examinar la inducción de inmunorepuestas de células T específicas de E7, se llevó a cabo ELISPOT de IFN- $\gamma$  para medir el número total de células T que segregan IFN- $\gamma$  específicamente para estimulación de péptido E7.

Para este fin, un día antes de aislamiento de los esplenocitos, se recubrió una placa de 24 pozos con anticuerpo de captura de IFN- $\gamma$  anti-ratón y se sembraron los esplenocitos aislados el día del experimento en cada pozo de la placa a una densidad de  $2 \times 10^5$  células/pozo. Cada pozo sembrado con las células fue tratado con el péptido E7 o PHA-M y se cultivaron las células durante 2 días. Después de 2 días, se retiró el contenido de la placa y se lavó dos veces

5 con agua destilada y tres veces con PBS que contenía tween-20 al 0,05% y se añadió IFN- $\gamma$  anti-ratón biotinilado a cada pozo de la placa y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de terminación de la incubación, se retiró el contenido de la placa, se lavó cada pozo tres veces con PBS que contenía tween-20 al 0,05% y después se añadió estreptavidina-HRP a cada pozo de la placa y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de que se hubo retirado el contenido de la placa, se lavó cada pozo cuatro veces con PBS que contenía tween-20 al 0,05% y dos veces con PBS. Después, se añadió un sustrato a cada pozo y se realizó la observación del desarrollo de color en cada pozo durante 5-60 minutos. Se detuvo la reacción de desarrollo de color por agua destilada y se midió el número de pintas en cada pozo usando la lectora de ELISPOT.

10 Como resultado, como se muestra en la FIG. 11, en los ratones a los que se administraron por vía oral las bacterias de ácido láctico recombinantes transformadas con pHAT-E7 (Rb) o pKV-E7 (Rb), el número de células que segregan IFN- $\gamma$  específicamente para el péptido E7 aumentó. También, el número de células que segregan IFN- $\gamma$  en el grupo al que se administró la cepa *Lactobacillus casei* recombinante transformada con pKV-E7 (Rb) fue ligeramente mayor que en el grupo al que se administró la cepa *Lactobacillus casei* recombinante transformada con pHAT-E7 (Rb).

#### **Aplicabilidad industrial**

15 Como se describió anteriormente, las bacterias de ácido láctico recombinantes, transformadas con el vector de expresión de superficie inventivo y que expresan la proteína antígeno de virus del papiloma humano (VPH) en la superficie de las mismas y se puede usar una composición que contiene las bacterias de ácido láctico recombinantes como ingrediente activo, como una vacuna para uso en el tratamiento de cáncer cervical. La cepa recombinante transformada que expresa constitutivamente un alto nivel del antígeno de VPH es muy eficaz, debido a  
20 que puede proliferar en una gran cantidad de una manera económica y se puede aplicar como una vacuna oral o directamente a la vagina.

ES 2 513 440 T3

<110> BioLeaders Corp.  
 Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology  
 Kookmin University Industry-Academic Cooperation Foundation

<120> Stable High-level Constitutive Expression Vector for Anti-HPV  
 Vaccine and Lactic Acid Bacteria Transformed by Thereof

<130> PP-B0869

<160> 11

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1  
 <211> 474  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Variante repE

<400> 1  
 Met Asn Ile Pro Phe Val Val Glu Thr Val Leu His Asp Gly Leu Leu  
 1 5 10 15  
 Lys Tyr Lys Phe Lys Asn Ser Lys Ile Arg Ser Ile Thr Thr Lys Pro  
 20 25 30  
 Gly Lys Ser Lys Gly Ala Ile Phe Ala Tyr Arg Ser Lys Ser Ser Met  
 35 40 45  
 Ile Gly Gly Arg Gly Val Val Leu Thr Ser Glu Glu Ala Ile Gln Glu  
 50 55 60  
 Asn Gln Asp Thr Phe Thr His Trp Thr Pro Asn Val Tyr Arg Tyr Gly  
 65 70 75 80  
 Thr Tyr Ala Asp Glu Asn Arg Ser Tyr Thr Lys Gly His Ser Glu Asn  
 85 90 95  
 Asn Leu Arg Gln Ile Asn Thr Phe Phe Ile Asp Phe Asp Ile His Thr  
 100 105 110  
 Ala Lys Glu Thr Ile Ser Ala Ser Asp Ile Leu Thr Thr Ala Ile Asp  
 115 120 125  
 Leu Gly Phe Met Pro Thr Met Ile Ile Lys Ser Asp Lys Gly Tyr Gln  
 130 135 140  
 Ala Tyr Phe Val Leu Glu Thr Pro Val Tyr Val Thr Ser Lys Ser Glu  
 145 150 155 160  
 Phe Lys Ser Val Lys Ala Ala Lys Ile Ile Ser Gln Asn Ile Arg Glu  
 165 170 175  
 Tyr Phe Gly Lys Ser Leu Pro Val Asp Leu Thr Cys Asn His Phe Gly  
 180 185 190  
 Ile Ala Arg Ile Pro Arg Thr Asp Asn Val Glu Phe Phe Asp Pro Asn  
 195 200 205

ES 2 513 440 T3

Tyr Arg Tyr Ser Phe Lys Glu Trp Gln Asp Trp Ser Phe Lys Gln Thr  
 210 215 220  
 Asp Asn Lys Gly Phe Thr Arg Ser Ser Leu Thr Val Leu Ser Gly Thr  
 225 230 235 240  
 Glu Gly Lys Lys Gln Val Asp Glu Pro Trp Phe Asn Leu Leu Leu His  
 245 250 255  
 Glu Thr Lys Phe Ser Gly Glu Lys Gly Leu Ile Gly Arg Asn Asn Val  
 260 265 270  
 Met Phe Thr Leu Ser Leu Ala Tyr Phe Ser Ser Gly Tyr Ser Ile Glu  
 275 280 285  
 Thr Cys Glu Tyr Asn Met Phe Glu Phe Asn Asn Arg Leu Asp Gln Pro  
 290 295 300  
 Leu Glu Glu Lys Glu Val Ile Lys Ile Val Arg Ser Ala Tyr Ser Glu  
 305 310 315 320  
 Asn Tyr Gln Gly Ala Asn Arg Glu Tyr Ile Thr Ile Leu Cys Lys Ala  
 325 330 335  
 Trp Val Ser Ser Asp Leu Thr Ser Lys Asp Leu Phe Val Arg Gln Gly  
 340 345 350  
 Trp Phe Lys Phe Lys Lys Lys Arg Ser Glu Arg Gln Arg Val His Leu  
 355 360 365  
 Ser Glu Trp Lys Glu Asp Leu Met Ala Tyr Ile Ser Glu Lys Ser Asp  
 370 375 380  
 Val Tyr Lys Pro Tyr Leu Val Thr Thr Lys Lys Glu Ile Arg Glu Val  
 385 390 395 400  
 Leu Gly Ile Pro Glu Arg Thr Leu Asp Lys Leu Leu Lys Val Leu Lys  
 405 410 415  
 Ala Asn Gln Glu Ile Phe Phe Lys Ile Lys Pro Gly Arg Asn Gly Gly  
 420 425 430  
 Ile Gln Leu Ala Ser Val Lys Ser Leu Leu Leu Ser Ile Ile Lys Val  
 435 440 445  
 Lys Lys Glu Glu Lys Glu Ser Tyr Ile Lys Ala Leu Thr Asn Ser Phe  
 450 455 460  
 Asp Leu Glu His Thr Phe Ile Gln Glu Thr  
 465 470

<210> 2  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> cebador

# ES 2 513 440 T3

<p>&lt;400&gt; 2 cgcgcatgca atacccactt attgcg</p>		26
<p>&lt;210&gt; 3 &lt;211&gt; 28 &lt;212&gt; ADN &lt;213&gt; Secuencia Artificial</p>		
<p>&lt;220&gt; &lt;223&gt; cebador</p>		
<p>&lt;400&gt; 3 cagttctttt ttcattgtaga taccctcc</p>		28
<p>&lt;210&gt; 4 &lt;211&gt; 28 &lt;212&gt; ADN &lt;213&gt; Secuencia Artificial</p>		
<p>&lt;220&gt; &lt;223&gt; cebador</p>		
<p>&lt;400&gt; 4 ggaggatatt tacattgaaaa aagaactg</p>		28
<p>&lt;210&gt; 5 &lt;211&gt; 19 &lt;212&gt; ADN &lt;213&gt; Secuencia Artificial</p>		
<p>&lt;220&gt; &lt;223&gt; cebador</p>		
<p>&lt;400&gt; 5 ggcgctggcg gtcgtttg</p>		19
<p>&lt;210&gt; 6 &lt;211&gt; 31 &lt;212&gt; ADN &lt;213&gt; Secuencia Artificial</p>		
<p>&lt;220&gt; &lt;223&gt; cebador</p>		
<p>&lt;400&gt; 6 gcgggatccc atggagatac acctacattg c</p>		31
<p>&lt;210&gt; 7 &lt;211&gt; 20 &lt;212&gt; ADN &lt;213&gt; Secuencia Artificial</p>		

# ES 2 513 440 T3

<220>  
 <223> cebador

<400> 7  
 acgcagaagc ggtctgataa 20

<210> 8  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> cebador

<400> 8  
 tctggatcca tgcattggaga tacacctac 29

<210> 9  
 <211> 28  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> cebador

<400> 9  
 ttgccataa ccgtagagac cagttgtc 28

<210> 10  
 <211> 31  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> cebador

<400> 10  
 actggtctct acggttatgg gcaattaaat g 31

<210> 11  
 <211> 31  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> cebador

<400> 11  
 cattctagat cattatgggtt tctgagaaca g 31

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Un vector de expresión de superficie para preparar vacunas para el virus del papiloma humano (VPH), comprendiendo el vector de expresión de superficie un gen que codifica una proteína mutante repE con una secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 1, un activador, un gen de complejo poli-gamma-glutamato sintetasa para la expresión de superficie y un gen que se liga con el gen de complejo poli-gamma-glutamato sintetasa y codifica una proteína antígeno asociada por inducción a tumor de virus del papiloma humano.
2. El vector de expresión de superficie según la reivindicación 1, en el que la proteína antígeno asociada por inducción a tumor de VPH es E7 o E7 (Rb) de VPH.
- 10 3. El vector de expresión de superficie según la reivindicación 1, en el que el activador es un activador de aldolasa procedente de bacterias de ácido láctico.
4. El vector de expresión de superficie según la reivindicación 1, en el que el gen de complejo poli-gamma-glutamato sintetasa es seleccionado del grupo que consiste en *pgsB*, *pgsC* y *pgsA*.
5. Un microorganismo recombinante transformado con el vector según la reivindicación 1.
6. El microorganismo recombinante según la reivindicación 5, en el que el microorganismo es bacteria de ácido láctico.
- 15 7. Una vacuna para uso en el tratamiento de cáncer cervical, comprendiendo la vacuna el microorganismo recombinante transformado según la reivindicación 5 ó 6, como un ingrediente activo.
8. Un método para preparar un microorganismo que tiene un antígeno de VPH expresado en la superficie del mismo, comprendiendo el método las etapas de: cultivar el microorganismo recombinante según la reivindicación 5, para expresar un antígeno de VPH en la superficie del microorganismo y recoger el microorganismo recombinante que tiene el antígeno de VPH expresado en la superficie del mismo.
- 20 9. Una vacuna para uso en el tratamiento de cáncer cervical, comprendiendo la vacuna el microorganismo recombinante que tiene el antígeno de VPH expresado en la superficie del mismo preparado por el método según la reivindicación 8, como ingrediente activo.
10. La vacuna para uso según la reivindicación 7 ó 9, en la que la vacuna se administró por vía oral.
- 25 11. Un vector de expresión de superficie para preparar vacunas de VPH, comprendiendo el vector de expresión de superficie un gen que codifica una proteína mutante repE que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 1, un activador de aldolasa procedente de bacterias de ácido láctico, un gen de complejo poli-gamma-glutamato sintetasa seleccionado del grupo que consiste en *pgsB*, *pgsC* y *pgsA* para expresión de superficie y un gen que se liga con el gen de complejo poli-gamma-glutamato sintetasa y codifica una proteína E7 de antígeno asociado por inducción a tumor de virus del papiloma humano.
- 30 12. Un vector de expresión de superficie para preparar vacunas de VPH, comprendiendo el vector de expresión de superficie un gen que codifica una proteína mutante repE que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 1, un activador de aldolasa procedente de bacterias de ácido láctico, un gen de complejo poli-gamma-glutamato sintetasa seleccionado del grupo que consiste en *pgsB*, *pgsC* y *pgsA* para expresión de superficie y un gen que se liga con el gen de complejo poli-gamma-glutamato sintetasa y codifica una proteína E7 (Rb) de antígeno asociado por inducción a tumor de virus del papiloma humano.
- 35 13. Una bacteria de ácido láctico recombinante transformada con el vector según la reivindicación 11.
14. Una bacteria de ácido láctico recombinante transformada con el vector según la reivindicación 12.

FIG. 1

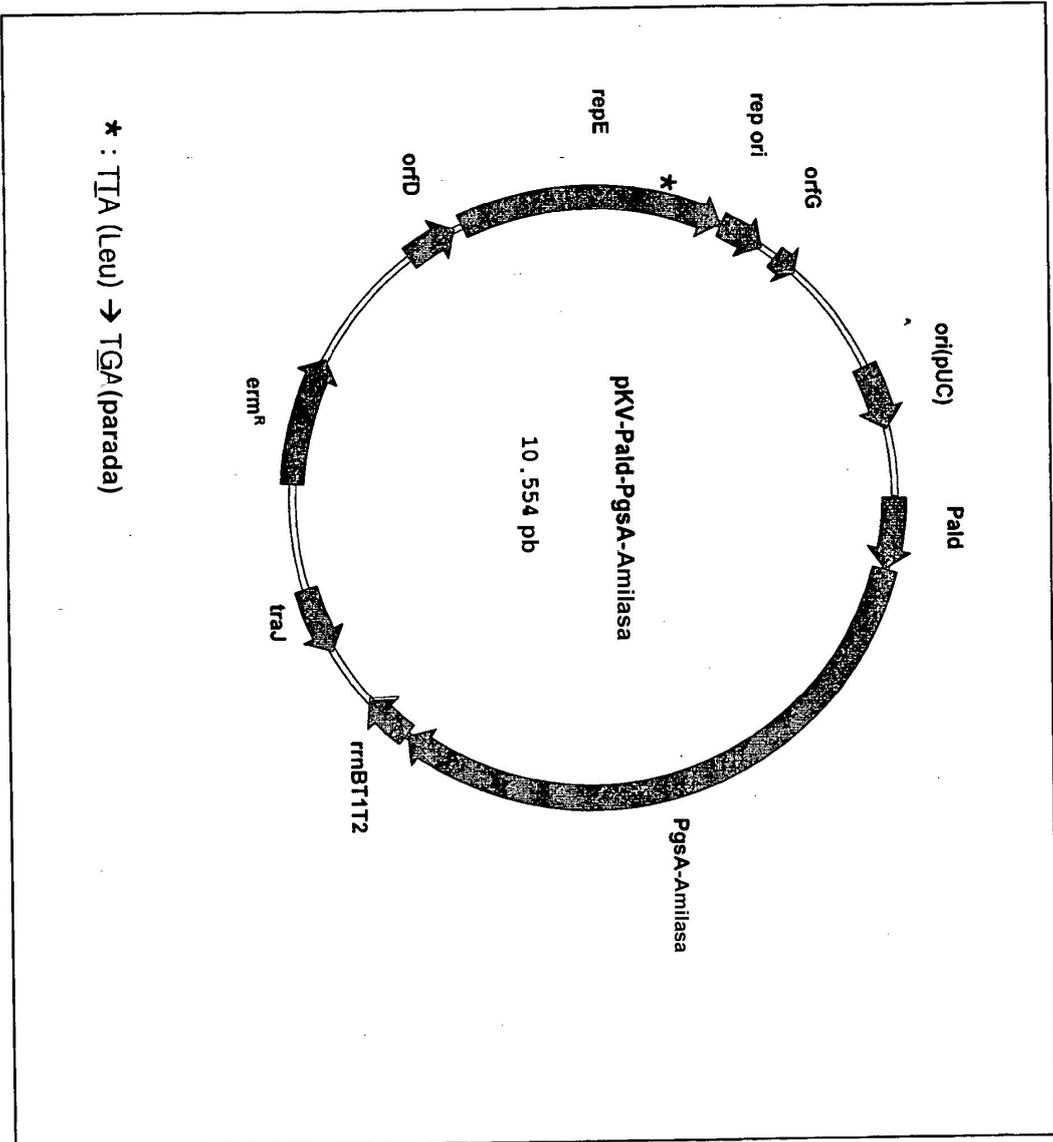


FIG. 2

A.

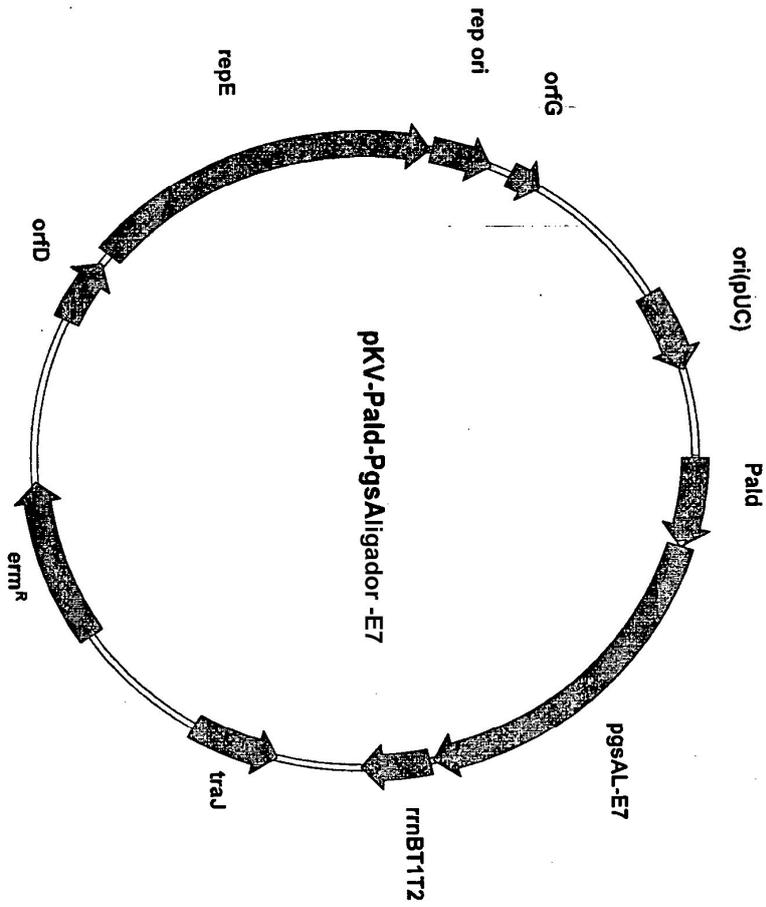


FIG. 2

B.

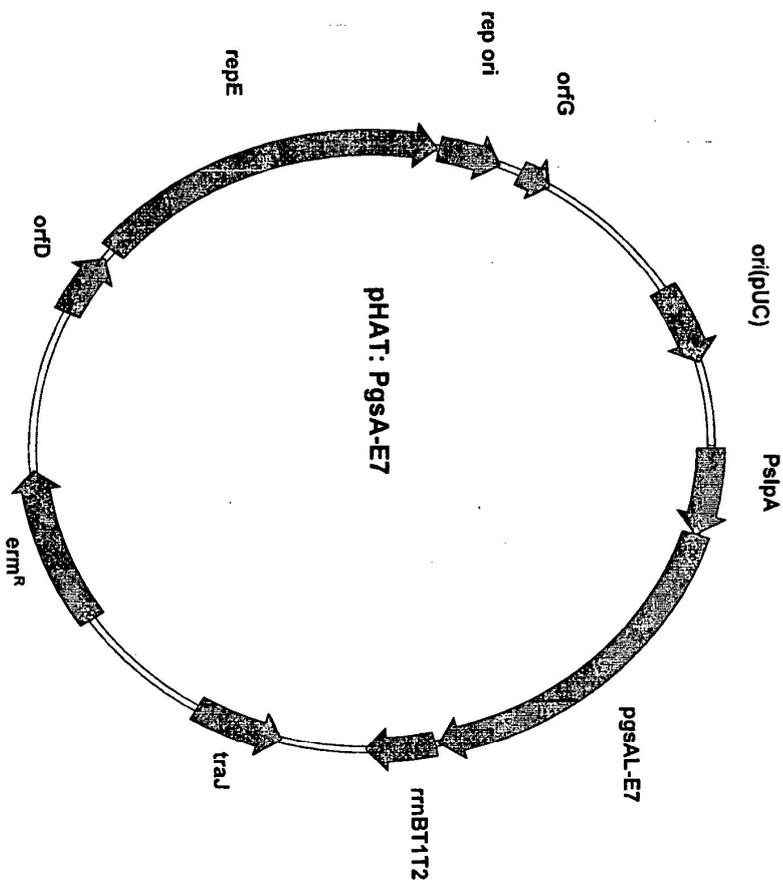


FIG. 3

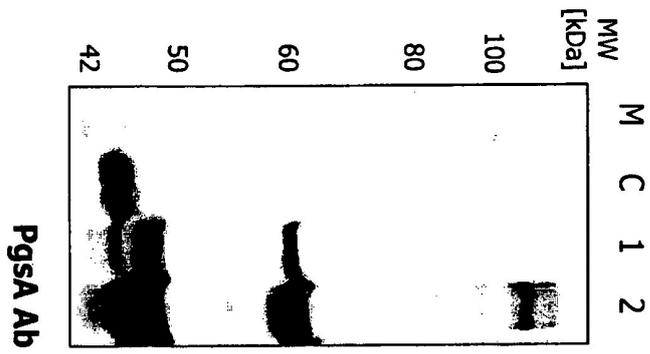


FIG. 4

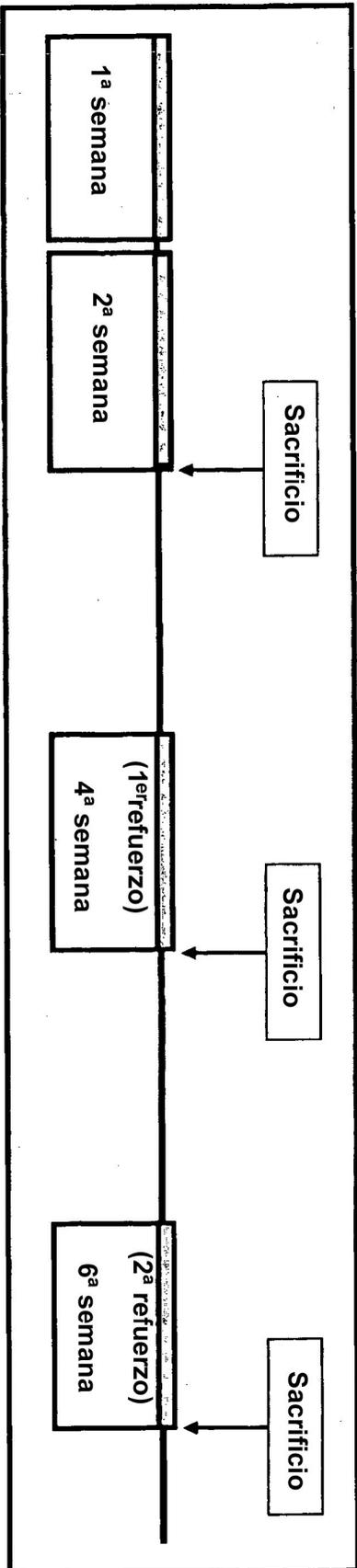


FIG. 5

A. ELISA de IgG de suero específico de E7

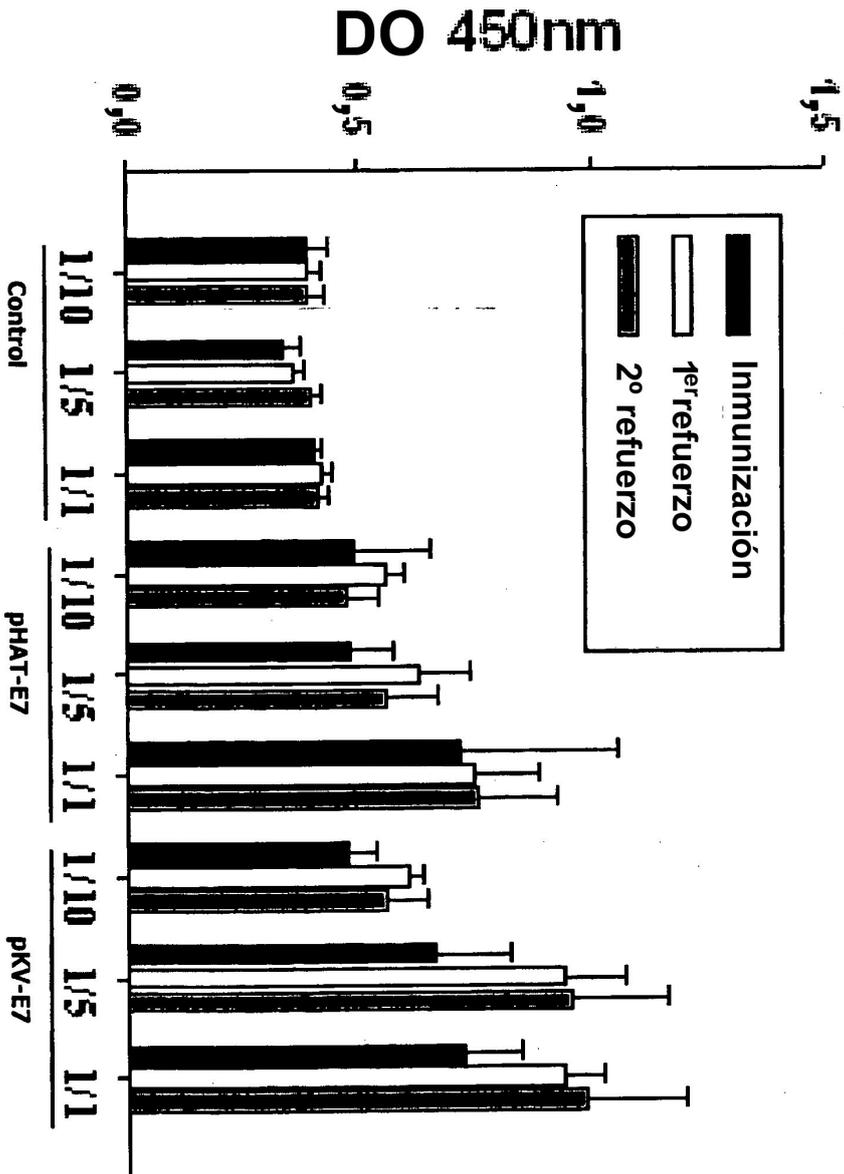


FIG. 5

B. IgA intestinal específico de E7

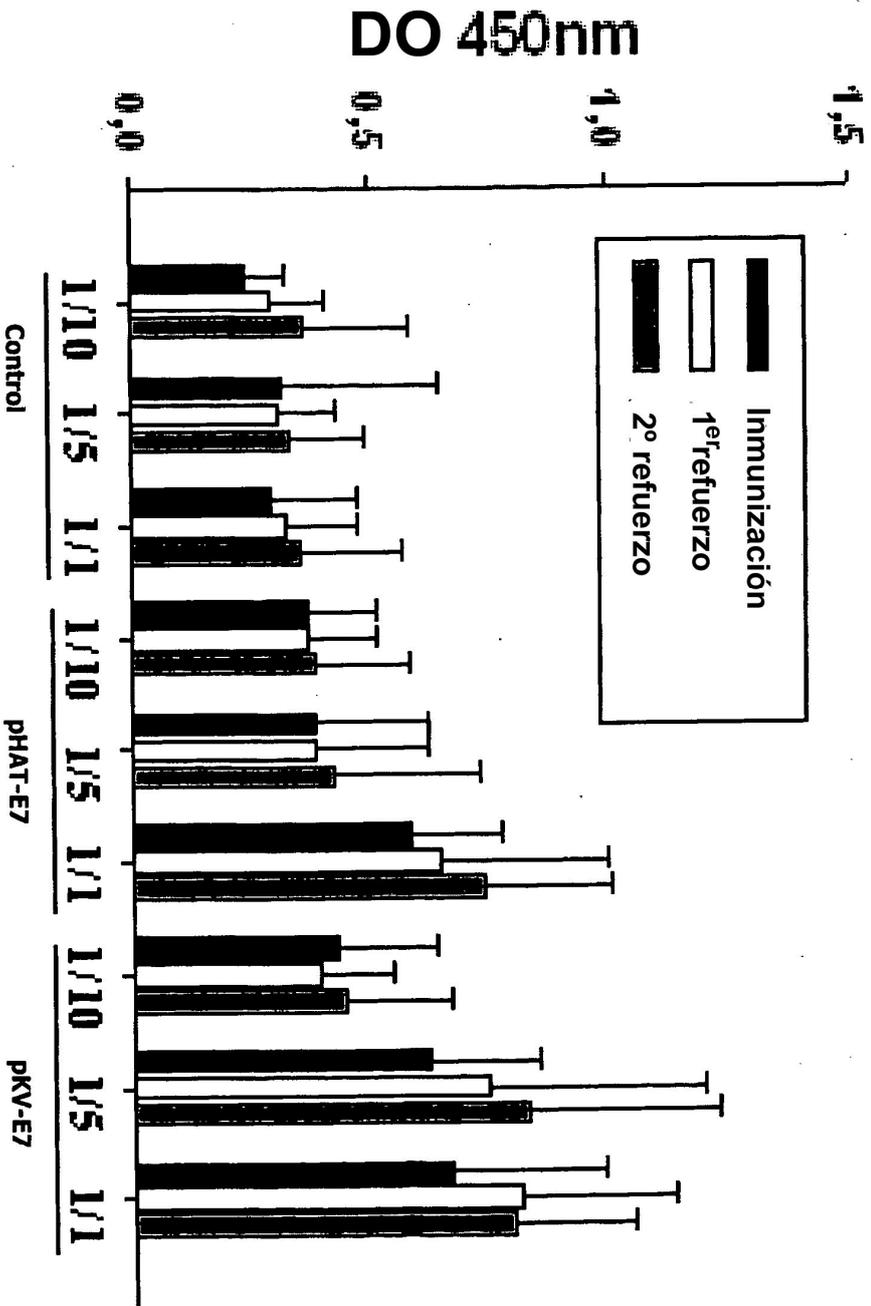


FIG. 5

C. IgA vaginal específico de E7

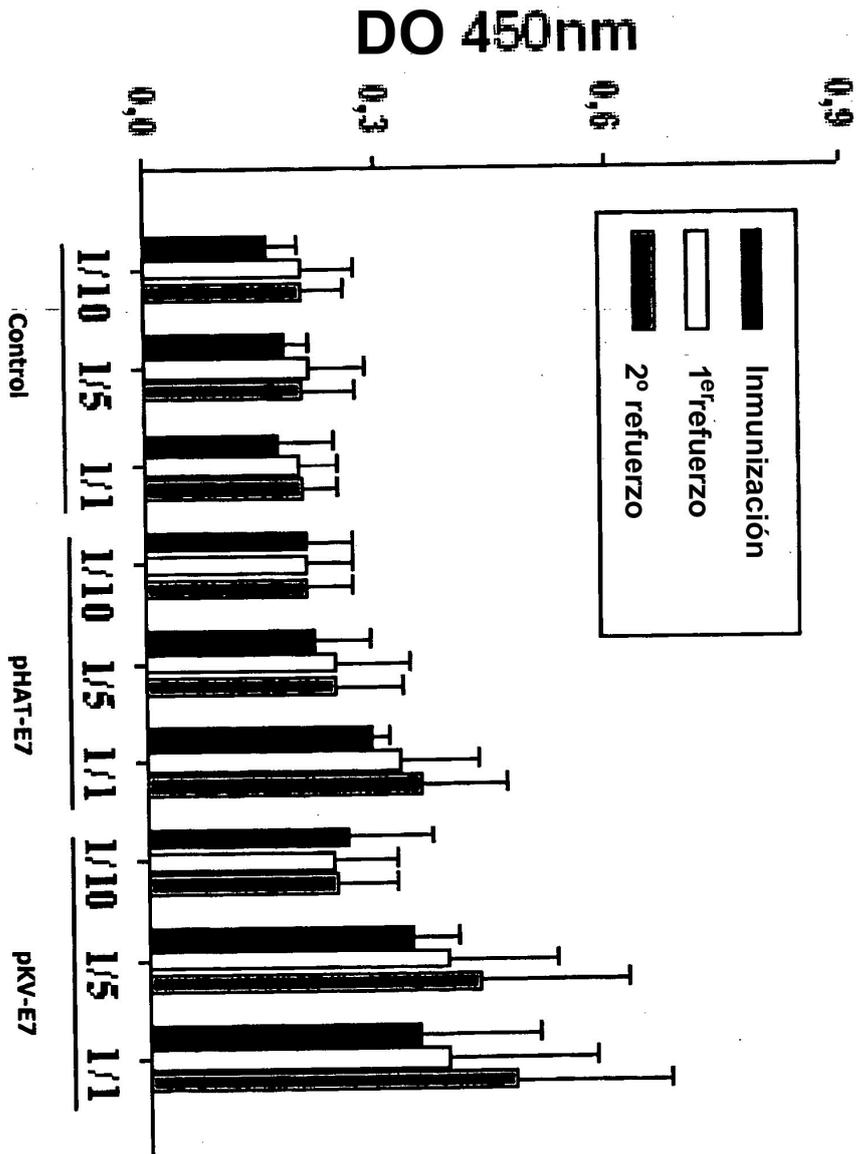


FIG. 6

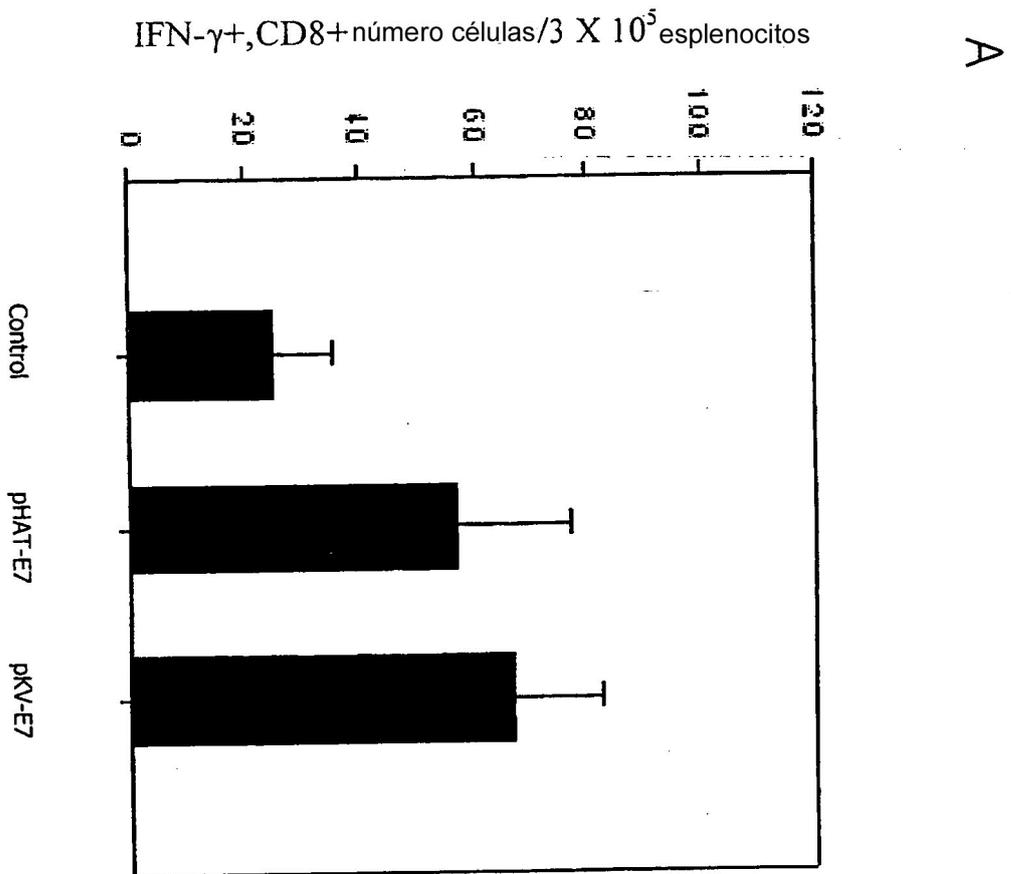


FIG. 6

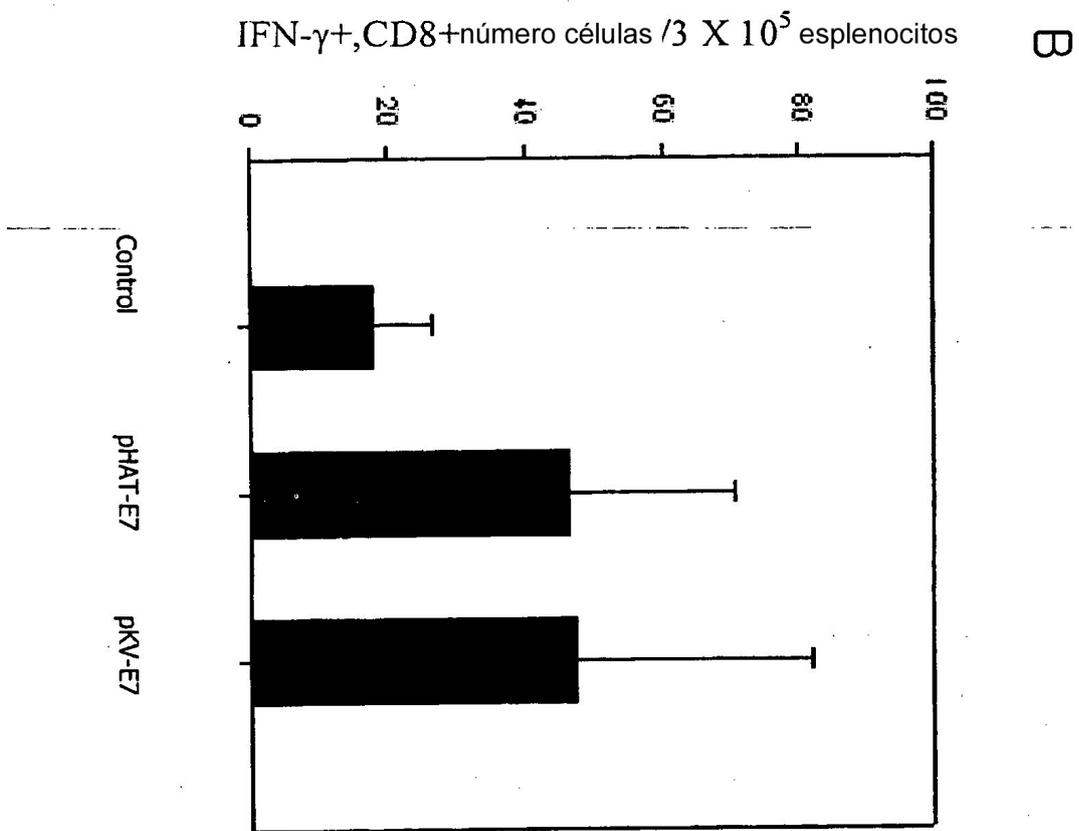


FIG. 6

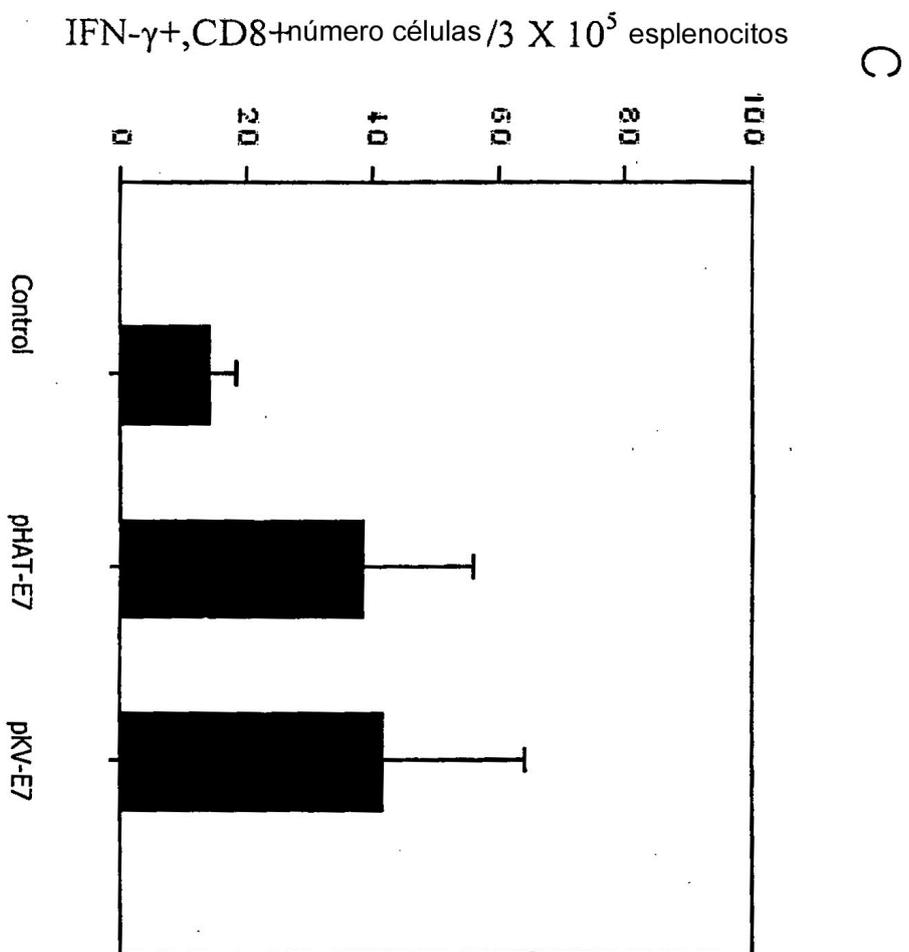


FIG. 7

[Tamaño tumor (mm<sup>2</sup>)]

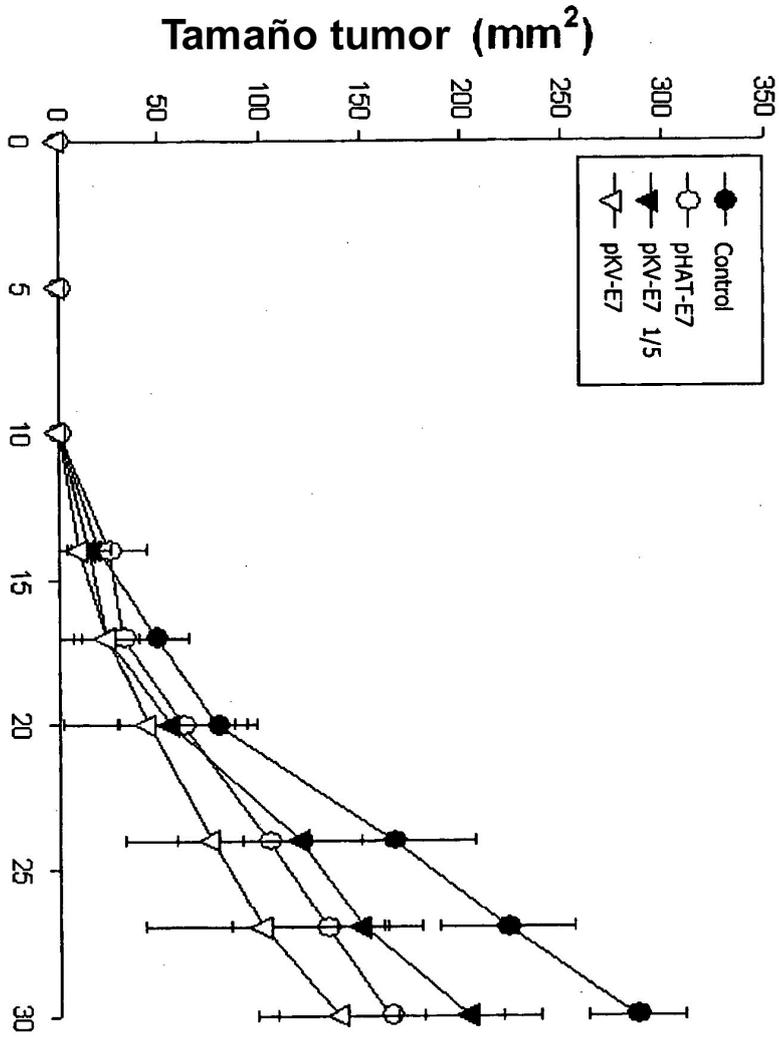


FIG. 8

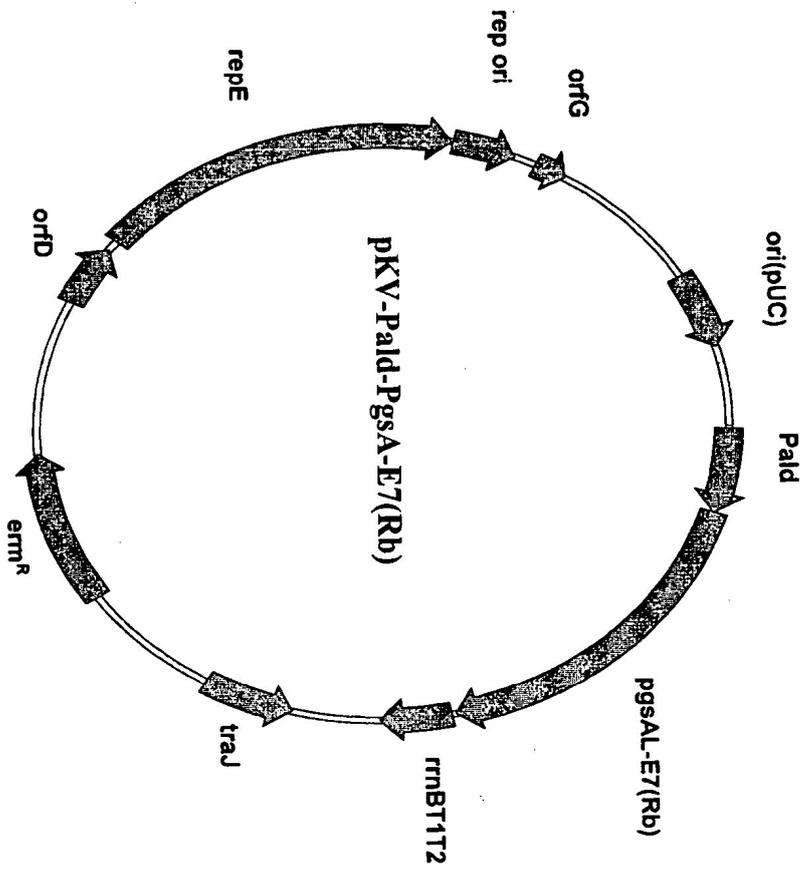


FIG. 9

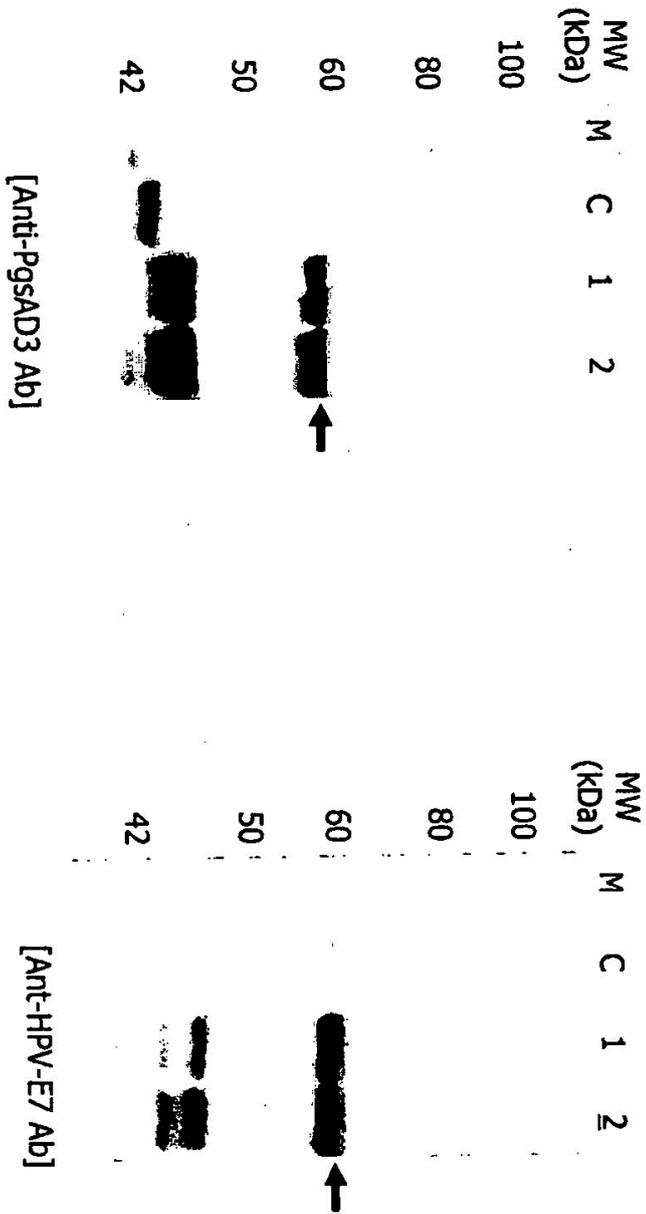


FIG. 10

A. ELISA IgG de suero específico de E7

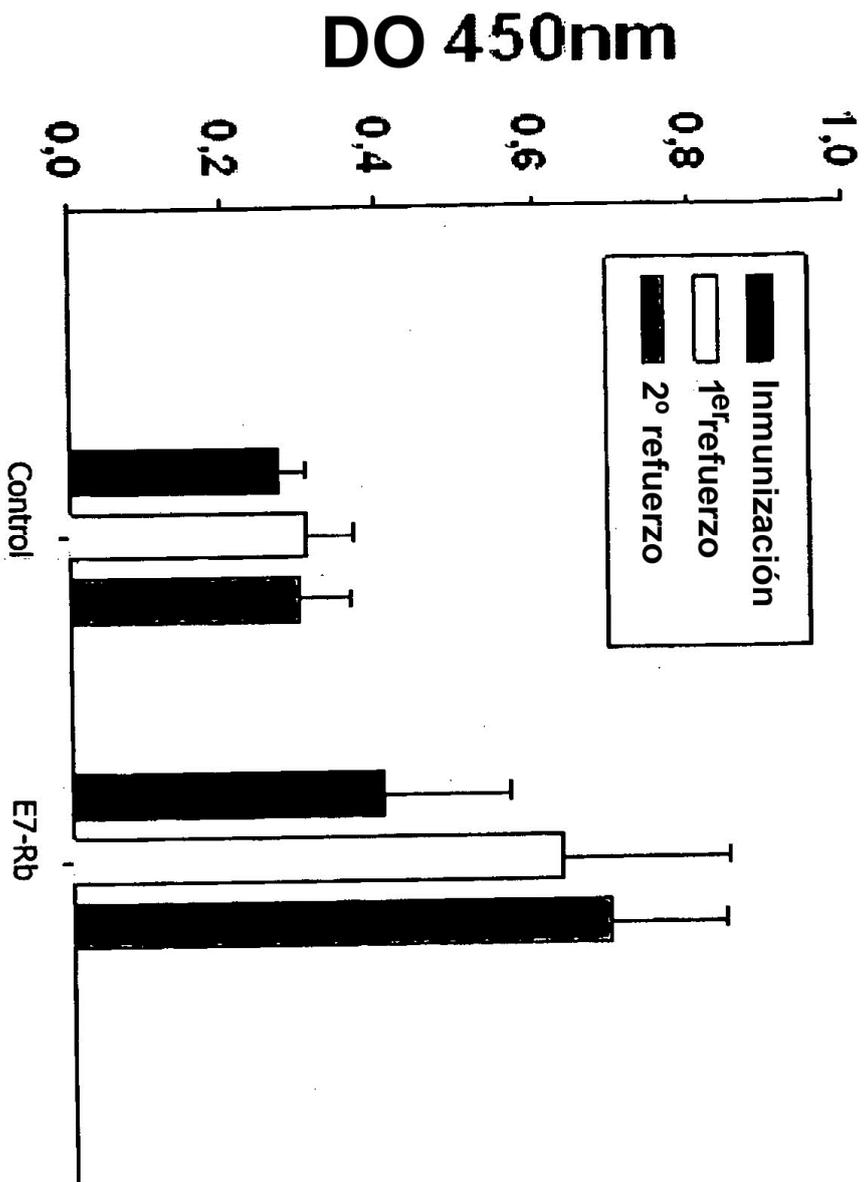


FIG. 10

B. IgA intestinal específico de E7

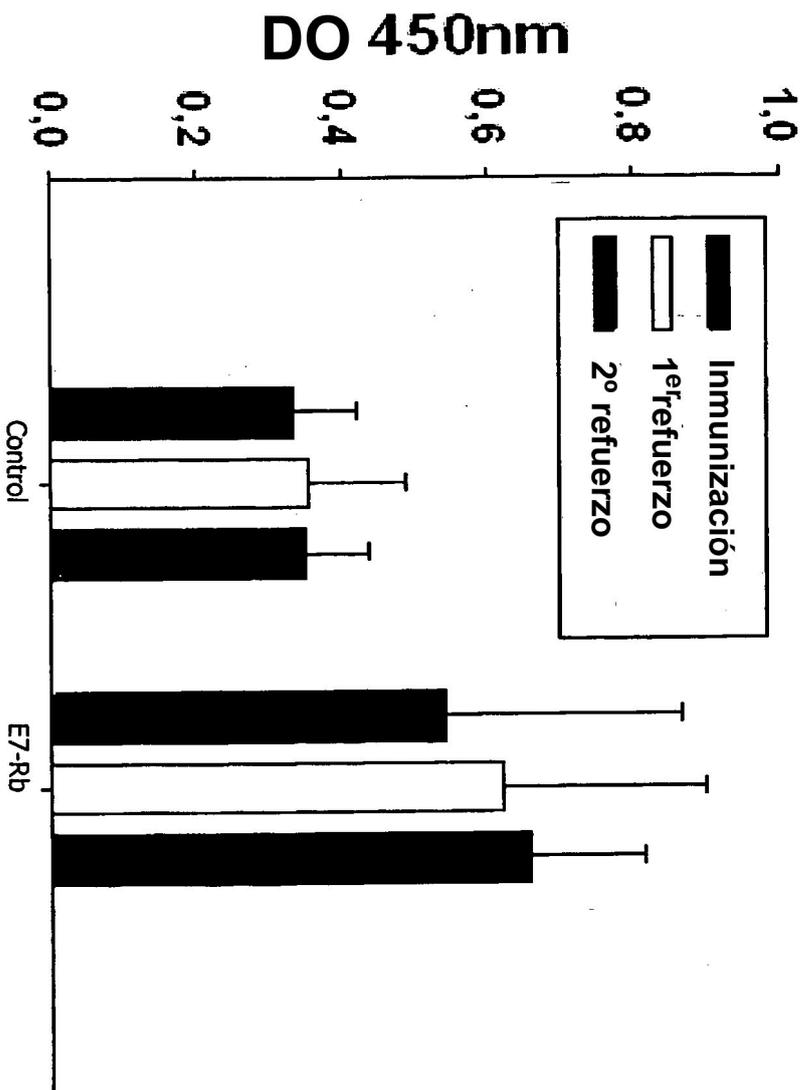


FIG. 10

C. IgA vaginal específico de E7

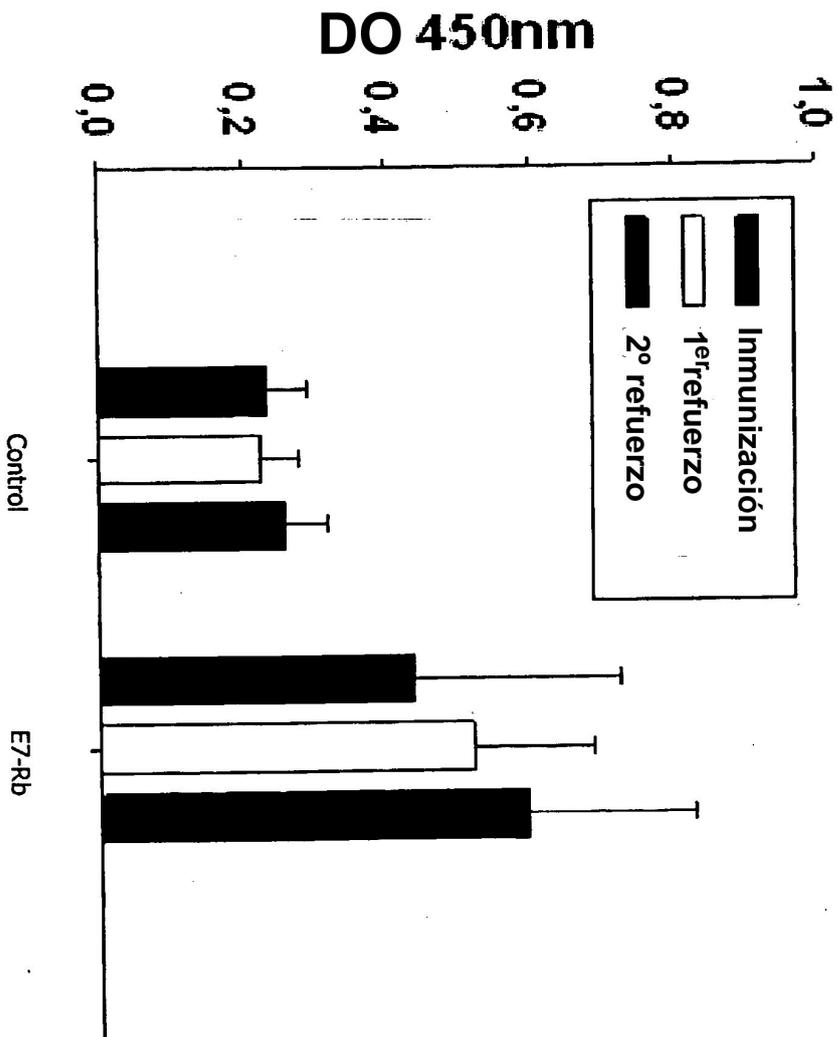


FIG. 11

