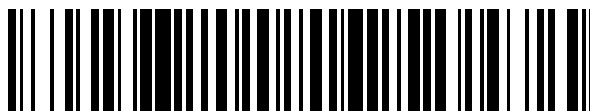


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 525 174**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/09** (2006.01)  
**A61K 31/513** (2006.01)  
**A61K 35/74** (2006.01)  
**A61K 48/00** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)  
**C12N 1/21** (2006.01)  
**C12N 9/78** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.05.2007 E 12151228 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.09.2014 EP 2468861**

54 Título: **Método de construcción de un soporte de transporte génico**

30 Prioridad:

**24.05.2006 JP 2006144720**

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

**18.12.2014**

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:

**SHIMATANI, YUKO;  
HAMAJI, YOSHINORI;  
SHIMIZU, HITOMI;  
AMANO, JUN;  
TANIGUCHI, SHUN'ICHIRO y  
FUJIMORI, MINORU**

74 Agente/Representante:

**LINAGE GONZÁLEZ, Rafael**

**ES 2 525 174 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

Método de construcción de un soporte de transporte génico

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un método de construcción de un portador de suministro génico que consiste en un microorganismo anaerobio que puede crecer en un tejido tumoral en un entorno anaerobio y que puede expresar citosina desaminasa que es útil como agente terapéutico para un tumor sólido. Además, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un portador de suministro génico construido mediante el método.

**Antecedentes de la técnica**

15 En los últimos años, se han estudiado de diversas maneras, terapias para tumor maligno usando un portador de suministro génico. Por ejemplo, con respecto a una bacteria anaerobia *Clostridium*, se ha propuesto un método de transporte de un gen a un sitio tumoral usando una bacteria transformada (véanse por ejemplo, los documentos de patente 1 y 2).

20 Asimismo, con respecto a la bacteria anaerobia *Bifidobacterium*, se ha esperado que su transformante se aplique como vector para probióticos o vector para una vacuna oral para una enfermedad infecciosa (véase por ejemplo, el documento de patente 3). Además, con respecto a *Bifidobacterium longum*, se ha sugerido su aplicación al tratamiento de un tumor sólido, porque esta bacteria se acumula en un tumor sólido hipóxico tras una administración sistémica (véanse por ejemplo, los documentos no de patente 1 y 2).

25 Además, los presentes inventores han confirmado que, mediante transformación con un plásmido recombinante pBLES100-S-eCD que porta codA de *Escherichia coli* fusionado con un promotor de una proteína de unión a ADN similar a histona derivado de *Bifidobacterium longum*, citosina desaminasa (EC3.5.4.1; denominada "CD" a continuación en el presente documento) que es una enzima que convierte 5-fluorocitosina (denominada "5-FC" a continuación en el presente documento) como profármaco (precursor) de 5-fluorouracilo (denominado "5-FU" a continuación en el presente documento) que tiene actividad antitumoral, en 5-fluorouracilo, puede expresarse en un microorganismo recombinante, y han notificado que puede esperarse que el microorganismo recombinante, por ejemplo, *Bifidobacterium longum* recombinante, se aplique a terapias de enzima-profármaco (véanse por ejemplo, el documento de patente 4 y los documentos no de patente 3 y 4). Para aplicar este microorganismo modificado genéticamente que expresa CD a terapias de enzima-profármaco, se requiere además que el microorganismo tenga resistencia a 5-FU a una concentración al menos eficaz para una actividad antitumoral, que se convierte a partir de 5-FC mediante CD. Por tanto, los presentes inventores han desarrollado y notificado un método de construcción de una bacteria resistente a 5-FU que expresa CD de este tipo (véase por ejemplo, el documento de patente 5). Por otro lado, con respecto a esta CD, el documento no de patente 5 ha notificado que cuando se añadía una mutación que sustituía ácido aspártico por alanina en el aminoácido 314 (correspondiente a la posición 315 en SEQ ID NO: 28 de la presente invención) de CD a ADN que codifica para CD en *Escherichia coli*, la CD mutante tenía la actividad de CD de convertir 5-FC en 5-FU que era aproximadamente 2,2 veces (50/23) superior a la de CD de tipo natural antes de la mutación (véase la sección del medio de la tabla 1 en documento no de patente 5).

45 Se han notificado diversos métodos de transformación en bacterias recombinantes usados en el tratamiento de tumor maligno. En los documentos descritos anteriormente, se han notificado sus respectivos métodos de preparación de una bacteria transformada.

50 Por ejemplo, el documento de patente 3 ha notificado un método de transformación que comprende las etapas de: producir un plásmido lanzadera que se replica de manera mutua tanto en una especie de *Bifidobacterium* como *Escherichia coli*, usando un plásmido derivado de una especie de *Bifidobacterium* y un plásmido derivado de *Escherichia coli*; y producir un vector recombinante ligando un gen de interés que codifica para una proteína de interés al plásmido lanzadera, en el que la especie de *Bifidobacterium* usada en la producción del plásmido lanzadera se usa como célula huésped que va a transformarse con el vector recombinante producido.

55 Además, por ejemplo, con respecto a un método de preparación de un plásmido lanzadera pBLES100 usado en la construcción del plásmido recombinante pBLES100-S-eCD, se ha notificado un método de preparación que comprende construir este plásmido lanzadera a partir de pTB6 de *Bifidobacterium longum* BK51 y pBR322 de *Escherichia coli* (véase por ejemplo, el documento no de patente 6).

60 Además, se han propuesto métodos de preparación de los plásmidos pAV001 y pBRASTA101, que pueden transformar *Bifidobacterium longum* con una eficacia de 100 veces o superior a la del plásmido lanzadera pBLES100 (véase por ejemplo, el documento no de patente 7).

65 Por tanto, se han notificado diversos métodos de construcción de un portador de suministro génico útil para el tratamiento de tumor maligno. Sin embargo, todos estos métodos han especificado microorganismos, plásmidos o

similares usados en la transformación y han usado técnicas de transformación habituales como método de transformación por sí mismo. Además, estos métodos están destinados a construir un microorganismo transformado que puede expresar por sí mismo, en una zona afectada diana, un gen de interés, por ejemplo, un gen para expresar una proteína que tiene una actividad antitumoral o una proteína que tiene la actividad de convertir un precursor de sustancia antitumoral en una sustancia antitumoral. Ningún documento ha notificado hasta la fecha un método de construcción que esté destinado a mejorar la actividad o eficacia de expresión de una proteína expresada por sí misma a partir del gen de interés.

Documento de patente 1: Patente estadounidense n.º 6416754

Documento de patente 2: Patente estadounidense n.º 6652849

Documento de patente 3: Publicación nacional de solicitud de patente internacional n.º 2004-519236

Documento de patente 4: Patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 2002-97144

Documento de patente 5: WO 2006/109619

Documento no de patente 1: Yazawa *et al.* Cancer Gene Ther., 7, 269-274 (2000)

Documento no de patente 2: Yazawa *et al.* Breast Cancer Res. Treat., 66, 165-170 (2001)

Documento no de patente 3: Nakamura *et al.*, Biosci. Biotechnol. Biochem., 66, 2362-2366 (2002)

Documento no de patente 4: Fujimori *et al.*, Curr. Opin. Drug Discov. Devel., 5, 200-203 (2002)

Documento no de patente 5: Sheri *et al.*, Protein Engineering, Design and Selection, 17 (8): 625-633 (2004)

Documento no de patente 6: Matsumura *et al.*, Biosci. Biotechnol. Biochem., 61, 1211-1212 (1997)

Documento no de patente 7: Tanaka *et al.*, Biosci Biotechnol Biochem.; 69 (2): 422-425 (2005)

### Descripción de la invención

#### Objeto que va a solucionarse mediante la invención

Todos los métodos notificados anteriormente de construcción de un portador de suministro génico útil para el tratamiento de tumor maligno están destinados a construir una bacteria transformada que puede expresar por sí misma, en una zona afectada diana, un gen de interés, por ejemplo, un gen para expresar una proteína que tiene una actividad antitumoral o una proteína que tiene la actividad de convertir un precursor de sustancia antitumoral en una sustancia antitumoral. Ningún documento ha notificado hasta la fecha un método de construcción que esté destinado a mejorar la actividad o eficacia de expresión de una proteína expresada por sí misma a partir del gen de interés.

Sin embargo, para terapias que usan un portador de suministro génico, la actividad y eficacia de expresión de una proteína expresada por un gen introducido en un microorganismo transformado son cuestiones importantes. Se requiere naturalmente que la proteína expresada por un gen en el microorganismo transformado tenga la misma actividad que la de una proteína expresada por un gen portado por el microorganismo de tipo natural original y, además, debe expresarse a un nivel igual a o superior al del gen portado por el microorganismo original.

Un objeto de la presente invención es proporcionar un método de construcción eficaz de un portador de suministro génico que tiene la actividad y eficacia de expresión favorables de una proteína expresada por un gen introducido mediante transformación. Además, un objeto de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica que comprende un portador de suministro génico construido mediante el método de construcción y un agente terapéutico para tumor sólido que comprende la bacteria resistente.

#### Medios para solucionar los problemas

Los presentes inventores han seleccionado de antemano, como gen de interés, un gen que expresa CD entre proteínas que tienen la actividad de convertir un precursor de sustancia antitumoral en una sustancia antitumoral, y han construido, como plásmido al que se incorpora el gen de interés, un plásmido pBLES100-S-eCD que comprende un plásmido de *Escherichia coli* que porta el gen para expresar CD y un plásmido derivado de *Bifidobacterium longum* fusionado con el mismo. Los presentes inventores han encontrado que *Bifidobacterium longum* 105A/pBLES100-S-eCD obtenida modificando genéticamente *Bifidobacterium longum* 105A con este plásmido, puede esperarse como portador de suministro génico útil para el tratamiento de tumor maligno, y han notificado un método de construcción del mismo que comprende, en la etapa de construir el vector de expresión génica mediante

la incorporación del gen de interés, usar un promotor implicado en la expresión de un gen que codifica para una proteína de unión a ADN similar a histona (también denominada "proteína HU" a continuación en el presente documento) derivado de *Bifidobacterium longum* e incorporar el gen de interés en el sentido de 3' del promotor para construir de ese modo un microorganismo transformado que puede expresar el gen de interés (documento de patente 4).

Los presentes inventores han realizado además estudios diligentes sobre el método anterior, y han encontrado que la frecuencia de transformación puede potenciarse usando, como plásmido de fusión al que se incorpora el gen de interés, un plásmido preparado fusionando fragmentos de plásmido derivados de *Escherichia coli* y derivados de *Bifidobacterium longum* que contienen porciones esenciales para sus replicaciones de plásmido y no contienen porciones desfavorables para la expansión de una gama de huéspedes.

Además, los presentes inventores han encontrado que para incorporar el gen de interés en el sentido de 3' del promotor implicado en la expresión de un gen que codifica para una proteína de unión a ADN similar a histona del microorganismo usado como huésped, se requiere que el gen de interés tenga, en el lado 5'-terminal del mismo, un fragmento de ADN que codifica para una región N-terminal de la proteína de unión a ADN similar a histona, y se requiere además que el fragmento de ADN comprenda un fragmento de ADN que codifica para al menos 4 aminoácidos.

Específicamente, los presentes inventores han encontrado que para incorporar el gen de interés en el sentido de 3' del promotor implicado en la expresión de un gen que codifica para la proteína de unión a ADN similar a histona, puede incorporarse un fragmento de ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos desde el 1<sup>er</sup> hasta al menos el 4<sup>o</sup> aminoácido en el extremo N-terminal de la proteína de unión a ADN similar a histona en el lado 5'-terminal de ADN del gen de interés para construir de ese modo un microorganismo que puede expresar una proteína que tiene la misma actividad que la del producto génico (proteína) en un microorganismo usado como fuente del gen de interés, a un nivel igual o superior al del microorganismo usado como fuente del gen de interés.

Los presentes inventores han encontrado además que puede producirse una proteína que tiene una actividad superior mutando parcialmente el ADN del gen de interés incorporado en la etapa de preparación del vector de expresión. Además, los presentes inventores han encontrado también que particularmente cuando el gen de interés es un gen para expresar CD entre proteínas que tienen la actividad de convertir un precursor de sustancia antitumoral en una sustancia antitumoral, puede construirse un microorganismo modificado genéticamente que tiene una alta tasa de retención del plásmido usando, como microorganismo anaerobio usado como huésped, una bacteria resistente a 5-fluorouracilo que tiene resistencia a 5-fluorouracilo a una concentración al menos eficaz para una actividad antitumoral. Como resultado, se ha completado la presente invención.

Específicamente, la presente invención se refiere a:

[1] un primer fragmento de ADN que comprende un promotor y un terminador de un gen que codifica para una proteína de unión a ADN similar a histona derivado de una bacteria del género *Bifidobacterium*, y que tiene entre el promotor y el terminador un ADN en el que se fusiona un segundo fragmento de ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos desde el 1<sup>er</sup> hasta uno cualquiera del 4<sup>o</sup> al 18<sup>o</sup> aminoácido en el extremo N-terminal de la proteína de unión a ADN similar a histona en el lado 5'-terminal de un ADN mutado que codifica para citosina desaminasa, en el que el ADN mutado que codifica para citosina desaminasa es (a) un ADN que codifica para la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID NO: 28 que tiene la metionina de iniciación excluida o (b) un ADN que codifica para la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID NO: 28 que tiene el ácido aspártico en la 315<sup>a</sup> posición sustituido por alanina y la metionina de iniciación excluida;

[2] el primer fragmento de ADN según [1], en el que la secuencia de nucleótidos que codifica para un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos desde el 1<sup>er</sup> hasta uno cualquiera del 4<sup>o</sup> al 18<sup>o</sup> aminoácido en el extremo N-terminal de la proteína de unión a ADN similar a histona es una secuencia de nucleótidos desde el 1482<sup>o</sup> hasta uno cualquiera del 1493<sup>er</sup> al 1535<sup>o</sup> nucleótido en SEQ ID NO: 15;

[3] el primer fragmento de ADN según [1] o [2], en el que el péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos desde el 1<sup>er</sup> hasta uno cualquiera del 4<sup>o</sup> al 18<sup>o</sup> aminoácido en el extremo N-terminal de la proteína de unión a ADN similar a histona es un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos desde el 1<sup>er</sup> aminoácido hasta uno cualquiera del 4<sup>o</sup> al 18<sup>o</sup> aminoácido en SEQ ID NO: 29; y

[4] el primer fragmento de ADN según [3], en el que el péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos desde el 1<sup>er</sup> hasta uno cualquiera del 4<sup>o</sup> al 18<sup>o</sup> aminoácido en SEQ ID NO: 29 es un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos desde el 1<sup>er</sup> hasta el 9<sup>o</sup> aminoácido en SEQ ID NO: 29.

Además, la presente invención se refiere a:

[5] un método de construcción de un portador de suministro génico que consiste en un microorganismo anaerobio que puede crecer en un tejido tumoral en un entorno anaerobio y que puede expresar citosina desaminasa, que comprende las etapas de:

5 (1) preparar un plásmido de fusión que tiene un fragmento de un plásmido de una bacteria del género *Bifidobacterium* y un fragmento de un plásmido de *Escherichia coli*;

10 (2) incorporar un primer fragmento de ADN que comprende un promotor y un terminador de un gen que codifica para una proteína de unión a ADN similar a histona derivado de una bacteria del género *Bifidobacterium*, al plásmido de fusión;

15 (3) incorporar, entre el promotor y el terminador, un ADN en el que se fusiona un segundo fragmento de ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos desde el 1<sup>er</sup> hasta uno cualquiera del 4<sup>o</sup> al 18<sup>o</sup> aminoácido en el extremo N-terminal de la proteína de unión a ADN similar a histona en el lado 5'-terminal de un ADN mutado que codifica para citosina desaminasa para preparar un vector de expresión; y

20 (4) transformar un microorganismo anaerobio con el vector de expresión, en el que el ADN mutado que codifica para citosina desaminasa es (a) un ADN que codifica para la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID NO: 28 que tiene la metionina de iniciación excluida o (b) un ADN que codifica para la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID NO: 28 que tiene el ácido aspártico en la 315<sup>a</sup> posición sustituida por alanina y la metionina de iniciación excluida;

25 [6] el método de construcción de un portador de suministro génico según [5], en el que la secuencia de nucleótidos que codifica para un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos desde el 1<sup>er</sup> hasta uno cualquiera del 4<sup>o</sup> al 18<sup>o</sup> aminoácido en el extremo N-terminal de la proteína de unión a ADN similar a histona es una secuencia de nucleótidos desde el 1482<sup>o</sup> hasta uno cualquiera del 1493<sup>er</sup> al 1535<sup>o</sup> nucleótido en SEQ ID NO: 15; y

30 [7] el método de construcción de un portador de suministro génico según [5] o [6], en el que el péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos desde el 1<sup>er</sup> hasta uno cualquiera del 4<sup>o</sup> al 18<sup>o</sup> aminoácido en el extremo N-terminal de la proteína de unión a ADN similar a histona es un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos desde el 1<sup>er</sup> hasta uno cualquiera del 4<sup>o</sup> al 18<sup>o</sup> aminoácido en SEQ ID NO: 29.

35 Además, la presente invención se refiere a:

[8] un portador de suministro génico que consiste en un microorganismo anaerobio que puede crecer en un tejido tumoral en un entorno anaerobio, construyéndose el portador de suministro génico mediante un método de construcción según uno cualquiera de [5] a [7];

40 [9] el portador de suministro génico según [8], en el que la bacteria anaerobia es una bacteria del género *Bifidobacterium*; y

45 [10] el portador de suministro génico según [9], en el que la bacteria del género *Bifidobacterium* es cualquier bacteria del género *Bifidobacterium* seleccionada de *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium thermophilum*, *Bifidobacterium pseudolongum*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve* y *Bifidobacterium longum*.

Además, la presente invención se refiere a:

50 [11] una composición farmacéutica que comprende un portador de suministro génico según uno cualquiera de [8] a [10].

En la presente memoria descriptiva, el ADN que codifica para citosina desaminasa también se denomina "ADN que codifica para la proteína de interés" a continuación en el presente documento.

55 Según la presente invención, puede construirse eficazmente un portador de suministro génico que consiste en un microorganismo anaerobio que puede crecer en un tejido tumoral en un entorno anaerobio y que puede expresar citosina desaminasa, que es útil como agente terapéutico para tumor sólido y tiene la actividad y eficacia de expresión favorables de una proteína expresada mediante un gen introducido mediante transformación.

60 Mediante la administración del portador de suministro génico según la presente invención a un paciente con tumor maligno o similar, el microorganismo anaerobio como portador de suministro génico de la presente invención prolifera en el tumor y expresa la proteína de interés en el mismo. Puesto que la proteína de interés es una proteína que tiene la actividad de convertir un precursor de sustancia antitumoral en una sustancia antitumoral, la proteína de interés expresada a partir del portador de suministro génico convierte un precursor de sustancia antitumoral en una sustancia antitumoral en la coexistencia del portador de suministro génico y el precursor de sustancia antitumoral en

el sitio tumoral, y la sustancia antitumoral presenta su efecto antitumoral.

Como proteína que tiene la actividad de convertir un precursor de sustancia antitumoral en una sustancia antitumoral es CD, se usa preferiblemente 5-FC como precursor de sustancia antitumoral. 5-FC se convierte en 5-FU mediante CD, y este 5-FU presenta un efecto antitumoral excelente. La administración sistémica de 5-FU en una cantidad que produce un efecto antitumoral suficiente mediante la administración sistémica provoca efectos secundarios sistémicos. Sin embargo, el uso del portador de suministro génico de la presente invención puede convertir 5-FC con pocos efectos secundarios en 5-FU de una manera específica para un sitio tumoral. Por tanto, puede lograrse una concentración de 5-FU mucho más alta en el tumor que la lograda mediante la administración directa de 5-FU. Como resultado, se obtiene un efecto antitumoral extremadamente excelente.

Sin embargo, sólo la conversión de 5-FC en 5-FU en un sitio tumoral usando un portador de suministro génico que expresa CD no es suficiente para obtener un agente terapéutico para un tumor a un nivel que puede ponerse fácilmente en uso práctico. El efecto antitumoral o la funcionalidad de un agente terapéutico de este tipo para tumor depende en gran medida de tres factores: el nivel de células de un microorganismo anaerobio como portador de suministro génico; el grado de actividad de CD presentado por el microorganismo anaerobio; y la concentración de 5-FC en un sitio tumoral. Cuanto mayores son las dosis de 5-FC y microorganismo anaerobio, más fuerte se hace el efecto antitumoral obtenido de manera natural. Desde el punto de vista de minimizar los efectos secundarios, se prefiere que la dosis de 5-FC se reduzca tanto como sea posible dentro de un intervalo que produce un efecto antitumoral necesario. Se requiere al menos que la dosis sea inferior a la aceptable clínicamente. Además, incluso si se usa un microorganismo anaerobio con la toxicidad más baja, se prefiere desde el punto de vista de minimizar la influencia sobre el cuerpo humano que su dosis se reduzca tanto como sea posible dentro de un intervalo que produce un efecto antitumoral necesario. En consideración a estas situaciones, ninguno de los agentes antitumorales convencionales que usan la conversión de 5-FC en 5-FU en un sitio tumoral usando un portador de suministro génico que expresa CD tenía funcionalidad suficiente a nivel clínico.

Por ejemplo, en el ejemplo 4 en el documento de patente 4, la concentración de 5-FC usada en experimentos de tratamiento usando ratones era de 500 mg/kg, y se obtuvo un efecto antitumoral eficaz y suficiente a la concentración. Sin embargo, tal como puede observarse a partir de la descripción "para fungemia, meningitis fúngica, infección respiratoria micótica y cromomicosis, este fármaco se administra habitualmente por vía oral a cuatro dosis divididas de 100 a 200 mg/kg/día como fluorocitosina; para micosis del tracto urinario y micosis del tracto digestivo, este fármaco se administra habitualmente por vía oral a cuatro dosis divididas de 50 a 100 mg/kg/día como fluorocitosina" para la dosificación y administración del agente terapéutico ANCOTIL (que contiene 500 mg de flucitosina descrita en la farmacopea japonesa) para micosis profunda de Kyowa Pharmaceutical Industry, Co., Ltd., la dosis máxima de 5-FC realmente aceptable en ensayos clínicos es de 200 mg/kg. Por tanto, para obtener un efecto antitumoral suficiente a la dosis clínica (200 mg/kg) de 5-FC usando el sistema experimental usado en el ejemplo en el documento de patente 4, se requería una actividad enzimática al menos 2,5 veces ( $\approx 500/200$ ) superior.

Por otro lado, el documento no de patente 5 ha notificado que cuando se añadía una mutación que sustituía ácido aspártico por alanina en el 314<sup>º</sup> aminoácido (correspondiente a la 315<sup>a</sup> posición en SEQ ID NO: 28 de la presente invención) de CD a ADN que codifica para CD en *Escherichia coli*, CD mutante tenía una actividad de CD (valor de kcat/Km) de conversión de 5-FC en 5-FU que era aproximadamente 2,2 veces (50/23) superior a la de CD de tipo normal antes de la mutación. Este efecto potenciado de producción de una actividad superior es todavía insuficiente para lograr los objetos. Sin embargo, en el portador de suministro génico de la presente invención, se permitió que el ADN que codifica para CD como proteína de interés comprendiese adicionalmente, en el lado 5'-terminal del mismo, un fragmento de ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos desde el 1<sup>er</sup> hasta al menos el 4<sup>º</sup> aminoácido en el extremo N-terminal de la proteína de unión a ADN similar a histona, y el ácido aspártico en la 315<sup>a</sup> posición en SEQ ID NO: 28 de la CD se substituyó por alanina. Como resultado, de manera totalmente inesperada, se obtuvo una actividad de CD que era incluso aproximadamente 12 veces superior.

A partir de esta actividad de CD 12 veces superior, se calculó que la dosis de 5-FC era de aproximadamente 42 mg/kg, con respecto a los resultados experimentales descritos anteriormente. Esto significa que una dosis clínica mínima (50 mg/kg) o inferior es suficiente. Por tanto, puede lograrse una funcionalidad extremadamente alta.

Por tanto, entre los portadores de suministro génico de la presente invención, el portador de suministro génico (por ejemplo, *Bifidobacterium longum* 105-A/pAV001-HU-eCD-M968) de la presente invención, en el que se permite que el ADN que codifica para CD como proteína de interés comprenda adicionalmente, en el lado 5'-terminal del mismo, un fragmento de ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos desde el 1<sup>er</sup> hasta uno cualquiera del 4<sup>º</sup> al 18<sup>º</sup> aminoácido en el extremo N-terminal de la proteína de unión a ADN similar a histona, y el ácido aspártico en la 315<sup>a</sup> posición en SEQ ID NO: 28 de la CD se ha substituido por alanina, puede esperarse particularmente que tenga una funcionalidad excelente.

De hecho, se ha confirmado que cuando se usa un portador de suministro génico que expresa CD no mutado (*Bifidobacterium longum* recombinante) usado en el documento de patente 4 en un sistema de tratamiento que usa

ratones desnudos trasplantados con una línea de células de cáncer de mama (KPL-1) derivada de ser humano, la concentración bacteriana requerida para convertir 5-FC en una concentración eficaz de 5-FU en el tumor es de  $10^7$  UFC/g o más. Se ha confirmado mediante los experimentos de los presentes inventores que cuando se usa el portador de suministro génico de la presente invención, en el que el ácido aspártico en la 315ª posición en SEQ ID NO: 28 de la CD se ha sustituido por alanina, en el mismo sistema experimental, se obtiene una concentración de 5-FU equivalente en el tumor a una concentración bacteriana de  $10^5$  UFC/g, que es 1/100 de la concentración bacteriana descrita anteriormente.

#### Breve descripción de los dibujos

[Figura 1]

Es un diagrama que muestra el procedimiento de preparación de *Bifidobacterium longum* 105A/pAV001-HU-eCD.

[Figura 2]

Es un diagrama que muestra la actividad de CD (concentración de 5-FU convertido a partir de 5-FC) en *Bifidobacterium longum* 105A/pAV001-HU-eCD.

[Figura 3]

Es un diagrama que muestra el procedimiento de construcción de un plásmido que añade los 2 aminoácidos N-terminales de la proteína HU.

[Figura 4]

Es un diagrama que muestra los resultados de las tasas de retención de plásmidos de dos clases de *Bifidobacterium longum* 105A resistente a 5-FU/pAV001-HU-eCD-M968.

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

Un método de construcción de un portador de suministro génico según la presente invención, es un método de construcción de un portador de suministro génico que consiste en un microorganismo anaerobio que puede crecer en un tejido tumoral en un entorno anaerobio y que puede expresar citosina desaminasa, que comprende las etapas de:

(1) preparar un plásmido de fusión que tiene un fragmento de un plásmido de una bacteria del género *Bifidobacterium* y un fragmento de un plásmido de *Escherichia coli*;

(2) incorporar un primer fragmento de ADN que comprende un promotor y un terminador de un gen que codifica para una proteína de unión a ADN similar a histona derivado de una bacteria del género *Bifidobacterium*, al plásmido de fusión;

(3) incorporar, entre el promotor y el terminador, un ADN en el que se fusiona un segundo fragmento de ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos desde el 1<sup>er</sup> hasta uno cualquiera del 4<sup>o</sup> al 18<sup>o</sup> aminoácido en el extremo N-terminal de la proteína de unión a ADN similar a histona en el lado 5'-terminal de un ADN mutado que codifica para citosina desaminasa para preparar un vector de expresión; y

(4) transformar un microorganismo anaerobio con el vector de expresión, en el que el ADN mutado que codifica para citosina desaminasa es (a) un ADN que codifica para la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID NO: 28 que tiene la metionina de iniciación excluida o (b) un ADN que codifica para la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID NO: 28 que tiene el ácido aspártico en la 315ª posición sustituido por alanina y la metionina de iniciación excluida.

El método de construcción de un portador de suministro génico según la presente invención no está limitado particularmente siempre que comprenda las etapas de: (1) preparar un plásmido de fusión que tiene un fragmento de un plásmido de una bacteria del género *Bifidobacterium* y un fragmento de un plásmido de *Escherichia coli*; (2) incorporar un primer fragmento de ADN que comprende un promotor y un terminador de un gen que codifica para una proteína de unión a ADN similar a histona derivado de una bacteria del género *Bifidobacterium* al plásmido de fusión; (3) incorporar, entre el promotor y el terminador, un ADN en el que se fusiona un segundo fragmento de ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos desde el 1<sup>er</sup> hasta uno cualquiera del 4<sup>o</sup> al 18<sup>o</sup> aminoácido en el extremo N-terminal de la proteína de unión a ADN similar a histona en el lado 5'-terminal de un ADN mutado que codifica para citosina desaminasa para preparar un vector de expresión; y (4) transformar un microorganismo anaerobio con el vector de expresión, en el que el ADN mutado que codifica para citosina desaminasa es (a) un ADN que codifica para la secuencia de

aminoácidos mostrada como SEQ ID NO: 28 que tiene la metionina de iniciación excluida o (b) un ADN que codifica para la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID NO: 28 que tiene el ácido aspártico en la 315ª posición sustituido por alanina y la metionina de iniciación excluida.

- 5 El método de construcción de un portador de suministro génico según la presente invención no está limitado particularmente siempre que comprenda las etapas (1) a (4). Puede comprender adicionalmente una etapa arbitraria a menos que se alteren los efectos de la presente invención. Además, en el método de construcción de un portador de suministro génico según la presente invención, el orden en el que se realizan las etapas (2) y (3) no está limitado particularmente. Puede comprender estas etapas en el orden de las etapas (1), (2), (3) y (4) o puede comprender estas etapas en el orden de las etapas (1), (3), (2) y (4). Ambos de estos aspectos se abarcan en el método de construcción de un portador de suministro génico según la presente invención por conveniencia.

15 Particularmente, para incorporar el ADN que codifica para la proteína de interés en la etapa (3) de preparación del vector de expresión, el aspecto de fusionar un fragmento de ADN que codifica para la región N-terminal de la proteína HU en el lado 5'-terminal del ADN que codifica para la proteína de interés puede implicar: añadir el fragmento de ADN que codifica para la región N-terminal de la proteína HU al lado 5'-terminal del ADN que codifica para la proteína de interés, para incorporar de ese modo el fragmento de ADN en el mismo; o puede implicar la incorporación del ADN que codifica para la proteína de interés en la posición intermedia del ADN que codifica para la proteína HU de manera que el ADN que codifica para la proteína de interés se intercala entre el ADN que codifica para la región N-terminal de la proteína HU y el ADN que codifica para la región C-terminal de la proteína HU.

25 El orden en el que en la etapa (3) de preparación del vector de expresión, se permite que el ADN que codifica para la proteína de interés comprenda, en el lado 5'-terminal del mismo, un fragmento de ADN que codifica para la región N-terminal de la proteína HU, no está limitado particularmente siempre que se obtenga un vector de expresión que comprende el fragmento de ADN que codifica para la región N-terminal de la proteína HU en el lado 5'-terminal del ADN que codifica para la proteína de interés. Por ejemplo, tras permitir que el ADN que codifica para la proteína de interés comprenda, en el lado 5'-terminal del mismo, el fragmento de ADN que codifica para la región N-terminal de la proteína HU, el ADN resultante puede incorporarse al plásmido de fusión. Alternativamente, tras incorporar el ADN que codifica para la proteína de interés al plásmido de fusión, el fragmento de ADN que codifica para la región N-terminal de la proteína HU puede incorporarse al lado 5'-terminal del ADN que codifica para la proteína de interés. O de lo contrario, tras incorporar el fragmento de ADN que codifica para la región N-terminal de la proteína HU al plásmido de fusión, el ADN que codifica para la proteína de interés puede incorporarse al lado 3'-terminal del fragmento de ADN que codifica para la región N-terminal de la proteína HU.

35 El fragmento de ADN que codifica para la región N-terminal de la proteína HU es un fragmento de ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos desde el 1<sup>er</sup> aminoácido hasta uno cualquiera del 4<sup>o</sup> al 18<sup>o</sup> aminoácidos en el extremo N-terminal de la proteína HU. La secuencia de aminoácidos desde el 1<sup>er</sup> hasta el 18<sup>o</sup> aminoácido en el extremo N-terminal de la proteína HU se describe en SEQ ID NO: 29. La secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29 es una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos desde el 1482<sup>o</sup> hasta el 1535<sup>o</sup> nucleótido en SEQ ID NO: 40 15.

45 Los ejemplos de un plásmido que tiene un fragmento de ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos desde el 1<sup>er</sup> hasta el 4<sup>o</sup> aminoácido en el extremo N-terminal de la proteína HU, pueden incluir pAV001-HU4aa-eCD (SEQ ID NO: 14). Los ejemplos de un plásmido que tiene un fragmento de ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos desde el 1<sup>er</sup> hasta el 9<sup>o</sup> aminoácido en el extremo N-terminal de la proteína HU, pueden incluir pAV001-HU-eCD (pAV001-HU9aa-eCD). Los ejemplos de un plásmido que tiene un fragmento de ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos desde el 1<sup>er</sup> hasta el 18<sup>o</sup> aminoácido en el extremo N-terminal de la proteína HU, pueden incluir pAV001-HU18aa-eCD (SEQ ID NO: 15).

55 El método de cambio de la longitud de la región N-terminal de la proteína HU no está limitado particularmente. Tal como se realiza en los ejemplos descritos más adelante, se diseñan cebadores apropiados basándose en la secuencia de la región N-terminal de la proteína HU, y puede obtenerse fácilmente la secuencia de una región N-terminal que tiene el número de aminoácidos deseado mediante PCR o similar usando esos cebadores.

60 Además, el método de construcción de la presente invención es un método de construcción método que usa un plásmido de fusión que tiene un fragmento de un plásmido de una bacteria del género *Bifidobacterium* y un fragmento de un plásmido de *Escherichia coli* en la etapa (1). El fragmento de un plásmido de una bacteria del género *Bifidobacterium* usado en la presente invención es preferiblemente un fragmento de un plásmido derivado de *Bifidobacterium longum*. Los ejemplos del mismo pueden incluir porciones de regiones derivadas de pTB6 que contienen un origen de replicación (oriV) de pTB6 (n.ºs de bases 3419 a 3778 de SEQ ID NO: 14)-porción de repB (n.ºs de bases 3983 a 4676 de SEQ ID NO: 14) y que no contienen regiones MembB, MobA, OriI ni oriT.

65 Además, los ejemplos del fragmento de un plásmido de *Escherichia coli* usado en la presente invención pueden



incluir fragmentos de plásmidos que contienen una región de origen de replicación (ori) de *Escherichia coli* (n.<sup>os</sup> de bases 6356 a 6999 de SEQ ID NO: 14) y que no contienen un gen de resistencia a ampicilina (ampR) o que carecen de ADN que codifica para una región de  $\beta$ -lactamasa que es un producto de expresión del gen de resistencia a ampicilina (ampR).

5 Pueden obtenerse el promotor y el terminador de un gen que codifica para la proteína HU derivado de una bacteria del género *Bifidobacterium*, que se usan en la etapa (2) del método de construcción de la presente invención, mediante un enfoque conocido en la técnica. Más específicamente, basándose en la secuencia de una proteína HU de una bacteria del género *Bifidobacterium* conocida en la técnica, puede clonarse un gen que codifica para la proteína HU de una bacteria del género *Bifidobacterium* para obtener de ese modo un promotor y un terminador del gen.

10 Por ejemplo, pueden facilitarse a modo de ejemplo preferiblemente secuencias que contienen el promotor y el terminador de un gen que codifica para la proteína HU derivado de *Bifidobacterium longum* mediante ADN tal como se expone en los n.<sup>os</sup> de bases 234 a 1481 de SEQ ID NO: 14 o 15 y ADN tal como se expone en los n.<sup>os</sup> de bases 2979 a 3098 de SEQ ID NO: 14 (n.<sup>os</sup> de bases 3021 a 3140 de SEQ ID NO: 15), respectivamente.

15 El microorganismo anaerobio transformado con el vector de expresión según la presente invención para construir el microorganismo anaerobio como portador de suministro génico de la presente invención no está limitado particularmente siempre que pueda usarse en la presente invención. Se prefiere que el microorganismo anaerobio sea una bacteria anaerobia, más preferiblemente una bacteria entérica, incluso más preferiblemente una bacteria del género *Bifidobacterium*.

20 Los ejemplos de la bacteria del género *Bifidobacterium* incluyen *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium thermophilum*, *Bifidobacterium pseudolongum*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve* y *Bifidobacterium longum*. La *Bifidobacterium longum* es la más preferida.

25 Todas estas bacterias están disponibles comercialmente o pueden obtenerse fácilmente de instituciones de depósito. Por ejemplo, *Bifidobacterium longum* ATCC-15707, *Bifidobacterium bifidum* ATCC-11863 y *Bifidobacterium infantis* ATCC-15697 pueden obtenerse fácilmente de la ATCC (Colección Americana de Cultivos Tipo).

30 Además, las cepas de cada bacteria no están limitadas particularmente. Los ejemplos de cepas de *Bifidobacterium longum* pueden incluir las cepas *Bifidobacterium longum* 105-A, *Bifidobacterium longum* aE-194b, *Bifidobacterium longum* bs-601 y *Bifidobacterium longum* M101-2. Entre ellas, se prefiere la cepa *Bifidobacterium longum* 105-A.

35 Los ejemplos de cepas de *Bifidobacterium breve* pueden incluir una cepa de tipo *Bifidobacterium breve* (JCM1192) y las cepas *Bifidobacterium breve* aS-1 y *Bifidobacterium breve* I-53-8W. Entre ellas, se prefieren la cepa de tipo *Bifidobacterium breve* y las cepas *Bifidobacterium breve* aS-1 y *Bifidobacterium breve* I-53-8W.

40 Los ejemplos de cepas de *Bifidobacterium infantis* pueden incluir una cepa de tipo *Bifidobacterium infantis* (JCM1222) y una cepa *Bifidobacterium infantis* I-10-5. Entre ellas, se prefieren la cepa de tipo *Bifidobacterium infantis* y la cepa *Bifidobacterium infantis* I-10-5. Además, los ejemplos de cepas de *Bifidobacterium lactentis* pueden incluir una cepa de tipo *Bifidobacterium lactentis* (JCM1220).

45 En el portador de suministro génico de la presente invención, el ADN incorporado en la etapa (3) codifica para CD que es una enzima que convierte el precursor de sustancia antitumoral 5-FC en la sustancia antitumoral 5-FU.

50 El ADN aislado del plásmido pAdex1CSCD (Riken Gene Bank RDB n.º 1591) contiene ADN que codifica para CD derivada de *Escherichia coli*. El plásmido pMK116 también contiene ADN que codifica para CD derivada de *Escherichia coli* (D.A. Mead *et al.*, Protein Engineering 1: 67-74 (1986)).

55 El ADN que codifica para CD derivada de *Escherichia coli* corresponde a, por ejemplo, una secuencia de nucleótidos desde el 1494<sup>o</sup> hasta el 2774<sup>o</sup> nucleótido en SEQ ID NO: 14 (secuencia de nucleótidos desde el 1536<sup>o</sup> hasta el 2816<sup>o</sup> nucleótido en SEQ ID NO: 15). Además, su secuencia de aminoácidos corresponde a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 28 excepto por la metionina de iniciación.

60 El método de construcción de un portador de suministro génico según la presente invención puede implicar mutar el ADN que codifica para citosina desaminasa y luego incorporar el ADN mutado en un vector de expresión en la etapa (3). Alternativamente, tras preparar un vector de expresión en la etapa (3), puede mutarse la parte de ADN que codifica para la proteína de interés. La etapa de mutación, tras preparar un vector de expresión en la etapa (3), la parte de ADN que codifica para la proteína de interés es más específicamente una etapa de mutación del ADN que codifica para citosina desaminasa que se ha incorporado en el vector de expresión preparado en la etapa (3).

65 El medio de mutación no está limitado particularmente, y puede usarse un enfoque conocido en la técnica tal como mutagénesis específica de sitio usando PCR.

La proteína de interés es CD de *Escherichia coli*. Se prefiere que el ácido aspártico codificado por una secuencia de nucleótidos desde el 2433<sup>er</sup> hasta el 2435<sup>o</sup> nucleótido en SEQ ID NO: 14 (secuencia de nucleótidos desde el 2475<sup>o</sup> hasta el 2477<sup>o</sup> nucleótido en SEQ ID NO: 15) se sustituya por alanina. El ácido aspártico codificado por una secuencia de nucleótidos desde el 2433<sup>er</sup> hasta el 2435<sup>o</sup> nucleótido en SEQ ID NO: 14 (secuencia de nucleótidos desde el 2475<sup>o</sup> hasta el 2477<sup>o</sup> nucleótido en SEQ ID NO: 15) corresponde a ácido aspártico en la 315<sup>a</sup> posición en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 28.

Esta sustitución produce una actividad de CD mucho más excelente que la producida en ausencia de sustitución.

Los ejemplos del vector de expresión según la presente invención pueden incluir un vector de expresión de CD para una bacteria del género *Bifidobacterium* en el que se ha incorporado ADN que codifica para CD. Los ejemplos específicos de los mismos pueden incluir: un plásmido recombinante pBLES100-S-eCD que porta codA de *Escherichia coli* insertado en el sentido de 3' de un promotor hup de *Bifidobacterium longum* (véanse el documento de patente 4 y el documento no de patente 3); pAV001-HU-eCD (pAV001-HU9aa-eCD) modificado a partir de este pBLES100-S-eCD, que puede transformar *Bifidobacterium longum* o *Bifidobacterium breve*; y mutantes de estos plásmidos.

En este contexto, los mutantes de los plásmidos significan vectores en los que se ha mutado el ADN, por ejemplo, ADN que codifica para CD, incorporado en los plásmidos, que son plásmidos que pueden usarse de la misma manera como o más preferiblemente que los vectores originales mutados. Por ejemplo, un mutante de pBLES100-S-eCD significa un mutante de ADN de plásmido derivado de pBLES100-S-eCD, que es un plásmido que puede usarse de la misma manera como o más preferiblemente que pBLES100-S-eCD en la presente invención. Alternativamente, un mutante de pAV001-HU-eCD significa un mutante de ADN de plásmido derivado de pAV001-HU-eCD, que es un plásmido que puede usarse de la misma manera como o más preferiblemente que pAV001-HU-eCD en la presente invención.

Tales mutantes de los plásmidos pueden facilitarse a modo de ejemplo preferiblemente mediante un plásmido pAV001-HU-eCD-M968 (SEQ ID NO: 27) que es un plásmido en el que se ha introducido una mutación de un único nucleótido en una región que codifica para CD del plásmido pAV001-HU-eCD. En el plásmido pAV001-HU-eCD-M968, se ha sustituido el ácido aspártico codificado por una secuencia de nucleótidos desde el 2433<sup>er</sup> hasta el 2435<sup>o</sup> nucleótido en SEQ ID NO: 14 por alanina. Como resultado, se mejora notablemente la actividad de CD.

El portador de suministro génico de la presente invención no está limitado particularmente siempre que sea un portador de suministro génico construido mediante el método de la presente invención.

Los ejemplos del portador de suministro génico de la presente invención obtenido usando un vector de expresión que tiene el ADN mutado que codifica para la proteína de interés, pueden incluir un plásmido mutante en un único nucleótido de *Bifidobacterium longum* 105-A/pAV001-HU-eCD. Particularmente, puede facilitarse a modo de ejemplo preferiblemente mediante *Bifidobacterium longum* 105-A/pAV001-HUeCD-M968.

Un método de construcción del portador de suministro génico de la presente invención comprende la etapa de transformar un microorganismo anaerobio con el vector de expresión en el que se ha incorporado el ADN que codifica para la proteína de interés.

La construcción del microorganismo transformado puede realizarse según un método descrito en manuales experimentales disponibles comercialmente, por ejemplo, Gene Manual (Kodansha Ltd.), Method for Experiments in Gene Manipulation ed. por Yasutaka Takagi (Kodansha Ltd.), Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory (1982), Molecular Cloning, 2<sup>a</sup> ed., Cold Spring Harbor Laboratory (1989) o Methods in Enzymol., 194 (1991).

Puesto que la proteína es CD, se requiere para su aplicación a terapias de enzima-profármaco que el microorganismo modificado genéticamente que expresa CD tenga resistencia a 5-FU a una concentración al menos eficaz para una actividad antitumoral, que se convierte a partir de 5-FC mediante CD. Sin embargo, cuando se construyó una bacteria resistente a 5-FU mediante un método de cultivo en aclimatación descrito en el ejemplo 1 en el documento de patente 5 usando el microorganismo modificado genéticamente que expresa CD, la tasa de retención del plásmido tendía a disminuir. Sin embargo, en el método de construcción de un portador de suministro génico según la presente invención, una bacteria resistente a 5-FU que tenía resistencia a 5-FU a una concentración al menos eficaz para una actividad antitumoral se construye en primer lugar como un microorganismo anaerobio usado como huésped mediante un método de cultivo en aclimatación descrito en el ejemplo 2 en el documento de patente 5. Esta bacteria puede usarse como huésped para construir de ese modo un microorganismo modificado genéticamente que tiene una alta tasa de retención del plásmido.

Una composición farmacéutica de la presente invención no está limitada particularmente siempre que comprenda el portador de suministro génico de la presente invención.

La composición farmacéutica de la presente invención puede comprender una clase o dos o más clases del/de los portador(es) de suministro génico de la presente invención.

Además, la dosis del portador de suministro génico en la composición farmacéutica de la presente invención no está limitada particularmente siempre que sea una cantidad suficiente para su crecimiento en un sitio tumoral y la expresión de una cantidad suficiente para la expresión de una proteína en una cantidad que puede convertir un precursor de sustancia antitumoral en una cantidad terapéuticamente eficaz de una sustancia antitumoral. Desde un punto de vista económico y el punto de vista de sortear efectos secundarios tanto como sea posible, se prefiere que la dosis del portador de suministro génico sea tan pequeña como sea posible dentro de un intervalo que produce una actividad antitumoral necesaria. Además, la dosis del portador de suministro génico en la composición farmacéutica de la presente invención puede seleccionarse apropiadamente según la gravedad de la enfermedad y el peso corporal, la edad y el sexo de un paciente y también puede aumentarse o disminuirse apropiadamente según el grado de mejora.

Además, la composición farmacéutica de la presente invención puede contener componentes arbitrarios además del portador de suministro génico de la presente invención a menos que los efectos de la presente invención se alteren. Los ejemplos de tales componentes arbitrarios incluyen portadores, excipientes y diluyentes farmacológicamente aceptables.

Como portador de suministro génico de la presente invención puede usarse una bacteria anaerobia que incorpora en la misma un gen a partir del cual puede expresarse una proteína que tiene la actividad de convertir un precursor de sustancia antitumoral en una sustancia antitumoral, comprendiendo la composición farmacéutica de la presente invención el portador de suministro génico como principio activo, en combinación con un precursor de sustancia antitumoral en una cantidad que puede convertirse en una cantidad eficaz de una sustancia antitumoral mediante una proteína expresada por el portador de suministro génico. Este precursor de sustancia antitumoral puede estar contenido en la composición farmacéutica que comprende el portador de suministro génico de la presente invención como principio activo. Sin embargo, se prefiere que el precursor de sustancia antitumoral se use en forma de una composición farmacéutica que comprende el precursor de sustancia antitumoral, en combinación con la composición farmacéutica o el agente terapéutico para tumor sólido que comprende el portador de suministro génico de la presente invención como principio activo.

La dosis del precursor de sustancia antitumoral puede seleccionarse apropiadamente según la tasa de crecimiento del portador de suministro génico usado en combinación con el mismo en un tejido tumoral, y la eficacia de conversión del precursor de sustancia antitumoral en una sustancia antitumoral. Además, de manera similar con la dosis del portador de suministro génico, la dosis del precursor de sustancia antitumoral puede seleccionarse apropiadamente según la gravedad de la enfermedad y el peso corporal, la edad y el sexo de un paciente y también puede aumentarse o disminuirse apropiadamente según el grado de mejora.

Por tanto, cuando la composición farmacéutica de la presente invención se usa en combinación con el precursor de sustancia antitumoral, el método de administración de la composición farmacéutica de la presente invención puede ser el mismo que o diferente del método de administración de la composición farmacéutica que comprende el precursor de sustancia antitumoral. Además, pueden administrarse simultáneamente o a intervalos de tiempo. Se prefiere que la composición farmacéutica que comprende el precursor de sustancia antitumoral se administre tras la administración de la composición farmacéutica de la presente invención de manera que el portador de suministro génico de la presente invención pueda crecer suficientemente en una célula tumoral.

La frase "que comprende X en combinación con Y" en la presente invención abarca tanto el caso en el que X e Y están en diferentes formas como el caso en el que X e Y están en la misma forma (por ejemplo, una forma que comprende tanto X como Y). Además, cuando X e Y están en diferentes formas, tanto X como Y pueden contener además otros componentes.

La forma farmacéutica de la composición farmacéutica de la presente invención no está limitada particularmente. Los ejemplos de la misma pueden incluir una preparación líquida o sólida que comprende el portador de suministro génico de la presente invención. La preparación líquida puede producirse: purificando una disolución de cultivo de la bacteria anaerobia como portador de suministro génico de la presente invención; si es necesario, añadiendo a la misma una disolución salina o aditivos farmacéuticos o de reemplazo de fluidos apropiados; y llenando con la mezcla una ampolla o vial o similar. Además, la preparación sólida puede producirse añadiendo un agente protector apropiado a la preparación líquida, llenando con la mezcla una ampolla o vial o similar y entonces liofilizando o secando desde la fase líquida; o añadiendo un agente protector apropiado a la preparación líquida, liofilizando o secando desde la fase líquida la mezcla, y entonces llenando una ampolla o vial o similar. Un método de administración de la composición farmacéutica de la presente invención es preferiblemente administración parenteral. Por ejemplo, pueden realizarse inyección hipodérmica, inyección intravenosa, inyección local y administración intracerebroventricular. La inyección intravenosa es la más preferida.

La composición farmacéutica de la presente invención puede aplicarse a tumores que tienen un entorno anaerobio, preferiblemente, diversos tumores sólidos. Los ejemplos de los tumores sólidos incluyen cáncer de colon-recto, tumor cerebral, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer de hígado, cáncer de vesícula biliar, cáncer del conducto biliar, cáncer pancreático, cáncer de células de

islotos pancreáticos, coriocarcinoma, cáncer de colon, cáncer de células renales, cáncer de corteza suprarrenal, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de testículos, cáncer prostático, tumor testicular, cáncer de ovario, cáncer uterino, coriocarcinoma, cáncer de tiroides, tumor carcinoide maligno, cáncer de piel, melanoma maligno, osteosarcoma, sarcoma de tejidos blandos, neuroblastoma, tumor de Wilms, retinoblastoma, melanoma y carcinoma de células escamosas.

A continuación en el presente documento, la presente invención se describirá más específicamente con referencia a los ejemplos. Sin embargo, no se pretende que el alcance técnico de la presente invención se limite a estas ejemplificaciones.

### [Ejemplo de referencia 1]

Preparación de *Bifidobacterium longum* 105-A/pAV001-HU-eCD (1) Construcción del plásmido lanzadera pAV001

(Construcción del plásmido)

Se amplificó una secuencia que contiene espectinomicina adeniltransferasa (casete de AAD) derivado de *Enterococcus faecalis* mediante PCR a partir de un plásmido lanzadera pBLES100 de *Bifidobacterium longum* y *Escherichia coli* (véanse el documento de patente 4 y el documento no de patente 7), y se subclonó el producto de PCR en un vector PCR-BluntII-TOPO (Invitrogen Corp.) para preparar PCRTOPO-Scal-AAD-Eam1105I. Se añadieron los sitios de restricción Scal y Eam1105I a los cebadores directo e inverso, respectivamente.

Tal como se muestra en la figura 1, el vector de clonación pGFPuv (DEFINICIÓN: vector de clonación pGFPuv. REGISTRO: U62636; VERSIÓN: U62636.1 GI: 1490528) adquirido de Invitrogen Corp. está compuesto por un gen de GFPuv, sitios de clonación múltiples (MCS) en ambos extremos del mismo, un gen de resistencia a ampicilina y un origen de replicación de plásmido de *Escherichia coli*.

Se retiró el sitio de gen de resistencia a ampicilina en este pGFPuv mediante escisión con las enzimas de restricción Eam1105I y Scal para preparar un fragmento largo. De manera similar, se escindió PCRTOPO-Scal-AAD-Eam1105I con las enzimas de restricción Eam1105I y Scal para preparar un fragmento (aproximadamente 1100 pb) que contenía el casete de AAD. Se ligaron estos dos fragmentos usando ADN ligasa de T4 para preparar pGFPuv-SpR. Se confirmaron respectivamente en *Escherichia coli* la adición del rasgo de resistencia a espectinomicina y la pérdida del rasgo de resistencia a ampicilina en el plásmido preparado pGFPuv-SpR.

Se digirió pGFPuv-SpR con las enzimas de restricción Sall (ubicada en el sitio de clonación múltiple en el sentido de 5' del gen de GFPuv) y SpeI (ubicada en el sitio de clonación múltiple en el sentido de 3' del gen de GFPuv) para preparar un plásmido pAVN del que se había delecionado el gen de GFPuv.

A continuación, a partir de la información sobre la secuencia de nucleótidos de longitud completa de un plásmido pTB6 derivado de *Bifidobacterium longum*, se identificó una secuencia de aproximadamente 1900 pb que contenía RepB, SDO, DDO, repeticiones ricas en AT y motivos de unión a ADNA como una unidad de replicación de plásmido de *Bifidobacterium longum*. Se amplificó la secuencia de aproximadamente 1900 pb que contenía la unidad de replicación de plásmido de *Bifidobacterium longum* mediante PCR a partir de pTB6, y se subclonó el producto de PCR en un vector PCR-BluntII-TOPO para preparar PCRTOPO-Apal-1900-Scal. Se añadieron los sitios de restricción Apal y Scal a los cebadores directo e inverso, respectivamente.

Se ligaron el fragmento largo (aproximadamente 2400 pb) obtenido digiriendo pAVN con las enzimas de restricción Apal y Scal y un fragmento corto (aproximadamente 1900 pb) obtenido digiriendo PCRTOPO-Apal-1900-Scal con las enzimas de restricción Apal y Scal de la misma manera usando ADN ligasa de T4 para preparar un plásmido lanzadera pAV001 de *Bifidobacterium longum*-*Escherichia coli* (aproximadamente 4300 pb).

(2) Vector de expresión génica de CD pAV001-HU-eCD

(Construcción del vector de expresión)

A continuación, se escindió pBLES100-S-eCD con las enzimas de restricción HindIII y SpeI para extraer un fragmento de aproximadamente 2900 pb que contenía un promotor del gen HU, un gen de CD derivada de *Escherichia coli* y un terminador del gen HU. De manera similar, se escindió el plásmido lanzadera pAV001 con HindIII y SpeI en los sitios de restricción en los sitios de clonación múltiples. Se ligaron el fragmento largo obtenido y el fragmento de aproximadamente 2900 pb descritos anteriormente usando ADN ligasa de T4 para preparar pAV001-HU-eCD (aproximadamente 7100 pb).

(3) Introducción del vector de expresión génica de CD pAV001-HU-eCD en una bacteria del género *Bifidobacterium*

Se cultivó *Bifidobacterium longum* de tipo natural en medio MRS a 37°C en condiciones anaerobias, y se separaron las células bacterianas de la disolución de cultivo mediante centrifugación y se suspendieron en una disolución

tampón apropiada para preparar una suspensión bacteriana. A continuación, se introdujo el vector de expresión génica de CD pAV001-HU-eCD en la suspensión bacteriana usando un método de electroporación descrito en los documentos no de patente 2 y 3. Se seleccionó la *Bifidobacterium longum* recombinante con la introducción (*Bifidobacterium longum*/pAV001-HU-eCD) basándose en la formación de colonias sobre un medio de agar que contenía el antibiótico espectinomicina.

(4) Actividad enzimática citosina desaminasa en *Bifidobacterium longum*/pAV001-HU-eCD; medición de la actividad de conversión de 5-FC→5-FU

Se subcultivó *Bifidobacterium longum*/pAV001-HU-eCD en medio MRS que contenía el antibiótico espectinomicina a 37°C durante 2 días o más en condiciones anaerobias, y se separaron las células bacterianas ( $2 \times 10^9$  UFC) de la disolución de cultivo mediante centrifugación y se suspendieron de nuevo en 4,5 ml de medio MRS. A continuación, se añadieron al mismo 0,5 ml de 5-FC (20 mg/ml), dando como resultado una concentración final de 2 mg/ml, y se cultivaron las células bacterianas a 37°C en condiciones anaerobias. Tras 0, 4, 8, 18 y 24 horas, se recogieron respectivamente los sobrenadantes de las disoluciones de cultivo a partir de las cuales se habían retirado las células bacterianas mediante centrifugación. Se midieron las concentraciones de 5-FU convertido mediante análisis de cromatografía de gases (métodos de CG-EM de 5-FU, BML). En la figura 2 se muestran los resultados de la medición. Como resultado del análisis, en *Bifidobacterium longum*/pAV001-HU-eCD, se detectó 5-FU a una concentración de 72,5 µg/ml tras 4 horas y a una concentración de 165,4 µg/ml tras 24 horas.

**Ejemplo 1**

[Preparación del plásmido HU-eCD]

Se construyeron plásmidos de manera que la longitud de la región N-terminal de una proteína HU fusionada a la región N-terminal de eCD se cambió a 2 aminoácidos, 3 aminoácidos o 4 aminoácidos (figura 3).

Se construyeron de la misma manera plásmidos de los que se delecionó la secuencia que codifica para el extremo N-terminal de una proteína HU. En este caso, se prepararon dos clases de plásmidos, uno con un codón de iniciación de la traducción ATG de CD derivada de la cepa de *Escherichia coli* JM101, y el otro con un codón de iniciación de la traducción GTG de CD derivada de la cepa de *Escherichia coli* K12. Además, también se construyó un plásmido de manera que la longitud de la región N-terminal de una proteína HU fusionada a la región N-terminal de eCD se cambió a 18 aminoácidos. En la tabla 1 se muestran las secuencias de las partes construidas de los plásmidos.

[Tabla 1]

| Tabla de construcción de plásmidos        |  |
|---|--|
| Nombre del plásmido                       | Secuencia proximal al extremo N-terminal de CD                                       |
| pAV001-HU0aaATG                           | ATG TCG AAT AAC ...<br>M S N N   |
| pAV001-HU0aaGTG                           | GTG TCG AAT AAC ...<br>M S N N   |
| pAV001-HU2aa-eCD                          | ATG GCA TCG AAT AAC ...<br>M A S N N   |
| pAV001-HU3aa-eCD                          | ATG GCA TAC TCG AAT AAC ...<br>M A Y S N N   |
| pAV001-HU4aa-eCD                          | ATG GCA TAC AAC TCG AAT AAC ...<br>M A Y N S N N                                     |
| pAV001-HU-eCD (Control, pAV001-HU9aa-eCD) | ATG GCA TAC AAC AAG TCT GAC CTC GTT TCG<br>AAT AAC ...<br>M A Y N K S D L V S N<br>N |

|                   |   |
|-------------------|---|
| pAV001-HU18aa-eCD | ATG GCA TAC AAC AAG TCT GAC CTC GTT TCG |
|                   | AAG ATC GCC                             |
|                   | M A Y N K S D L V S K                   |
|                   | I A                                     |
|                   | CAG AAG TCC AAC CTG TCG AAT AAC . . .   |
| Q K S N L S N N   |   |

El término en **negrita** representa una secuencia añadida al extremo N-terminal de CD.

(1) Construcción del plásmido que añade los 2 aminoácidos N-terminales de la proteína HU

5 Se realizó amplificación por PCR usando 50 pg de pAV001-HU-eCD como molde y ADN polimerasa PrimeSTAR™ HS (Takara Bio Inc.) para obtener los fragmentos de PCR A (aproximadamente 1,3 kpb) y B (aproximadamente 1,3 kpb). Se usaron un cebador externo expuesto en SEQ ID NO: 1 y un cebador interno expuesto SEQ ID NO: 2 que tenían, en el extremo 5'-terminal, una secuencia solapante con el extremo terminal del fragmento de PCR B y  
10 contenían una secuencia complementaria a pAV001-HU-eCD en la amplificación del fragmento de PCR A.

El fragmento de PCR A contiene un sitio HindIII derivado del molde en el extremo terminal de ADN. Se usaron un  
15 cebador externo expuesto en SEQ ID NO: 3 que tenía un sitio de reconocimiento de KspAI en el lado 5'-terminal y contenía una secuencia complementaria a pAV001-HU-eCD y un cebador interno expuesto en SEQ ID NO: 4 que tenía una secuencia solapante con el extremo terminal del fragmento de PCR A en el lado 5'-terminal y contenía una secuencia complementaria a pAV001-HU-eCD en la amplificación del fragmento de PCR B.

Se realizó el cambio de la secuencia de aminoácidos derivada de la proteína HU mediante cebadores internos. Las  
20 condiciones de temperatura implicaron 30 ciclos que implicaban cada uno 98°C durante 10 segundos, 55°C durante 5 segundos y 72°C durante 80 segundos, seguido por incubación a 72°C durante 30 segundos. Se purificaron los fragmentos de PCR A y B usando el kit de purificación de PCR QIAquick (QIAGEN), y entonces se mezclaron los fragmentos de PCR purificados A y B a moles iguales.

Se realizó la reacción a 5 ciclos que implicaban cada uno 98°C durante 10 segundos y 72°C durante 90 segundos en  
25 ausencia de cebadores en una disolución de mezcla de tampón 1xPrimeSTAR™, mezcla de dNTP 200 µM y 2,5 u de ADN polimerasa PrimeSTAR™ HS usando 1 ng de la mezcla de los fragmentos de PCR purificados A y B como molde para ligar los fragmentos de PCR A y B. Entonces, se añadieron los cebadores externos (SEQ ID NO: 1 y 3) a lo mismo, dando como resultado cada concentración final de 0,5 µM, y se realizó la reacción a 25 ciclos que implicaban cada uno 98°C durante 10 segundos, 55°C durante 5 segundos y 72°C durante 160 segundos, seguido  
30 por incubación a 72°C durante 30 segundos para obtener un producto de PCR ligado (aproximadamente 2,6 kpb).

Se separó el producto de PCR ligado en un gel de agarosa SeaPlaque(R) GTG(R) al 1% (tampón 1xTAE, bromuro de etidio 0,5 µg/ml) para cortar un fragmento de ADN de 2,6 kpb. Se extrajo el producto de PCR ligado del gel usando el kit de extracción de gel QIAquick(R) y se digirió con HindIII (Fermentas UAB) y KspAI (Fermentas UAB).  
35 Se cortó una banda de ADN de 2,6 kpb mediante separación en un gel de agarosa SeaPlaque(R) GTG(R) al 1% (tampón 1xTAE, bromuro de etidio 0,5 µg/ml). Se extrajo el producto de PCR ligado del gel usando el kit de extracción de gel QIAquick(R).

Se digirió el vector pAV001-HU-eCD con HindIII (Fermentas UAB) y KspAI (Fermentas UAB). Entonces, se cortó un  
40 fragmento de ADN de 4,6 kpb mediante separación en un gel de agarosa SeaPlaque(R) GTG(R) al 1% (tampón 1xTAE, bromuro de etidio 0,5 µg/ml). Posteriormente, se extrajo el ADN de vector del gel usando el kit de extracción de gel QIAquick(R).

Se mezcló el producto de PCR ligado con el vector en una razón de vector con respecto a producto de PCR ligado  
45 de 1:3 en moles, y se realizó el ligamiento usando el kit de ligamiento de ADN rápido (Fermentas UAB). Se transformó *Escherichia coli* JM109 con el producto de ligamiento, y se sembraron en placa las cepas sobre medio de agar LB que contenía espectinomicina 30 µg/ml y se cultivó durante la noche a 37°C para obtener transformantes. Se cultivaron los transformantes durante la noche a 37°C en medio líquido 2 x LB que contenía espectinomicina 30 µg/ml, y se extrajo el ADN de plásmido (pAV001-HU2aa-eCD) usando el kit QIAprep(R) Spin Miniprep.  
50

(2) Construcción del plásmido que añade los 3 aminoácidos N-terminales de la proteína HU

Se construyó un plásmido que añade los 3 aminoácidos N-terminales de la proteína HU (pAV001-HU3aa-eCD) de la  
55 misma manera que en la construcción del plásmido que añade los 2 aminoácidos N-terminales de la proteína HU excepto porque se usaron los cebadores expuestos en SEQ ID NO: 5 y 4 como cebadores internos para la amplificación de los fragmentos de PCR A y B, respectivamente.

(3) Construcción del plásmido que añade los 4 aminoácidos N-terminales de la proteína HU

Se construyó un plásmido que añade los 4 aminoácidos N-terminales de la proteína HU (pAV001-HU4aa-eCD) de la misma manera que en la construcción del plásmido que añade los 2 aminoácidos N-terminales de la proteína HU excepto porque se usaron los cebadores expuestos en SEQ ID NO: 6 y 7 para la amplificación de los fragmentos de PCR A y B, respectivamente. La secuencia de pAV001-HU4aa-eCD se muestra en SEQ ID NO: 14.

(4) Construcción del plásmido que carece de la secuencia que codifica para el extremo N-terminal de la proteína HU y que tiene el codón de iniciación de la traducción ATG

Se construyó un plásmido que carece del extremo N-terminal de la proteína HU y que tiene el codón de iniciación de la traducción ATG (pAV001-HU0aaATG-eCD) de la misma manera que en la construcción del plásmido que añade los 2 aminoácidos N-terminales de la proteína HU excepto porque se usaron los cebadores expuestos en SEQ ID NO: 8 y 9 como cebadores internos para la amplificación de los fragmentos de PCR A y B, respectivamente.

(5) Construcción del plásmido que carece del extremo N-terminal de la proteína HU y que tiene el codón de iniciación de la traducción GTG

Se construyó un plásmido que carece del extremo N-terminal de la proteína HU y que tiene el codón de iniciación de la traducción GTG (pAV001-HU0aaGTG-eCD) de la misma manera que en la construcción del plásmido que añade los 2 aminoácidos N-terminales de la proteína HU excepto porque se usaron los cebadores expuestos en SEQ ID NO: 10 y 11 como cebadores internos para la amplificación de los fragmentos de PCR A y B, respectivamente.

(6) Construcción del plásmido que añade los 18 aminoácidos N-terminales de la proteína HU

Se mezclaron dos clases de oligo-ADN sintéticos fosforilados de manera 5'-terminal (SEQ ID NO: 12 y 13) que tenían secuencias complementarias entre sí a moles iguales y se aparearon disminuyendo las temperaturas en fases hasta 65°C durante 5 minutos, 45°C durante 5 minutos, 37°C durante 10 minutos y 25°C durante 10 minutos en presencia de NaCl 0,1 M para preparar un adaptador. El extremo terminal del adaptador es un sitio Bsp119I.

Se digirió el vector pAV001-HU-eCD con Bsp119I (Fermentas UAB). Tras el tratamiento de desfosforilación del extremo terminal del ADN usando CIAP (Fermentas UAB), se ligó el fragmento de ADN resultante con el adaptador usando el kit de ligamiento de ADN rápido (Fermentas UAB). Se transformaron cepas de *Escherichia coli* JM109 con el producto de ligamiento, y se sembraron en placa las cepas sobre medio agar LB que contenía espectinomicina 30 µg/ml y se cultivaron durante la noche a 37°C para obtener transformantes. Se cultivaron los transformantes durante la noche a 37°C en medio líquido 2 x LB que contenía espectinomicina 30 µg/ml, y se extrajo el ADN de plásmido (pAV001-HU18aa-eCD) usando el kit QIAprep(R) Spin Miniprep. La secuencia de pAV001-HU18aa-eCD se muestra en SEQ ID NO: 15.

(Transformación de *Bifidobacterium longum* 105A)

Se mezclaron 80 µl de células competentes *Bifidobacterium longum* 105A y 5 µl (de 500 a 1000 ng) del ADN de plásmido, y se realizó la transformación usando un sistema de electroporación Gene Pulser II (Bio-Rad Laboratories, Inc., Japón). Se sembraron en placa las cepas sobre medio de agar IWATA que contenía D-rafinosa al 15% y espectinomicina 30 µg/ml y entonces se cultivaron a 37°C durante dos noches en condiciones anaerobias para obtener transformantes.

(Extracción de proteínas de transformantes de *Bifidobacterium longum* 105A)

Se inocularon los transformantes en 5 ml de medio líquido MRS (que contenía espectinomicina 30 µg/ml y una disolución de mezcla de cisteína-vitamina C) y se cultivaron durante la noche a 37°C en condiciones anaerobias. Se inoculó un 1% de la disolución de cultivo en un medio que tenía la misma composición y se cultivó durante la noche a 37°C en condiciones anaerobias. Se repitió esta etapa dos veces. Se realizó la extracción de proteínas usando un 1% de la disolución de cultivo inoculada en un medio que tenía la misma composición y se cultivó durante aproximadamente 18 horas. Se añadieron 4 ml de una disolución de tampón Tris (Tris-HCl 0,5 M, Triton X-100 al 0,5%, pH 8,4) a de 1 a 4 ml de la disolución de cultivo y se mezclaron, seguido por centrifugación a 13.000 x g a temperatura ambiente durante 15 minutos para eliminar el sobrenadante. Se suspendieron las células bacterianas mediante la adición de 5 ml de una disolución de tampón Tris que tenía la misma composición, seguido por centrifugación a 13.000 x g a temperatura ambiente durante 15 minutos para eliminar el sobrenadante. Se repitió este procedimiento dos veces para lavar las células bacterianas. Se suspendieron las células bacterianas lavadas en 1 ml de una disolución de tampón Tris complementada con 50 µl de un inhibidor de proteasas (Sigma-Aldrich) y se rompieron de manera ultrasónica durante 5 minutos con enfriamiento con hielo. Tras la centrifugación a 13.000 x g a 4°C durante 20 minutos, se sometió el sobrenadante a medición de la actividad de CD como extracto de proteína total.

(Medición de la actividad de CD)

- Se midió la cantidad de la proteína total mediante una modificación del método de Lowry. Se añadió una disolución tampón al extracto de proteína total correspondiente a una cantidad de la proteína total de 50 µg para preparar 250 µl de una disolución, que entonces se mezcló con 250 µl de 5-FC 40 mM y entonces se hizo reaccionar a 60°C durante 20 minutos. Se terminó la reacción mediante la adición de 250 µl de ácido tricloroacético 0,5 M, y se dejó el producto de reacción sobre hielo. Tras la centrifugación a 20.000 x g a 4°C durante 20 minutos, se añadieron 150 µl de NaOH 0,3 M a 450 µl del sobrenadante para neutralizar la disolución.
- Se diluyó la muestra neutralizada 10 veces con una fase móvil de HPLC, y se midieron las cantidades de 5-FU y 5-FC mediante HPLC. Se usó el % de consumo de 5-FC como actividad de CD. En la tabla 2 se muestran los resultados de la medición de la actividad.

[Tabla 2]

| Efecto de la adición de aminoácidos derivados del extremo N-terminal de la proteína HU a CD |  |
|---|--|
| Nombre del transformante  | Actividad de CD, consumo de 5-FC (%)/50 µg de proteína total |
| <i>B. longum</i> 105A/pAV001-HU0aaATG   | 1,89   |
| <i>B. longum</i> 105A/pAV001-HU0aaGTG   | 1,08   |
| <i>B. longum</i> 105A/pAV001-HU2aa-eCD  | 0,64   |
| <i>B. longum</i> 105A/pAV001-HU3aa-eCD  | 2,80   |
| <i>B. longum</i> 105A/pAV001-HU4aa-eCD  | 6,35   |
| <i>B. longum</i> 105A/pAV001-HU-eCD (control)   | 5,50   |
| <i>B. longum</i> 105A/pAV001-HU18aa-eCD   | 6,48   |

- Se demostró que la adición de aminoácidos derivados del extremo N-terminal de la proteína HU a eCD potencia la actividad de CD. Con respecto al número de aminoácidos añadidos, 2 o menos aminoácidos eran ineficaces; 3 aminoácidos produjeron algo de efecto; y 4 o más aminoácidos produjeron efectos drásticamente aumentados. No se observó ninguna diferencia en la actividad entre 4 y 18 aminoácidos.

## Ejemplo 2

[Preparación de *Bifidobacterium longum* 105-A/mutante de plásmido pAV001-HU-eCD]

- Se introdujo una mutación en 5 sitios en el plásmido pAV001-HU-eCD.

- Se introdujeron 2 tipos de mutaciones: una delección de 3 nucleótidos y una sustitución de 1 nucleótido. Los plásmidos mutantes de tipo delección eran pAV001-HU-eCD-D37 y pAV001-HU-eCD-D55, y los plásmidos mutantes de tipo sustitución de nucleótido eran pAV001-HU-eCD-M450, pAV001-HU-eCD-M968 y pAV001-HU-eCD-M1277. Se muestran a continuación métodos de construcción de los plásmidos mutantes.

(1) Construcción de plásmido mutante (pAV001-HU-eCD-D37)

- Se realizó la amplificación por PCR usando 50 pg de pAV001-HU-eCD como molde y ADN polimerasa PrimeSTAR™ HS (Takara Bio Inc.) para obtener los fragmentos de PCR A (aproximadamente 1,3 kpb) y B (aproximadamente 1,3 kpb). Se usaron un cebador externo expuesto en SEQ ID NO: 1 y un cebador interno expuesto en SEQ ID NO: 16 que tenían una secuencia solapante con el extremo terminal del fragmento de PCR B en el lado 5'-terminal y contenían una secuencia complementaria a pAV001-HU-eCD en la amplificación del fragmento de PCR A. El fragmento de PCR A contiene, en el extremo terminal de ADN, un sitio HindIII derivado del molde. Se usaron un cebador externo expuesto en SEQ ID NO: 3 que tenía un sitio de reconocimiento KspAI en el lado 5'-terminal y contenía una secuencia complementaria a pAV001-HU-eCD y un cebador interno expuesto en SEQ ID NO: 17 que tenía, en el lado 5'-terminal, una secuencia solapante con el extremo terminal del fragmento de PCR A y contenía una secuencia complementaria a pAV001-HU-eCD en la amplificación del fragmento de PCR B. Se introdujo la mutación en el plásmido mediante cebadores internos. Las condiciones de temperatura implicaban 30 ciclos que implicaban cada uno 98°C durante 10 segundos, 55°C durante 5 segundos y 72°C durante 80 segundos, seguido por incubación a 72°C durante 30 segundos. Se purificaron los fragmentos de PCR A y B usando el kit de purificación de PCR QIAquick (QIAGEN), y entonces se mezclaron los fragmentos de PCR purificados A y B a moles iguales. Se realizó una reacción a 5 ciclos que implicaban cada uno 98°C durante 10 segundos y 72°C durante 90 segundos en ausencia de cebadores en una disolución de mezcla de tampón 1xPrimeSTAR™, mezcla de dNTP 200 µM y 2,5 u de ADN polimerasa PrimeSTAR™ HS usando 1 ng de la mezcla de los fragmentos de PCR purificados A y B como



molde para ligar los fragmentos de PCR A y B. Entonces, se añadieron a lo mismo los cebadores externos (SEQ ID NO: 1 y 3), dando como resultado cada concentración final de 0,5  $\mu$ M, y se realizó una reacción a 25 ciclos que implicaban cada uno 98°C durante 10 segundos, 55°C durante 5 segundos y 72°C durante 160 segundos, seguido por incubación a 72°C durante 30 segundos para obtener un producto de PCR ligado (aproximadamente 2,6 kpb).  
 5 Se separó el producto de PCR ligado en un gel de agarosa SeaPlaque(R) GTG(R) al 1% (tampón 1xTAE, bromuro de etidio 0,5  $\mu$ g/ml) para cortar una banda de ADN de 2,6 kpb. Se extrajo el producto de PCR ligado del gel usando el kit de extracción de gel QIAquick(R) y se digirió con HindIII (Fermentas UAB) y KspAI (Fermentas UAB). Se cortó una banda de ADN de 2,6 kpb mediante separación en un gel de agarosa SeaPlaque(R) GTG(R) al 1% (tampón 1xTAE, bromuro de etidio 0,5  $\mu$ g/ml). Se extrajo el producto de PCR ligado del gel usando el kit de extracción de gel  
 10 QIAquick(R).

Se digirió el vector pAV001-HU-eCD con HindIII (Fermentas UAB) y KspAI (Fermentas UAB). Entonces, se cortó un fragmento de ADN de 4,6 kpb mediante separación en un gel de agarosa SeaPlaque(R) GTG(R) al 1% (tampón 1xTAE, bromuro de etidio 0,5  $\mu$ g/ml). Se extrajo el ADN de vector del gel usando el kit de extracción de gel QIAquick(R). Se mezcló el producto de PCR ligado con el vector a una razón de vector con respecto a producto de PCR ligado de 1:3 en moles, y se realizó el ligamiento usando el kit de ligamiento de ADN rápido (Fermentas UAB). Se transformó *Escherichia coli* JM109 con el producto de ligamiento, y se sembraron en placa las cepas sobre medio agar LB que contenía espectinomicina 30  $\mu$ g/ml y entonces se cultivaron durante la noche a 37°C para obtener transformantes. Se cultivaron los transformantes durante la noche a 37°C en medio líquido 2 x LB que contenía espectinomicina 30  $\mu$ g/ml y se extrajo el ADN de plásmido (pAV001-HU-eCD-D37) usando el kit QIAprep(R) Spin Miniprep.  
 15  
 20

El pAV001-HU-eCD-D37 es un plásmido que tiene un gen de CD que carece de la secuencia de nucleótidos (secuencia de nucleótidos que codifica para alanina en la 5ª posición en SEQ ID NO: 28) desde el 1503<sup>er</sup> hasta el 1505<sup>o</sup> nucleótido en SEQ ID NO: 14 (del 1545<sup>o</sup> al 1547<sup>o</sup> nucleótido en SEQ ID NO: 15).  
 25

#### (2) Construcción de plásmido mutante (pAV001-HU-eCD-D55)

Se construyó pAV001-HU-eCD-D55 de la misma manera que en la construcción del plásmido pAV001-HUeCD-D37 excepto porque se usaron los cebadores expuestos en SEQ ID NO: 18 y 19 como cebadores internos para la amplificación de los fragmentos de PCR A y B, respectivamente.  
 30

El pAV001-HU-eCD-D55 es un plásmido que tiene un gen de CD que carece de la secuencia de nucleótidos (secuencia de nucleótidos que codifica para asparagina en la 11ª posición en SEQ ID NO: 28) desde el 1521<sup>er</sup> hasta el 1523<sup>er</sup> nucleótido en SEQ ID NO: 14 (del 1563<sup>er</sup> al 1565<sup>o</sup> nucleótido en SEQ ID NO: 15).  
 35

#### (3) Construcción de plásmido mutante (pAV001-HU-eCD-M450)

Se construyó pAV001-HU-eCD-M450 de la misma manera que en la construcción del plásmido pAV001-HUeCD-D37 excepto porque se usaron los cebadores expuestos en SEQ ID NO: 20 y 21 como cebadores internos para la amplificación de los fragmentos de PCR A y B, respectivamente, y excepto por las condiciones de la reacción PCR.  
 40

Con respecto a las condiciones de la reacción PCR, las condiciones de temperatura de reacción para la amplificación del fragmento de PCR A implicaron 30 ciclos que implicaban cada uno 98°C durante 10 segundos, 55°C durante 5 segundos y 72°C durante 105 segundos, seguido por incubación a 72°C durante 30 segundos, y las condiciones de temperatura de reacción para la amplificación del fragmento de PCR B implicaron 30 ciclos que implicaban cada uno 98°C durante 10 segundos, 55°C durante 5 segundos y 72°C durante 1 minuto, seguido por incubación a 72°C durante 30 segundos. Además, para el ligamiento de los productos de PCR, se realizó una reacción a 5 ciclos que implicaban cada uno temperaturas de reacción de 98°C durante 10 segundos y 72°C durante 105 segundos.  
 45  
 50

El pAV001-HU-eCD-M450 es un plásmido que tiene un gen de CD en el que se ha sustituido la secuencia de nucleótidos (secuencia de nucleótidos que codifica para glutamina en la 142ª posición en SEQ ID NO: 28) desde el 1914<sup>o</sup> hasta el 1916<sup>o</sup> nucleótido en SEQ ID NO: 14 (del 1956<sup>o</sup> al 1958<sup>o</sup> nucleótido en SEQ ID NO: 15) por una secuencia de nucleótidos que codifica para histidina.  
 55

#### (4) Construcción de plásmido mutante (pAV001-HU-eCD-M968)

Se construyó pAV001-HU-eCD-M968 de la misma manera que en la construcción del plásmido pAV001-HUeCD-D37 excepto porque se usaron los cebadores expuestos en SEQ ID NO: 22 y 23 como cebadores internos para la amplificación de los fragmentos de PCR A y B, respectivamente, y se usó el cebador expuesto en SEQ ID NO: 24 como cebador externo para la amplificación del fragmento de PCR B, y excepto por las condiciones de la reacción PCR.  
 60

Con respecto a las condiciones de la reacción PCR, las condiciones de temperatura de reacción para la  
 65

amplificación del fragmento de PCR A implicaron 30 ciclos que implicaban cada uno 98°C durante 10 segundos, 55°C durante 5 segundos y 72°C durante 130 segundos, seguido por incubación a 72°C durante 30 segundos, y las condiciones de temperatura de reacción para la amplificación del fragmento de PCR B implicaron 30 ciclos que implicaban cada uno 98°C durante 10 segundos, 55°C durante 5 segundos y 72°C durante 45 segundos, seguido por incubación a 72°C durante 30 segundos. Además, para el ligamiento de los productos de PCR, se realizó una reacción a 5 ciclos que implicaban cada uno temperaturas de reacción de 98°C durante 10 segundos y 72°C durante 130 segundos. Para la amplificación del producto de PCR ligado, se realizó una reacción a 25 ciclos que implicaba cada uno 98°C durante 10 segundos, 55°C durante 5 segundos y 72°C durante 3 minutos usando los cebadores expuestos en SEQ ID NO: 1 y 24, seguido por incubación a 72°C durante 30 segundos para obtener un producto de PCR ligado (aproximadamente 2,9 kpb). Se digirió el vector pAV001-HU-eCD con HindIII (Takara Bio Inc.) y Spel (Takara Bio Inc.), y se usó un fragmento (aproximadamente 4,3 kpb) cortado de un gel de agarosa como vector para el producto de PCR ligado. Se muestra la secuencia del pAV001-HU-eCD-M968 obtenido en SEQ ID NO: 27.

El pAV001-HU-eCD-M968 es un plásmido que tiene un gen de CD en el que se ha sustituido la secuencia de nucleótidos (secuencia de nucleótidos que codifica para ácido aspártico en la 315ª posición en SEQ ID NO: 28) desde el 2433<sup>er</sup> hasta el 2435<sup>o</sup> nucleótido en SEQ ID NO: 14 (del 2475<sup>o</sup> al 2477<sup>o</sup> nucleótido en SEQ ID NO: 15) por una secuencia de nucleótidos que codifica para alanina.

(5) Construcción de plásmido mutante (pAV001-HU-eCD-M1277)

Se construyó pAV001-HU-eCD-M1277 de la misma manera que en la construcción del plásmido pAV001-HU-eCD-M968 excepto porque se usaron los cebadores expuestos en SEQ ID NO: 25 y 26 como cebadores internos para la amplificación de los fragmentos de PCR A y B, respectivamente, y excepto por las condiciones de la reacción PCR.

Con respecto a las condiciones de la reacción PCR, las condiciones de temperatura de reacción para la amplificación del fragmento de PCR A implicaron 30 ciclos que implicaban cada uno 98°C durante 10 segundos, 55°C durante 5 segundos y 72°C durante 150 segundos, seguido por incubación a 72°C durante 30 segundos, y las condiciones de temperatura de reacción para la amplificación del fragmento de PCR B implicaron 30 ciclos que implicaban cada uno 98°C durante 10 segundos, 55°C durante 5 segundos y 72°C durante 30 segundos, seguido por incubación a 72°C durante 30 segundos. Además, para el ligamiento de los productos de PCR, se realizó una reacción a 5 ciclos que implicaban cada uno temperaturas de reacción de 98°C durante 10 segundos y 72°C durante 150 segundos.

El pAV001-HU-eCD-M1277 es un plásmido que tiene un gen de CD en el que se ha sustituido la secuencia de nucleótidos (secuencia de nucleótidos que codifica para ácido glutámico en la 418ª posición en SEQ ID NO: 28) desde el 2742<sup>o</sup> hasta el 2744<sup>o</sup> nucleótido en SEQ ID NO: 14 (del 2784<sup>o</sup> al 2786<sup>o</sup> nucleótido en SEQ ID NO: 15) por una secuencia de nucleótidos que codifica para glicina.

(Transformación de *Bifidobacterium longum* 105A)

Se transformó *Bifidobacterium longum* 105A con el plásmido mutante obtenido de la misma manera que en el ejemplo 1 para obtener sus transformantes.

(Extracción de proteínas de transformantes de *Bifidobacterium longum* 105A)

Se obtuvo un extracto de proteína de la *Bifidobacterium longum* 105A transformada con el plásmido mutante, de la misma manera que en el ejemplo 1, y se sometió el extracto de proteína a medición de la actividad de CD.

(Medición de la actividad de CD)

Se midió la actividad de CD de la misma manera que en el ejemplo 1 usando el extracto de proteína obtenido. En la tabla 3 se muestran los resultados de la medición de la actividad.

[Tabla 3]

| Cambio en la actividad de CD provocado por la introducción de la mutación en pAV001-HU-eCD |  |
|--|--|
| Nombre del transformante   | Actividad de CD, consumo de 5-FC (%)/50 µg de proteína total |
| <i>B. longum</i> 105A/pAV001-HU-eCD-M450   | 4,13   |
| <i>B. longum</i> 105A/pAV001-HU-eCD-M968   | 65,8   |
| <i>B. longum</i> 105A/pAV001-HU-eCD-M1277  | 5,30   |
| <i>B. longum</i> 105A/pAV001-HU-eCD (Control)  | 5,50   |

*Bifidobacterium longum* 105A/pAV001-HU-eCD-M968 obtenida mediante transformación con el mutante pAV001-HU-eCD-M968 tiene una actividad de CD mejorada en aproximadamente 12 veces con respecto a la de *Bifidobacterium longum* 105A/pAV001-HU-eCD (control) obtenida mediante transformación con pAV001-HU-eCD no mutado.

Por otro lado, no se confirmó que *Bifidobacterium longum* 105A/pAV001-HU-eCD-M450 y *Bifidobacterium longum* 105A/pAV001-HU-eCD-M1277 obtenidas mediante transformación con los mutantes pAV001-HU-eCD-M450 y pAV001-HU-eCD-M1277, respectivamente, tuviesen una elevación en la actividad debido a la introducción de la mutación.

### Ejemplo 3

[Preparación de *Bifidobacterium longum* 105-A resistente a 5-FU/mutante de plásmido pAV001-HU-eCD]

(Adición de resistencia a 5-FU a *Bifidobacterium longum* 105A/pAV001-HU-eCD-M968)

La *Bifidobacterium longum* 105A/pAV001-HU-eCD-M968 obtenida en el ejemplo 2 se convirtió en un mutante resistente a 5-FU según el método descrito en el ejemplo 1 en el documento de patente 5.

Específicamente, se subcultivó la *Bifidobacterium longum* 105A/pAV001-HU-eCD-M968 obtenida en el ejemplo 2 en medio MRS a 37°C durante 2 días o más en condiciones anaerobias. Se diluyó la disolución de cultivo con un diluyente anaerobio y entonces se sembró en placa sobre medio de agar BL que contenía 5-FU 500 µg/ml, y se cultivaron las bacterias de manera anaerobia a 37°C durante 2 ó 3 días. Entonces, se seleccionaron las bacterias que crecieron para preparar *Bifidobacterium longum* 105A resistente a 5-FU/pAV001-HU-eCD-M968.

(*Bifidobacterium longum* 105A-R1/pAV001-HU-eCD-M968).

(Transformación de *Bifidobacterium longum* 105A resistente a 5-FU con el plásmido pAV001-HU-eCD-M968)

Se transformó *Bifidobacterium longum* 105A resistente a 5-FU preparada según el método descrito en el ejemplo 2 en el documento de patente 5 con el plásmido mutante pAV001-HU-eCD-M968 obtenido en el ejemplo 2, de la misma manera que en el ejemplo 1, y se obtuvieron transformantes de la misma.

Específicamente, se inoculó *Bifidobacterium longum* 105A en 5 ml de medio MRS que contenía 5-FU 100 µg/ml y se cultivó de manera anaerobia a 37°C durante de 1 a 5 días. Se midió la turbidez (DO=600 nm) del mismo para examinar la presencia o ausencia del crecimiento. Se recuperó 1 ml del medio tras el cultivo en el que se había confirmado el crecimiento y se inoculó en 9 ml de medio MRS que contenía la misma concentración de 5-FU, y se cultivaron las bacterias durante 24 horas en las mismas condiciones de cultivo. Se repitió este procedimiento de inoculación tres veces para preparar de ese modo *Bifidobacterium longum* 105A resistente a 5-FU. A continuación, se inoculó esta *Bifidobacterium longum* 105A resistente a 5-FU en medio MRS. Se inoculó la disolución bacteriana tras el cultivo en medio MRS que contenía 5-FU 250 µg/ml. Tras 24 horas, se determinó la presencia o ausencia del crecimiento usando la turbidez (DO=600 nm). Se usó la *Bifidobacterium longum* 105A resistente a 5-FU preparada usando un medio que contenía 5-FU 100 µg/ml (*Bifidobacterium longum* 105A-R2) como huésped para la transformación. Se transformó esta *Bifidobacterium longum* 105A-R2 con el plásmido mutante pAV001-HU-eCD-M968 obtenido en el ejemplo 2, de la misma manera que en el ejemplo 1, y se preparó su transformante *Bifidobacterium longum* 105A-R2/pAV001-HU-eCD-M968.

### Ejemplo 4

(Extracción de proteínas de *Bifidobacterium longum* 105A-R2/pAV001-HU-eCD-M968)

Se obtuvo un extracto de proteína de la *Bifidobacterium longum* 105A-R2/pAV001-HU-eCD-M968 así obtenida, de la misma manera que en el ejemplo 1, y se sometió el extracto de proteína a medición de la actividad de CD.

(Medición de la actividad de CD)

Como resultado de la medición de la actividad de CD de la misma manera que en el ejemplo 1 usando el extracto de proteína obtenido, la *Bifidobacterium longum* 105A-R2/pAV001-HU-eCD-M968 también presentaba una actividad de CD equivalente a la de la *Bifidobacterium longum* 105A transformada del ejemplo 2, como se muestra en la tabla 4.

[Tabla 4]

| Nombre del transformante | Actividad de CD, consumo de 5-FC (%)/50 µg de proteína total |
|--------------------------|--|
|--------------------------|--|

|   |      |
|---|------|
| <i>Bifidobacterium longum</i> 105A/ pAV001-HU-eCD-M968    | 65,8 |
| <i>Bifidobacterium longum</i> 105A-R2/ pAV001-HU-eCD-M968 | 62,4 |

### Ejemplo 5

(Medición de la estabilidad de retención del plásmido)

5 Con respecto a la *Bifidobacterium longum* 105A-R2/pAV001-HU-eCD-M968 (cepa R2) y la *Bifidobacterium longum* 105A-R1/pAV001-HU-eCD-M968 (cepa R1) obtenidas en el ejemplo 3, se midió la estabilidad de retención del plásmido mediante el método descrito a continuación. Como resultado, la cepa R2 presentaba una estabilidad de retención del plásmido mucho más favorable que la de la cepa R1, tal como se muestra en la figura 4.

10 (Prueba de medición de la estabilidad de retención del plásmido)

15 Se realizó la medición de la estabilidad de retención del plásmido mediante el siguiente método de prueba: se cultivaron por separado las cepas R2 y R1 en un medio líquido complementado con un antibiótico (espectinomicina) como marcador selectivo para los plásmidos introducidos, para activar suficientemente las cepas R2 y R1 de *Bifidobacterium longum* transformadas. Se designó esta disolución bacteriana como disolución bacteriana de día de subcultivo 0. A continuación, se recuperó una alícuota de la disolución bacteriana de día 0 y se inoculó en un medio líquido libre de espectinomicina, seguido por cultivo. Se designó esta disolución bacteriana como disolución bacteriana de día de subcultivo 1. De manera similar, se recuperó una alícuota de la disolución bacteriana de día 1 y se inoculó en un medio líquido libre de espectinomicina, seguido por cultivo para preparar una disolución bacteriana de día de subcultivo 2. Se realizó de manera continua el subcultivo del mismo modo hasta el día 5 para preparar disoluciones bacterianas hasta de día 3 a día 5. Se sembraron en placa por separado las disoluciones bacterianas de día 0, día 1, día 3 y día 5 sobre un medio de placa libre de antibióticos (medio de agar BL) para formar colonias. Se seleccionaron aleatoriamente 100 colonias que crecieron para cada cultivo y se inocularon en medios de agar BL tanto que contenía espectinomicina como libre de espectinomicina mediante un método de réplica usando un palillo esterilizado o similar. Se midieron las tasas de retención del plásmido en el día 0, día 1, día 3 y día 5 a partir de la fórmula numérica descrita a continuación. Se muestran los resultados en la figura 4.

25 Se calcularon las tasas de retención del plásmido a partir de la siguiente fórmula:

$$30 \text{ Tasa de retención del plásmido (\%)} = \frac{\text{El número de colonias en medio de agar BL que contiene espectinomicina}}{\text{El número de colonias en medio de agar BL}} \times 100$$

### Aplicabilidad industrial

35 Según la presente invención, puede construirse eficazmente un portador de suministro génico que consiste en un microorganismo anaerobio que puede crecer en un tejido tumoral en un entorno anaerobio y que puede expresar una proteína que tiene una actividad antitumoral o una proteína que tiene la actividad de convertir un precursor de sustancia antitumoral en una sustancia antitumoral, que es útil como agente terapéutico para tumor sólido y tiene la actividad y eficacia de expresión favorables de una proteína expresada por un gen introducido mediante transformación.

### Lista de secuencias

45 <110> Anaeropharma Science Inc.  
 <120> Método de construcción de un soporte de transporte génico  
 <130> P035501EPA  
 50 <150> Documento JP 2006-144720  
 <151> 24-05-2006  
 <160> 43  
 55 <170> PatentIn versión 3.1  
 <210> 1  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 60 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> cebador  
 5 <400> 1  
 tcacacagga aacagctatg acc 23  
 <210> 2  
 <211> 55  
 10 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> cebador  
 15 <400> 2  
 ggcgtaata attgttgta aagcgttatt cgatgccata aagcatcctt ctgg 55  
 <210> 3  
 <211> 29  
 20 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 25 <223> cebador  
 <400> 3  
 gaacacatcc tggaaggcgt taactcaac 29  
 30 <210> 4  
 <211> 43  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 35 <220>  
 <223> cebador  
 <400> 4  
 40 tcgaataacg ctttacaac aattattaac gcccggttac cag 43  
 <210> 5  
 <211> 58  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 45 <220>  
 <223> cebador  
 <400> 5  
 50 ggcgtaata attgttgta aagcgttatt cgagtatgcc ataaagcatc ctcttgg 58  
 <210> 6  
 <211> 54  
 <212> ADN  
 55 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> cebador  
 60 <400> 6  
 ggcgtaata attgttgta aagcgttatt cgagtgtat gccataaagc atcc 54  
 <210> 7  
 <211> 47  
 65 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> cebador

5 <400> 7  
 caactcgaat aacgctttac aaacaattat taacgcccgg ttaccag 47

<210> 8  
 <211> 58  
 10 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> cebador

15 <400> 8  
 gggcgtaat aattgttgt aaagcgttat tcgacataaa gcatccttct tgggtcag 58

<210> 9  
 <211> 51  
 20 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 25 <223> cebador

<400> 9  
 gctttatgct gaataacgct ttacaacaa ttattaacgc ccggttacca g 51

30 <210> 10  
 <211> 58  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

35 <220>  
 <223> cebador

<400> 10  
 40 gggcgtaat aattgttgt aaagcgttat tcgacacaaa gcatccttct tgggtcag 58

<210> 11  
 <211> 51  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

45 <220>  
 <223> cebador

<400> 11  
 50 gctttgtgct gaataacgct ttacaacaa ttattaacgc ccggttacca g 51

<210> 12  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 55 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> oligonucleótido

60 <400> 12  
 cgaagatcgc ccagaagtcc aacctgt 27

<210> 13  
 <211> 27  
 65 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

ES 2 525 174 T3

<220>

<223> oligonucleótido

5 <400> 13  
cgacagggtg gacttctggg cgatctt 27

<210> 14

<211> 7148

10 <212> ADN

<213> *Bifidobacterium longum*

<400> 14

agcgccaat acgcaaaccg cctctccccg cgcgttggcc gattcattaa tgcagctggc 60

acgacagggt tcccgactgg aaagcgggca gtgagcgcaa cgcaattaat gtgagttagc 120

tcactcatta ggcaccccag gctttacact ttatgcttcc ggctcgtatg ttgtgtggaa 180

ttgtgagcgg ataacaattt cacacaggaa acagctatga ccatgattac gccaaagcttg 240

gggagacacg acgttgacca cgttggcccc gttcattcag aaagtgcggg tcccctcccc 300

cacacgcgca ttgggcacgt gggacaagca gctgctcaag gaactgcgag accacatcaa 360

caccataatc gatgaggaga cgcgcaatc cgccgagccg gtgacgctgg cccgcttctc 420

ttggcgttcg atgatcacca tgctgctggt catcgtggcc gtggtcgtgg tcttcaccca 480

actgaagccc gaggagatca tcaccgcgct gaccaacgcc aaccogttga tggcggtggt 540

15

ES 2 525 174 T3

gacgctcgcg ttcggtgtct gcggtggat eggetcgteg atttgcctcg gttccctgat 600  
ggcgcggcac aagcgtgaca atatgggctg ctccatgagc cagggtggcag gcggttcgc 660  
caccgtatcc atgccagccg gcggtggccc ctcgttcgtc aacctgcagt tcctgcgcaa 720  
atccggctat cgcaacacc aggcgaccgc aattatgagc gccgctcg tggtgtatta 780  
cgccgtgtac ttctccatgc tggatcatcat cggcctgttc accggccgca acatgttctc 840  
cggcgcaatc ccgacaaaca cgttggttat cgtgctgggc gttgtggtcg tggtgctgtc 900  
cattgcatg atgattccgc cgttgcgcca ctgggtgacc cgtcgtctta tgccgctggc 960  
caagacgtat atcaaccagc tgctggacgt gctttcccag ccccgacagc tcacagttag 1020  
ctgcctaggc gcgctgttcc agaacgcgac cactgggctc gctttctggg cggccctgca 1080  
agcgttcggc tattcatcga atccgattga aacgacgttc gtcttcctgc tggcctatgc 1140  
attgggttcc gcagtgccea ctccaggcgg tctgggctgt gtggaagcgg cgctgacatt 1200  
cgcgttcgtg gcggtcggag tgccgcaggg cgtggcgtt tccgccactt tgetgcaccg 1260  
cgtggtgttc tactggctgc gcattccgct gggcgccggc gccatgaagt ggcttgacaa 1320  
gcataatctt gtctgattcg tctatcttca taccctctc ggggaaatag atgtgaaaac 1380  
cctataaaa cgcgggtttt cgcagaaaca tgctctagta tcattgatga caacatggac 1440  
taagcaaaa tgctgtccc ctgacccaag aaggatgctt tatggcatac aactcgaata 1500  
acgctttaca aacaattatt aaccccgtt taccaggcga agaggggctg tggcagattc 1560  
atctgcagga cggaaaaatc agcgcctatg atgcgcaatc cggcgtgatg ccataactg 1620  
aaaacagcct ggatgccgaa caaggttag ttataccgcc gtttgtggag ccacatattc 1680  
acctggacac cagcacaacc gccggacaac cgaactggaa tcagtccggc acgctgtttg 1740  
aaggcattga acgctgggccc gagcgcgaaag cgttattaac ccatgacgat gtgaaacaac 1800  
gcatggtgca aacgctgaaa tggcagattg ccaacggcat tcagcatgtg cgtaccatg 1860  
tcgatgttcc ggatgcaacg ctaactgcgc tgaagcaat gctggaagtg aagcaggaag 1920  
tcgctccgtg gattgatctg caaatcgtcg ccttccctca ggaagggatt ttgtcgtatc 1980  
ccaacggtga agcgttgcgt gaagaggcgt tacgcttagg ggcagatgta gtgggggcga 2040  
ttccgcattt tgaatttacc cgtgaatacg gcgtggagtc gctgcataaa accttcgccc 2100  
tggcgcaaaa atacgaccgt ctcatcgagc ttcactgtga tgagatcgat gacgagcagt 2160  
cgcgctttgt cgaaaccgtt gctgccctgg cgcacatga aggcattggc gcgagatca 2220  
ccgccagcca caccacggca atgcactcct ataacggggc gtatacctca cgcctgttcc 2280  
gcttgetgaa aatgtccggt attaaccttg tcgccaaccc gctgggtcaat attcatctgc 2340  
aaggacgttt cgatacgtat ccaaacgtc gcggcatcac gcgctttaa gagatgctgg 2400  
agtccggcat taacgtctgc tttggtcacg atgatgtctt cgatccgtgg tatccgctgg 2460  
gaacggcgaa tatgctgcaa gtgctgcata tgggctgca tgtttgccag ttgatgggct 2520



ES 2 525 174 T3

acgggcagat taacgatggc ctgaatttaa tcacccacca cagcgcaagg acgttgaatt 2580  
 tgcaggatta cggcattgcc gccggaaca gcgccaacct gattatcctg ccggtgaaa 2640  
 atgggtttga tgcgctgccc cgtcaggttc cggtagtga ttccggtacgt gccggcaagg 2700  
 tgattgccag cacacaaccg gcacaaacca ccgtatatct ggagcagcca gaagccatcg 2760  
 attacaaacg ttgagttaac gccttccagg atgtgttcgt cgaggctatg aagtccggcg 2820  
 aaggcctgaa gctcacggc ctgttctccg ctgagcgcgt caagcgcccg gctcgcaccg 2880  
 gccgcaacc gccgactggc gagcagattg acattccggc ttctacggc gttcgtatct 2940  
 ccgctggctc cctgctgaag aaggccgtca ccgagtgacc ttctgctcgt agcgattact 3000  
 tcgagcatta ctgacgacaa agaccccgac cgagatggtc ggggtctttt tgttggtgtg 3060  
 ctgtgacgtg ttgtccaacc gtattattcc ggactagtgc gccgtacggg cccgataggc 3120  
 agggccagct caaggcccgc gagaacgacc tcgtggcgcg gcgcagggaa cgcgaacgca 3180  
 agggccgac caagcgcctg atcgaggtgc gcgcatggc cgagtcggcc gcgggcttcg 3240  
 agggaggcga cgagagggcc aaggagcaca tcgcccgcct cgtgcagetc ggtccctgg 3300  
 tggagtccct gtgctccacc gacgtgatgg ccaactacac gagccgcgag gacctcaggg 3360  
 ccaccgtcgc caaggctctg gaacacaacg tcaggaccag cgatggcatg aactggaacc 3420  
 tccaggacct cgtctacgag gcgctgagcg aggaatggcg caaaaggag gccgagatca 3480  
 gcgaccatg ggccaacgac gaggcggacg gataccagcc gccctcatac gagccggtca 3540  
 acccgaacg caggactccc cagacgccct ccgatggcct gatctgacgt ccgaaaaaag 3600  
 gcgctgtgcg ccctttttaa atcttttata aatcttttta cattctttta gccctccgc 3660  
 agccttactc tcccacggg tttcagccga aacctacacc aaaaggggag cgaacctaca 3720  
 ccaaaagggg agcgaacctc caccaaaagg ggagcgaacc tacaccaaaa ggggagctat 3780  
 atacaccttt tgttatttaa ggtgcaagtt gtgctatgct gaggccatgt ccatgagatc 3840  
 gtgaagttca gcaccagttc aacaacgtcg cgctgaagaa gttcgcgcc gtgcacctgg 3900  
 acgtgctcat ggcatcgcc tcaaggtgga gggagaaggg cacggccacg gtggagttct 3960  
 cgttcgagga gctgcgccc ctcctgctgct tgaggaagaa cctgaccaac aagcagctgg 4020  
 ccgacaagat cgtgcagacg aacgcgcgcc tgctggcgcct gaactacatg ttcgaggatt 4080  
 cgggcaagat catccagttc gcgctgttca cgaagttcgt caccgaccg caggaggcga 4140  
 ctctcgggt tgggtcaac gaggagttcg cgctcctgct caacgacctg accagccagt 4200  
 tcacgcgctt cgagctggcc gagttcggc acctcaagag caagtacgcc aaggagttct 4260  
 accgcagggc caagcagtac cgcagctccg gaatctggaa gatcggcccg gacgagttct 4320  
 gccgactgct tggcgttcca ccgtcggcaa taaccagac acgatatctg aatcagaagg 4380  
 ttcttcagcc aattcaggag gagtgtgggc ctctccttgg cctgaagatc gagcgccagt 4440

ES 2 525 174 T3

acgtgaaacg caggctgtcg ggcttcgtgt tcacattcgc ccgcgagacc cctccggtga 4500  
 tcgacgccag gcccggtggag gcgaggaaga cggacggcga cggcaagggc cattggacga 4560  
 gcggtgcccg gtacggcgag gtgttcacga ccacggcgtt gttcgacgtg acggccgccc 4620  
 gggctcaact cgacggcacc gtggaggccg gggaatgccg tttctgcgcg tttgacgcgc 4680  
 gcaaccgcga acatcatgcg cggaacgccg gaaggctgtt ctacgggccg tgtccgcgcc 4740  
 tctggggcgg ttgcgcctgc catgggtcga tctgccgtg ttccgcctca cgctggtctg 4800  
 tgcgtgcct gatctccctg agcaggctcg ccttggtcct gggggcgctt cgctcctcga 4860  
 acgggccgct ctccccagc tcctcgggct cgctcaggtc caacggctcg tcaccggacg 4920  
 gctcgggccg gttctctccc tgtgccgggt tctccgcctg tgcgcggttgc tcggccatgc 4980  
 gcagtgcgag ggccttcacc tgttcggggc ttagtacttg catgcctgca ggtcgatttt 5040  
 cgttcgtgaa tacatggtat aataactata actaataacg taacgtgact ggcaagagat 5100  
 atttttaaaa caatgaatag gtttacactt actttagttt tatggaaatg aaagatcata 5160  
 tcatatataa tctagaataa aattaactaa aataattatt atctagataa aaaatttaga 5220  
 agccaatgaa atctataaat aaactaaatt aagtttattt aattaacaac tatggatata 5280  
 aataggtac taatcaaat agtgaggagg atatatttga atacatacga acaaattaat 5340  
 aaagtgaaaa aaatacttcg gagacattta aaaaataacc ttattggtac ttacatgttt 5400  
 ggatcaggag ttgagagtgg accaaaacca aatagtgatc ttgacttttt agtcgctcgt 5460  
 tctgaacat tgacagatca aagtaaagaa atacttatac aaaaaattag acctatttca 5520  
 aaaaaatag gagataaaag caacttacga tatatcgaat taacgattat tattcagcaa 5580  
 gaaatggtac cgtggaatca tcctcccaaa caagaattta tttatggaga atggttacaa 5640  
 gagctttatg aacaaggata cattcctcag aaggaattaa attcagattt aaccataatg 5700  
 cttaccaag caaaacgaaa aaataaaaaga atatacggaa attatgactt agaggaatta 5760  
 ctacctgata ttccattttc tgatgtgaga agagcatta tggattcgtc agaggaatta 5820  
 atagataatt atcaggatga tgaaccaaac tctatattaa ctttatgccg tatgatttta 5880  
 actatggaca cgggtaaaat catacaaaa gatattgcgg gaaatgcagt ggctgaatct 5940  
 tctccattag aacataggga gagaattttg ttagcagttc gtagttatct tggagagaat 6000  
 attgaatgga ctaatgaaa tgtaaattta actataaact atttaataa cagattaaaa 6060  
 aaattataaa aaaattgaaa aaatgggtgga aacacttttt tcaatttttt tgttttatta 6120  
 tttaatggg accccgagtc aggcaactat ggatgaacga aatagacaga tcgctgagat 6180  
 aggtgcctca ctgattaagc attggtaact gtcagaccaa gtttactcat atatacttta 6240  
 gattgattta aaacttcatt tttaatttaa aaggatctag gtgaagatcc tttttgataa 6300  
 tctcatgacc aaaatccctt aacgtgagtt ttcgttcac tgagcgtcag accccgtaga 6360  
 aaagatcaaa ggatcttctt gagatccttt ttttctgcgc gtaatctgct gcttgcaaac 6420

ES 2 525 174 T3

aaaaaaacca ccgetaccag cgggtggttg tttgccggat caagagctac caactctttt 6480  
 tccgaaggta actggcttca gcagagcgca gataccaaat actgtccttc tagtgtagcc 6540  
 gtagttaggc caccacttca agaactctgt agcaccgcct acatacctcg ctctgctaata 6600  
 cctgttacca gtggctgctg ccagtggcga taagtcgtgt cttaccgggt tggactcaag 6660  
 acgatagtta ccggataagg cgcagcggtc gggctgaacg gggggttcgt gcacacagcc 6720  
 cagcttgagg cgaacgacct acaccgaact gagataccta cagcgtgagc tatgagaaaag 6780  
 cgccacgctt cccgaaggga gaaaggcgga caggatccg gtaagcggca gggtcggaac 6840  
 aggagagcgc acgagggagc ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata gtctgtcgg 6900  
 gtttcgccac ctctgacttg agcgtcgatt tttgtgatgc tcgtcagggg ggcggagcct 6960  
 atgaaaaaac gccagcaacg cggccttttt acggttcctg gccttttgct ggccttttgc 7020  
 tcacatgttc tttctgcgt tatcccctga ttctgtggat aaccgtatta ccgcctttga 7080  
 gtgagctgat accgctcgcc gcagccgaac gaccgagcgc agcgagtcag tgagcgagga 7140  
 agcggaaag 7148

<210> 15  
 <211> 7190  
 <212> ADN

5

<213> *Bifidobacterium longum*

<400> 15  
 agcgcccaat acgcaaacgg cctctccccg cgcgttgccc gattcattaa tgcagctggc 60  
 acgacaggtt tcccgactgg aaagcgggca gtgagcgsaa cgcaattaat gtgagttagc 120  
 tcaactatta ggcaaccag gctttacact ttatgcttcc ggctcgatg ttgtgtggaa 180  
 ttgtgagcgg ataacaattt cacacaggaa acagctatga ccatgattac gccaaagctg 240  
 gggagacacg acgttgacca cgttgcccc gttcattcag aaagtgcgg tcccctcccc 300  
 cacacgcgca ttgggcaact gggacaagca gctgctcaag gaactgcgag accacatcaa 360  
 caccataatc gatgaggaga ccgccgaatc cgccgagccg gtgacgctgg cccgcttctc 420  
 ttggcgttcg atgatcacca tgctgctggt catcgtggcc gtggtcgtgg tcttcacca 480  
 actgaagccc gaggatca tcaccgcgct gaccaacgcc aaccggtga tggcggtggt 540  
 gacgctcggc ttccggtgtc cggctggat cggctcgtcg atttcgctcg gtccctgat 600  
 ggcgcggcac aagcgtgaca atatggcgt cttcatgagc caggtggcag gcggcttcgc 660  
 caccgtatcc atgccagccg gcgtgggccc ctcttctgct aacctgcagt tcctgcgcaa 720  
 atccggetat cgcaaacacc aggcgaccgc aattatgagc gccgcgctcg tgggtgatta 780  
 cgccgtgtac ttctccatgc tggatcatcat cggcctgttc accggccgca acatgttctc 840  
 cggcgaatc ccgacaaaca cgttggttat cgtgctgggc gttgtggctc tgggtcgtgc 900  
 cattgcgatg atgattccgc cgttgccgca ctgggtgacc cgtcgtctta tgccgctggc 960

10

ES 2 525 174 T3

caagacgtat atcaaccagc tgctggacgt gctttcccag ccccgacagc tcacagtcag 1020  
ctgcctaggc gcgctgttc agaacgcgac cactgggctc gctttctggg eggcctgca 1080  
agcgttcggc tattcatcga atccgattga aacgacgttc gtcttctctgc tggcctatgc 1140  
attgggttcc gcagtgccca ctccaggcgg tctgggcggt gtggaagcgg cgctgacatt 1200  
cgcgttcgtg gcggtcggag tgccgcaggg cgtggcgctt tccgccactt tgctgcaccg 1260  
cgtggtgttc tactggetgc geattccgct gggcgcgggc gccatgaagt ggcttgacaa 1320  
gcataatctt gtctgattcg tctattttca tacccttc ggggaaatag atgtgaaaac 1380  
ccttataaaa cgcgggtttt cgcagaaaca tgcgctagta tcattgatga caacatggac 1440  
taagcaaaaag tgcttgtccc ctgaccaag aaggatgctt tatggcatac aacaagtctg 1500  
acctcgtttc gaagatcgcc cagaagtcca acctgtcga taacgcttta caaacaatta 1560  
ttaacgcccc gttaccaggc gaagaggggc tgtggcagat tcatctgcag gacggaaaaa 1620  
tcagcgccat tgatgcgcaa tccggcgtga tgcccataac tgaaaacagc ctggatgccg 1680  
aacaaggttt agttataacc cgtttgtgg agccacatat tcacctggac accacgcaaa 1740  
ccgccggaca accgaactgg aatcagtcgg gcacgctgtt tgaaggcatt gaacgctggg 1800  
ccgagcgcaa agcgttatta acccatgacg atgtgaaaca acgcgcatgg caaacgctga 1860  
aatggcagat tgccaacggc attcagcatg tgcgtacceca tgtcgatgtt tcggatgcaa 1920  
cgctaactgc gctgaaagca atgctggaag tgaagcagga agtcgcccgg tggattgatc 1980  
tgcaaatcgt cgccttcctt caggaaggga ttttgcgta tcccaacggg gaagcgttgc 2040  
tggaaagaggc gttacgctta ggggcagatg tagtgggggc gatteccgat tttgaattta 2100  
cccgtgaata cggcgtggag tcgctgcata aaaccttcgc cctggcgcaa aaatacgacc 2160  
gtctcatcga cgttcaactgt gatgagatcg atgacgagca gtcgcgcttt gtcgaaaccg 2220  
ttgctgcctt ggcgcacccat gaaggcatgg gcgcgcgagt caccgccagc cacaccacgg 2280  
caatgcactc ctataacggg gcgtatacct cacgcctgtt ccgcttgctg aaaatgtccg 2340  
gtattaactt tgtcgccaac ccgctggtca atattcatct gcaaggacgt ttcgatacgt 2400  
atccaaaacg tcgcggcacc acgcgcgtta aagagatget ggagtccggc attaacgtct 2460  
gctttggtca cgatgatgtc ttogatccgt ggtatccget gggaaacggc aatatgctgc 2520  
aagtgcctga tatggggctg catgtttgcc agttgatggg ctacgggcag attaacgatg 2580  
gcctgaattt aatcaccac cacagcga gacggtgaa tttgcaggat tacggcattg 2640  
ccgccgaaa cagcgcacaac ctgattatcc tgccgctga aaatgggttt gatgcgctgc 2700  
gccgtcaggt tccggtacgt tattcggtag gtggcggcaa ggtgattgcc agcacacaac 2760  
cggcacaac caccgtatat ctggagcagc cagaagccat cgattacaaa cgttgagtta 2820  
acgccttcca ggatgtgttc gtcgaggcta tgaagtccgg cgaaggcctg aagctcaccg 2880

ES 2 525 174 T3

gcctgttctc cgctgagcgc gtcaagcgcc cggtcgcac cggccgcaac ccgcgcactg 2940  
 gcgagcagat tgacattccg gcttcctacg gcgttcgtat ctccgctggc tccttctga 3000  
 agaagcccg caccgagtga ccttctgctc gtagcgatta cttcgagcat tactgacgac 3060  
 aaagacccc accgagatgg tcggggctct tttgttggtg tgctgtgacg tgttgctcaa 3120  
 ccgtattatt ccggactagt cggccgtacg ggcccgatag gcaggcccag ctcaaggccc 3180  
 gcgagaacga cctcgtggcg cggcgcaggg aacgcgaacg caaggcccgc accaagcgcc 3240  
 tgatcgaggt cggcgcgatg gccgagtcgg ccgcgggctt cgaggggaggc gacgagaggg 3300  
 ccaaggagca catcgcccgc ctcgtgcagc tcggctccct ggtggagtcc ctgtgctcca 3360  
 ccgacgtgat ggccaactac acgagccgcg aggacctcag gccaccctc gccaaaggctc 3420  
 tggaacacaa cgtcaggacc agcgtaggca tgaactggaa cctccaggac ctctgtctacg 3480  
 aggcgctgag cgaggaatgg cgcaaaaggg acggcgagat cagcgacca tgggccaacg 3540  
 acgagggcga cggataccag ccgccctcat acgagccggt caaccccgaa cgcaggactc 3600  
 cccagacgcc ctccgatggc ctgatctgac gtccgaaaaa aggcgctgtg cgccttttt 3660  
 aaatctttta taaatctttt tacattcttt tagcccctcc gcagccttac tctcccaacg 3720  
 ggtttcagcc gaaacctaca ccaaaagggg agcgaaccta caccaaaagg ggagcgaacc 3780  
 tacacaaaaa ggggagcga cctacaccaa aaggggagct atatacacct tttgttattt 3840  
 aaggtgcaag ttgtgctatg ctgaggccat gtccatgaga tcgtgaagtt cagcaccagt 3900  
 tcaacaacgt cgcgctgaag aagtctgacg ccgtgcacct ggacgtgctc atggcgatcg 3960  
 cctcaagggt gagggagaag ggcacggcca cgggtggagt ctcggttcgag gagctgcgcg 4020  
 gcctcatgcy attgaggaag aacctgacca acaagcagct gcccgacaag atcgtgcaga 4080  
 cgaacgcgcy cctgctggcg ctgaactaca tgttcgagga ttcgggcaag atcatccagt 4140  
 tcgcyctgtt cacgaagttc gtcaccgacc cgcaggaggc gactctcgcg gttggggctca 4200  
 acgaggagtt cgcgttcctg ctcaacgacc tgaccagcca gttcacgcgc ttcgagctgg 4260  
 ccgagttcgc cgacctcaag agcaagtacg ccaaggagtt ctaccgcagc gccaaagcagt 4320  
 accgcagctc cggaatctgg aagatcgcc gcgacgagtt ctgccgactg cttggcgctc 4380  
 caccgtcggc aataaccag acacgatatc tgaatcagaa ggttcttcag ccaattcagg 4440  
 aggagtgtgg gcctctcctt gccctgaaga tcgagcgcca gtacgtgaaa cgcaggctgt 4500  
 cgggcttcgt gttcacattc gcccgcgaga cccctccggt gatcgacgcc aggccctggg 4560  
 aggcgaggaa gacggacggc gacggcaagg gccattggac gagcgttgcc ggttacggcg 4620  
 aggtgttcac gaccacggcg ttgttcgacg tgacggccgc ccgggctcac ttcgacggca 4680  
 ccgtggaggc cggggaatgc cgttctcgcg cgtttgacgc gcgcaaccgc gaacatcatg 4740  
 cgcggaacgc cggaaggctg ttctagcggc cgtgtccgcy cctctggggc ggttgccct 4800  
 gccatgggtc gatctgccgc tgttcggcct cacgctggtc tgtgcgctgc ctgatctccc 4860

ES 2 525 174 T3

tgagcaggtc ggccttggtc ctggggggc ttcgctctc gaacgggccc ctctccccca 4920  
 ggtcctcggg ctcgctcagg tccaacggct cgtcaccgga cggctcgggc cggttctctc 4980  
 cctgtgcegg gttctccgcc tgtgcgcggt gttcggccat gcgcagtgcg agggccttca 5040  
 cctgttcggg gcttagtact tgcattgcctg caggtcgatt ttcgttcgtg aatacatggt 5100  
 ataataacta taactaataa cgtaacgtga ctggcaagag atatttttaa aacaatgaat 5160  
 aggtttacac ttactttagt tttatggaaa tgaaaatca tatcatatat aatctagaat 5220  
 aaaattaact aaaataatta ttatctagat aaaaaattta gaagccaatg aaatctataa 5280  
 ataaactaaa ttaagtttat ttaattaaca actatggata taaaataggt actaatcaaa 5340  
 atagtgagga ggatatatgt gaatacatac gaacaaatta ataaagtga aaaaactctt 5400  
 cgggacatt taaaaataa ccttattggt acttacatgt ttggatcagg agttgagagt 5460  
 ggacccaaac caaatagtga tcttgacttt ttagtcgtcg tatctgaacc attgacagat 5520  
 caaagtaag aaatacttat acaaaaaatt agacctattt caaaaaaat aggagataaa 5580  
 agcaacttac gatatatcga attaacgatt attattcagc aagaaatggt accgtggaat 5640  
 catcctccca aacaagaatt tatttatgga gaatggttac aagagcttta tgaacaagga 5700  
 tacattcctc agaaggaatt aaattcagat ttaaccataa tgctttacca agcaaacga 5760  
 aaaaataaaa gaatatacgg aaattatgac ttagaggaat tactacctga tattccattt 5820  
 tctgatgtga gaagagccat tatggattcg tcagaggaat taatagataa ttatcaggat 5880  
 gatgaaacca actctatatt aactttatgc cgtatgattt taactatgga cacgggtaaa 5940  
 atcatacca aagatattgc gggaaatgca gtggctgaat cttctccatt agaacatagg 6000  
 gagagaatth tgtagcagc tcgtagttat cttggagaga atattgaatg gactaatgaa 6060  
 aatgtaaatt taactataaa ctatttaaat aacagattaa aaaaattata aaaaattga 6120  
 aaaaatggtg gaaacacttt tttcaatttt tttgttttat ttttaattgg ggaccccgag 6180  
 tcaggcaact atggatgaac gaaatagaca gatcgcctgag ataggtgcct cactgattaa 6240  
 gcattggtaa ctgtcagacc aagtttactc atatatactt tagattgatt taaaacttca 6300  
 tttttaattt aaaaggatct aggtgaagat cctttttgat aatctcatga ccaaaatccc 6360  
 ttaacgtgag ttttcgttcc actgagcgtc agaccccgta gaaaagatca aaggatcttc 6420  
 ttgagatcct tttttctgc gcgtaactctg ctgcttgcaa acaaaaaaac caccgctacc 6480  
 agcggtggtt tgtttgccgg atcaagagct accaactctt tttccgaagg taactggctt 6540  
 cagcagagcg cagataccaa atactgtcct tctagtgtag ccgtagttag gccaccactt 6600  
 caagaactct gtagcaccgc ctacatacct cgctctgcta atcctgttac cagtggctgc 6660  
 tgccagtggc gataagtcgt gtcttaccgg gttggactca agacgatagt taccggataa 6720  
 ggcgcagcgg tcgggctgaa cggggggttc gtgcacacag cccagcttgg agcgaacgac 6780

ES 2 525 174 T3

ctacaccgaa ctgagatacc tacagcgtga gctatgagaa agcgccacgc ttcccgaagg 6840  
 gagaaaggcg gacaggtatc cggtaagcgg cagggtcggg acaggagagc gcacgagggg 6900  
 gcttccaggg ggaacgcct ggtatcttta tagtcctgtc gggtttcgcc acctctgact 6960  
 tgagcgtcga tttttgtgat gctcgtcagg ggggcggagc ctatggaaaa acgccagcaa 7020  
 cgcggccttt ttacggttcc tggccttttg ctggcctttt gctcacatgt tctttcctgc 7080  
 gttatccctt gattctgtgg ataaccgtat taccgccttt gaggagctg ataccgctcg 7140  
 ccgcagccga acgaccgagc gcagcgagtc agtgagcggg gaagcgggag 7190

5 <210> 16  
 <211> 40  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> cebador

<400> 16  
 ccgggcggtta ataattggtt gtaagtatt cgaaacgagg 40

15 <210> 17  
 <211> 40  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> cebador

<400> 17  
 cctcgtttcg aataacttac aaacaattat taacgccggg 40

25 <210> 18  
 <211> 46  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> cebador

<400> 18  
 ctggttaaccg ggcaataatt gtttgtaaag cgttattcga aacgag 46

35 <210> 19  
 <211> 40  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> cebador

<400> 19  
 cgctttacaa acaattattg cccggttacc aggcgaagag 40

50 <210> 20  
 <211> 36  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> cebador

55 <400> 20

ccacggcgcg acttcatgct tcaactccag cattgc 36

5 <210> 21  
<211> 40  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> cebador

<400> 21  
ctggaagtga agcatgaagt cgcgccgtgg attgatctgc 40

15 <210> 22  
<211> 36  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

20 <220>  
<223> cebador

<400> 22  
cacggatcga agacagcatc gtgaccaaag cagacg 36

25 <210> 23  
<211> 36  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

30 <220>  
<223> cebador

<400> 23  
gctttgtca cgatgctgtc ttcgatccgt ggtatc 36

35 <210> 24  
<211> 27  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

40 <220>  
<223> cebador

<400> 24  
gactagtccg gaataatacg gttggac 27

45 <210> 25  
<211> 29  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

50 <220>  
<223> cebador

<400> 25  
ggcttctggc tgcccagat atacggtgg 29

55 <210> 26  
<211> 29  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

60 <220>  
<223> cebador

65 <400> 26



ccaccgtata tctggggcag ccagaagcc 29

<210> 27

<211> 7163

5 <212> ADN

<213> *Bifidobacterium longum*

<400> 27

```

agcgcccaat acgcaaaccg cctctccccg cgcgttggcc gattcattaa tgcagctggc 60
acgacaggtt tccccactgg aaagcgggca gtgagcgsaa cgcaattaat gtgagttagc 120
tcactcatta ggcaccccag gctttacact ttatgcttcc ggctcgtatg ttgtgtggaa 180
ttgtgagcgg ataacaatth cacacaggaa acagctatga ccatgattac gccaagcttg 240
gggagacacg acgttgacca cgttgcccc gttcattcag aaagtgcggy tccccctccc 300
cacacgcgca ttgggcacgt gggacaagca gctgctcaag gaactgcgag accacatcaa 360
caccataatc gatgaggaga ccgccgaatc cggcgagccg gtgacgctgg cccgcttctc 420
ttggcgcttcg atgatcacca tgctgctggt catcgtggcc gtggtcgtgg tcttcaccca 480
actgaagccc gaggagatca tcaccgcgct gaccaacgcc aacccgttga tggcggtggt 540
gacgctcgcg ttcggtgtct gcggctggat cggctcgtcg atttcgctcg gtccctgat 600
ggcgcgccac aagcgtgaca atatgggctt cttcatgagc caggtggcag gcggcttcgc 660
caccgtatcc atgccagccg gcgtgggccc ctctgtctgc aacctgcagt tcctgcgcaa 720
atccggctat cgcaaacacc aggcgaccgc aattatgagc gccgcgctcg tgggtgatta 780
cgccgtgtac ttctccatgc tggatcatcat cggcctgttc accggccgca acatgcttctc 840
cggcgcaatc ccgacaaaca cgttggttat cgtgctgggc gttgtggtcg tgggtgctgtc 900
cattgcgatg atgattccgc cgttgcgcca ctgggtgacc cgtcgtctta tgccgctggc 960
caagacgtat atcaaccagc tgctggacgt gctttcccag ccccgacagc tcacagtcag 1020
ctgcctaggc gcgctgttcc agaacgcgac cactgggctc gctttctggg cggccctgca 1080
agcgttcggc tattcatcga atccgattga aacgacgttc gtcttctctc tggcctatgc 1140
attgggttcc gcagtgccca ctccagggcg tctgggcggt gtggaagcgg cgtgacatt 1200
cgcgttcgtg gcggtcggag tgccgcaggg cgtggcgctt tccgccactt tgctgcaccg 1260

```

10

ES 2 525 174 T3

cgtggtgttc tactggctgc gcattccgct gggcgcgcg gccatgaagt ggcttgacaa 1320  
 gcataatctt gtctgattcg tctattttca taccoccttc ggggaaatag atgtgaaaac 1380  
 ccttataaaa cgcgggtttt cgcagaaaaca tgcgctagta tcattgatga caacatggac 1440  
 taagcaaaag tgcttgtccc ctgaoccaaag aaggatgctt tatggcatac aacaagtctg 1500  
 acctcgtttc gaataacgct ttacaacaa ttattaacgc ccggttacca ggcaagagg 1560  
 ggctgtggca gattcatctg caggacggaa aaatcagcgc cattgatgcg caatccggcg 1620  
 tgatgcccat aactgaaaac agcctggatg ccgaacaagg ttagttata ccgccgttg 1680  
 tggagccaca tattcacctg gacaccacgc aaaccgccg acaaccgaac tggaatcagt 1740  
 ccggcacgct gtttgaaggc attgaacgct gggccgagcg caaagcgtta ttaaccatg 1800  
 acgatgtgaa acaacgcgca tggcaaacgc tgaatggca gattgccaac ggcatcagc 1860  
 atgtgcgtac ccatgtcgat gtttcggatg caacgctaac tgcgctgaaa gcaatgctgg 1920  
 aagtgaagca ggaagtgcg ccgtggattg atctgcaaat cgtcgccttc cctcaggaag 1980  
 ggattttgtc gtatcccaac ggtgaagcgt tgctggaaga ggcgttacgc ttaggggag 2040  
 atgtagtggg ggcgattccg cattttgaat ttaccctgta ataccggctg gagtcgctgc 2100  
 ataaaacctt cgcctggcg caaaaatacg accgtctcat cgacgttcac tgtgatgaga 2160  
 tcgatgacga gcagtcgcg tttgtcgaac ccgttgctgc cctggcgac catgaaggca 2220  
 tggcgcgcg agtcaccgcc agccacacca cggcaatgca ctctataac gggcgctata 2280  
 cctcagcctt gttccgcttg ctgaaaatgt ccggtattaa ctttgcgcc aaccgctgg 2340  
 tcaatattca tctgcaagga cgtttcgata cgtatccaaa acgtcgcggc atcacgcgcg 2400  
 ttaaagagat gctggagtcc ggcataacg tctgctttgg tcacgatgct gtcttcgatc 2460  
 cgtggtatcc gctgggaacg gcgaatatgc tgcaagtgct gcatatgggg ctgcatgttt 2520  
 gccagttgat gggctacggg cagattaacg atggcctgaa ttaatacacc caccacagcg 2580  
 caaggacggt gaatttgag gattacggca ttgccgccg aaacagcgcc aacctgatta 2640  
 tcctgccggc tgaaaatggg tttgatgccc tgcgccgca ggttccgta cgttattcgg 2700  
 tacgtggcgg caaggtgatt gccagcacac aaccggcaca aaccaccgta tatctggagc 2760  
 agccagaagc catcgattac aaacgcttag ttaacgcctt ccaggatgtg ttcgtcgagg 2820  
 ctatgaagtc cggcgaaggc ctgaagctca ccggcctgtt ctccgctgag cgcgtcaagc 2880  
 gcccggtcgc caccggccgc aaccgcgca ctggcgagca gattgacatt ccggcttctc 2940  
 acggcgcttc tatctccgct ggctccctgc tgaagaaggc cgtcacggag tgaccttctg 3000  
 ctcgtagcga ttacttcgag cactactgac gacaaagacc ccgaccgaga tggtcggggt 3060  
 cttttgttg tggctgctg acgtgttgc caaccgtatt attccggact agtcggcgt 3120  
 acgggccca taggcaggcc cagctcaagg cccgcgagaa cgacctcgtg gcgcggcgca 3180  
 gggaaacgca acgcaaggcc cgcaccaagc gcctgatcga ggtcggcgcg atggccgagt 3240

ES 2 525 174 T3

cgcccgcggg cttcgaggga ggcgacgaga gggccaagga gcacatcgcc cgcctcgtgc 3300  
 agctcggctc cctggtggag tccctgtgct ccaccgacgt gatggccaac tacacgagcc 3360  
 gcgaggacct cagggccacc gtcgccaagg ctctggaaca caacgtcagg accagcgatg 3420  
 gcatgaactg gaacctccag gacctcgtct acgaggcgct gagcgaggaa tggcgcaaaa 3480  
 gggacggcga gatcagcgac ccatgggcca acgacgaggc ggacggatac cagccgccct 3540  
 catacgagcc ggtcaacccc gaacgcagga ctccccagac gccctccgat ggcctgatct 3600  
 gacgtccgaa aaaaggcgct gtgcccctt tttaaatct ttataaatct ttttacattc 3660  
 ttttagcccc tccgcagcct tactctccca acgggtttca gccgaaacct acaccaaaaag 3720  
 gggagcgaa ctaacacaaa aggggagcga acctacacca aaaggggagc gaacctacac 3780  
 caaaagggga gctatataca ccttttgta ttttaaggtgc aagttgtgct atgctgaggc 3840  
 catgtccatg agatcgtgaa gttcagcacc agttcaacaa cgtcgcgctg aagaagttcg 3900  
 acgccgtgca cctggacgtg ctcatggcga tcgcctcaag ggtgagggag aagggcacgg 3960  
 ccacggtgga gttctcgttc gaggagctgc gcggcctcat gcgattgagg aagaacctga 4020  
 ccaacaagca gctggccgac aagatcgtgc agacgaacgc ggcctcgtg gcgctgaact 4080  
 acatgttcga ggattcgggc aagatcatcc agttcgcgct gttcacgaag ttcgtcaccg 4140  
 accccgagga ggcgactctc gcggttgggg tcaacgagga gttcgcgttc ctgctcaacg 4200  
 acctgaccag ccagttcacg cgttcgagc tggccgagtt cgcgacctc aagagcaagt 4260  
 acgccaagga gttctaccgc agggccaagc agtaccgag ctccggaatc tggaagatcg 4320  
 gcccgacgca gttctgccga ctgcttggcg ttccaccgtc ggcaataacc cagacacgat 4380  
 atctgaatca gaagttctt cagccaattc aggaggagtg tgggcctctc cttggcctga 4440  
 agatcgagcg ccagtacgtg aaacgcaggc tgtcgggctt cgtgttcaca ttcgcccgcg 4500  
 agaccctcc ggtgatcgac gccagggccc tggaggcgag gaagacggac ggcgacggca 4560  
 agggccattg gacgagcgtt gccgggtacg gcgaggtggt cacgaccacg gcgttgttcg 4620  
 acgtgacggc cgcccgggct cacttcgacg gcaccgtgga ggccgggaa tgecgtttct 4680  
 gcgcgtttga cgcgcgcaac cgcgaacatc atgcgcggaa cgccggaagg ctgttctagc 4740  
 ggcctgtcc gcgcctctgg ggcggttgcg cctgccatgg gtcgatctgc cgtgttcgg 4800  
 cctcacgctg gtctgtgcgc tgcctgatct ccctgagcag gtcggccttg gtcctggggg 4860  
 cgcttcgctc ctcgaacggg ccgctctccc ccaggtcctc gggctcgtc aggtccaacg 4920  
 gctcgtcacc ggacggctcg ggccggttct ctccctgtgc cgggttctcc gctgtgcgc 4980  
 gttgttcggc catgcgcagt gcgagggcct tcacctgttc ggggcttagt acttgcagtc 5040  
 ctgcaggtcg atttctgttc gtgaatacat gttataataa ctataactaa taacgtaacg 5100  
 tgactggcaa gagatatttt taaaacaatg aataggttta cacttacttt agttttatgg 5160

ES 2 525 174 T3

aatgaaaga tcatacata tataatctag aataaaatta actaaaataa ttattatcta 5220  
 gataaaaaat ttagaagcca atgaaateta taaataaact aaattaagtt tatttaatta 5280  
 acaactatgg atataaaata ggtactaatc aaaaatagtg ggaggatata tttgaatata 5340  
 tacgaacaaa ttaataaagt gaaaaaata ctctggagac atttaaaaaa taaccttatt 5400  
 ggtacttaca tgtttggatc aggagttgag agtggaccaa aaccaaatag tgatcttgac 5460  
 tttttagtcg tcgtatctga accattgaca gatcaaagta aagaaatact tatacaaaaa 5520  
 attagaccta tttcaaaaaa aataggagat aaaagcaact tacgatatat cgaattaacg 5580  
 attattattc agcaagaaat ggtaccgtgg aatcatcctc ccaacaaga atttatttat 5640  
 ggagaatggt tacaagagct ttatgaacaa ggatacattc ctcagaagga attaaattca 5700  
 gatttaacca taatgcttta ccaagcaaaa cgaaaaata aaagaatata cggaaattat 5760  
 gacttagagg aattactacc tgatattcca ttttctgatg tgagaagagc cattatggat 5820  
 tcgtcagagg aattaataga taattatcag gatgatgaaa ccaactctat attaacttta 5880  
 tgccgatga ttttaactat ggacacgggt aaaatcatac caaaagatat tgcgggaaat 5940  
 gcagtggctg aatcttctcc attagaacat agggagagaa ttttgtagc agtctgtagt 6000  
 tatcttgag agaattattga atggactaat gaaaatgtaa atttaactat aaactattta 6060  
 aataacagat taaaaaaatt ataaaaaat tgaaaaaatg gtggaacac ttttttcaat 6120  
 ttttttgttt tattatttaa tggggacccc gagtcaggca actatggatg aacgaaatag 6180  
 acagatcgct gagataggtg cctcactgat taagcattgg taactgtcag accaagtta 6240  
 ctcatatata cttagattg atttaaaact tcatttttaa tttaaaagga tctaggtgaa 6300  
 gatccttttt gataatctca tgaccaaaat cccttaactg gagttttcgt tccactgagc 6360  
 gtcagacccc gtagaaaaga tcaaaggatc ttcttgagat ccttttttc tgcgcgtaat 6420  
 ctgctgcttg caaacaaaaa aaccaccgct accagcggtg gtttgtttc cggatcaaga 6480  
 gctaccaact ctttttccga aggtaactgg cttcagcaga gcgcagatac caaatactgt 6540  
 ccttctagtg tagccgtagt taggccacca ctcaagaac tctgtagcac cgcctacata 6600  
 cctcgtctg ctaatcctgt taccagtggc tgctgccagt ggcgataagt cgtgtettac 6660  
 cgggttgac tcaagacgat agttaccgga taaggcgcag cggtcgggct gaacgggggg 6720  
 ttcgtgcaca cagcccagct tggagcgaac gacctacacc gaactgagat acctacagcg 6780  
 tgagctatga gaaagcgcca cgcttccga agggagaaag gcggacaggt atccggtaag 6840  
 cggcagggtc ggaacaggag agcgcacgag ggagcttcca ggggaaacg cctggtatct 6900  
 ttatagtcct gtcgggtttc gccacctctg acttgagcgt cgatttttgt gatgctcgtc 6960  
 aggggggctg agcctatgga aaaacgccag caacgcggcc tttttacggt tcctggcctt 7020  
 ttgctggcct tttgctcaca tgttctttcc tgcgttatcc cctgattctg tggataaccg 7080  
 tattaccgcc tttgagtgag ctgataaccg tcgccgcagc cgaacgaccg agcgcagcga 7140  
 gtcagtgagc gaggaagcgg aag 7163

5 <210> 28  
 <211> 427  
 <212> PRT  
 <213> *Escherichia coli*

10 <400> 28

ES 2 525 174 T3

Met Ser Asn Asn Ala Leu Gln Thr Ile Ile Asn Ala Arg Leu Pro Gly  
 1 5 10 15

Glu Glu Gly Leu Trp Gln Ile His Leu Gln Asp Gly Lys Ile Ser Ala  
 20 25 30

Ile Asp Ala Gln Ser Gly Val Met Pro Ile Thr Glu Asn Ser Leu Asp  
 35 40 45

Ala Glu Gln Gly Leu Val Ile Pro Pro Phe Val Glu Pro His Ile His  
 50 55 60

Leu Asp Thr Thr Gln Thr Ala Gly Gln Pro Asn Trp Asn Gln Ser Gly  
 65 70 75 80

Thr Leu Phe Glu Gly Ile Glu Arg Trp Ala Glu Arg Lys Ala Leu Leu  
 85 90 95

Thr His Asp Asp Val Lys Gln Arg Ala Trp Gln Thr Leu Lys Trp Gln  
 100 105 110

Ile Ala Asn Gly Ile Gln His Val Arg Thr His Val Asp Val Ser Asp  
 115 120 125

Ala Thr Leu Thr Ala Leu Lys Ala Met Leu Glu Val Lys Gln Glu Val  
 130 135 140

Ala Pro Trp Ile Asp Leu Gln Ile Val Ala Phe Pro Gln Glu Gly Ile  
 145 150 155 160

Leu Ser Tyr Pro Asn Gly Glu Ala Leu Leu Glu Glu Ala Leu Arg Leu  
 165 170 175

Gly Ala Asp Val Val Gly Ala Ile Pro His Phe Glu Phe Thr Arg Glu  
 180 185 190

Tyr Gly Val Glu Ser Leu His Lys Thr Phe Ala Leu Ala Gln Lys Tyr  
 195 200 205

Asp Arg Leu Ile Asp Val His Cys Asp Glu Ile Asp Asp Glu Gln Ser  
 210 215 220

ES 2 525 174 T3

Arg Phe Val Glu Thr Val Ala Ala Leu Ala His His Glu Gly Met Gly  
225 230 235 240

Ala Arg Val Thr Ala Ser His Thr Thr Ala Met His Ser Tyr Asn Gly  
245 250 255

Ala Tyr Thr Ser Arg Leu Phe Arg Leu Leu Lys Met Ser Gly Ile Asn  
260 265 270

Phe Val Ala Asn Pro Leu Val Asn Ile His Leu Gln Gly Arg Phe Asp  
275 280 285

Thr Tyr Pro Lys Arg Arg Gly Ile Thr Arg Val Lys Glu Met Leu Glu  
290 295 300

Ser Gly Ile Asn Val Cys Phe Gly His Asp Asp Val Phe Asp Pro Trp  
305 310 315 320

Tyr Pro Leu Gly Thr Ala Asn Met Leu Gln Val Leu His Met Gly Leu  
325 330 335

His Val Cys Gln Leu Met Gly Tyr Gly Gln Ile Asn Asp Gly Leu Asn  
340 345 350

Leu Ile Thr His His Ser Ala Arg Thr Leu Asn Leu Gln Asp Tyr Gly  
355 360 365

Ile Ala Ala Gly Asn Ser Ala Asn Leu Ile Ile Leu Pro Ala Glu Asn  
370 375 380

Gly Phe Asp Ala Leu Arg Arg Gln Val Pro Val Arg Tyr Ser Val Arg  
385 390 395 400

Gly Gly Lys Val Ile Ala Ser Thr Gln Pro Ala Gln Thr Thr Val Tyr  
405 410 415

Leu Glu Gln Pro Glu Ala Ile Asp Tyr Lys Arg  
420 425

<210> 29

<211> 18

5 <212> PRT

<213> *Bifidobacterium longum*

<400> 29

Met Ala Tyr Asn Lys Ser Asp Leu Val Ser Lys Ile Ala Gln Lys Ser  
1 5 10 15

10

Asn Leu

<210> 30

<211> 12

15

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Constructo de plásmido

20

|    |  |           |
|----|--|-----------|
|    | <220><br><221> CDS<br><222> (1)..(12)  |           |
| 5  | <400> 30<br><b>atg tcg aat aac</b><br><b>Met Ser Asn Asn</b><br><b>1</b>           | <b>12</b> |
|    | <210> 31<br><211> 4<br><212> PRT<br><213> Secuencia artificial                     |           |
|    | <220><br><223> Constructo sintético  |           |
| 15 | <400> 31<br><b>Met Ser Asn Asn</b><br><b>1</b>                                     |           |
|    | <210> 32<br><211> 12<br><212> ADN<br><213> Secuencia artificial                    |           |
| 20 | <220><br><223> Constructo de plásmido  |           |
|    | <220><br><221> CDS<br><222> (1)..(12)  |           |
| 25 | <400> 32<br><b>gtg tcg aat aac</b><br><b>Met Ser Asn Asn</b><br><b>1</b>           | <b>12</b> |
| 30 | <210> 33<br><211> 4<br><212> PRT<br><213> Secuencia artificial                     |           |
|    | <220><br><223> Constructo sintético  |           |
|    | <400> 33<br><b>Met Ser Asn Asn</b><br><b>1</b>                                     |           |
| 35 | <210> 34<br><211> 15<br><212> ADN<br><213> Secuencia artificial                    |           |
| 40 | <220><br><223> Constructo de plásmido  |           |
|    | <220><br><221> CDS<br><222> (1)..(15)  |           |
| 45 | <400> 34<br><b>atg gca tcg aat aac</b><br><b>Met Ala Ser Asn Asn</b><br><b>1 5</b> | <b>15</b> |
| 50 |  |           |
| 55 |  |           |

<210> 35  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Constructo sintético  
  
 <400> 35  
**Met Ala Ser Asn Asn**  
 10 **1 5**  
  
 <210> 36  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 15 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Constructo de plásmido  
 20 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(18)  
  
 <400> 36  
**atg gca tac tcg aat aac**  
**Met Ala Tyr Ser Asn Asn**  
 25 **1 5**  
  
 <210> 37  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 30 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Constructo sintético  
 35 <400> 37  
**Met Ala Tyr Ser Asn Asn**  
**1 5**  
  
 <210> 38  
 <211> 21  
 40 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Constructo de plásmido  
 45 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(21)  
  
 50 <400> 38  
**atg gca tac aac tcg aat aac**  
**Met Ala Tyr Asn Ser Asn Asn**  
**1 5**  
  
 <210> 39  
 <211> 7  
 55 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Constructo sintético  
 60 <400> 39

18

21



**Met Ala Tyr Asn Ser Asn Asn**  
**1 5**

<210> 40  
 <211> 36  
 5 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Constructo de plásmido

10 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(36)

15 <400> 40 36  
**atg gca tac aac aag tct gac ctc gtt tcg aat aac**  
**Met Ala Tyr Asn Lys Ser Asp Leu Val Ser Asn Asn**  
**1 5 10**

<210> 41  
 <211> 12  
 20 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Constructo sintético

25 <400> 41  
**Met Ala Tyr Asn Lys Ser Asp Leu Val Ser Asn Asn**  
**1 5 10**

<210> 42  
 30 <211> 63  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 35 <223> Constructo de plásmido

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(63)

40 <400> 42 48  
**atg gca tac aac aag tct gac ctc gtt tcg aag atc gcc cag aag tcc**  
**Met Ala Tyr Asn Lys Ser Asp Leu Val Ser Lys Ile Ala Gln Lys Ser**  
**1 5 10 15**

**aac ctg tcg aat aac** 63  
**Asn Leu Ser Asn Asn**  
**20**

<210> 43  
 45 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 50 <223> Constructo sintético

<400> 43  
**Met Ala Tyr Asn Lys Ser Asp Leu Val Ser Lys Ile Ala Gln Lys Ser**  
**1 5 10 15**

**Asn Leu Ser Asn Asn**  
**20**

## REIVINDICACIONES

1. Primer fragmento de ADN que comprende un promotor y un terminador de un gen que codifica para una proteína de unión a ADN similar a histona derivado de una bacteria del género *Bifidobacterium*, y que tiene entre el promotor y el terminador un ADN en el que se fusiona un segundo fragmento de ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos desde el 1<sup>er</sup> hasta uno cualquiera del 4<sup>o</sup> al 18<sup>o</sup> aminoácido en el extremo N-terminal de la proteína de unión a ADN similar a histona en el lado 5'-terminal de un ADN mutado que codifica para citosina desaminasa, en el que el ADN mutado que codifica para citosina desaminasa es (a) un ADN que codifica para la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID NO: 28 que tiene la metionina de iniciación excluida o (b) un ADN que codifica para la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID NO: 28 que tiene el ácido aspártico en la 315<sup>a</sup> posición sustituido por alanina y la metionina de iniciación excluida.
2. Primer fragmento de ADN según la reivindicación 1, en el que la secuencia de nucleótidos que codifica para un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos desde el 1<sup>er</sup> hasta uno cualquiera del 4<sup>o</sup> al 18<sup>o</sup> aminoácido en el extremo N-terminal de la proteína de unión a ADN similar a histona es una secuencia de nucleótidos desde el 1482<sup>o</sup> hasta uno cualquiera del 1493<sup>er</sup> al 1535<sup>o</sup> nucleótido en SEQ ID NO: 15.
3. Primer fragmento de ADN según la reivindicación 1 ó 2, en el que el péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos desde el 1<sup>er</sup> hasta uno cualquiera del 4<sup>o</sup> al 18<sup>o</sup> aminoácido en el extremo N-terminal de la proteína de unión a ADN similar a histona es un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos desde el 1<sup>er</sup> aminoácido hasta uno cualquiera del 4<sup>o</sup> al 18<sup>o</sup> aminoácido en SEQ ID NO: 29.
4. Primer fragmento de ADN según la reivindicación 3, en el que el péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos desde el 1<sup>er</sup> hasta uno cualquiera del 4<sup>o</sup> al 18<sup>o</sup> aminoácido en SEQ ID NO: 29 es un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos desde el 1<sup>er</sup> hasta el 9<sup>o</sup> aminoácido en SEQ ID NO: 29.
5. Método de construcción de un portador de suministro génico que consiste en un microorganismo anaerobio que puede crecer en un tejido tumoral en un entorno anaerobio y que puede expresar citosina desaminasa, que comprende las etapas de:
- (1) preparar un plásmido de fusión que tiene un fragmento de un plásmido de una bacteria del género *Bifidobacterium* y un fragmento de un plásmido de *Escherichia coli*;
- (2) incorporar un primer fragmento de ADN que comprende un promotor y un terminador de un gen que codifica para una proteína de unión a ADN similar a histona derivado de una bacteria del género *Bifidobacterium* al plásmido de fusión;
- (3) incorporar, entre el promotor y el terminador, un ADN en el que se fusiona un segundo fragmento de ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos desde el 1<sup>er</sup> hasta uno cualquiera del 4<sup>o</sup> al 18<sup>o</sup> aminoácido en el extremo N-terminal de la proteína de unión a ADN similar a histona en el lado 5'-terminal de un ADN mutado que codifica para citosina desaminasa para preparar un vector de expresión; y
- (4) transformar un microorganismo anaerobio con el vector de expresión, en el que el ADN mutado que codifica para citosina desaminasa es (a) un ADN que codifica para la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID NO: 28 que tiene la metionina de iniciación excluida o (b) un ADN que codifica para la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID NO: 28 que tiene el ácido aspártico en la 315<sup>a</sup> posición sustituido por alanina y la metionina de iniciación excluida.
6. Método de construcción de un portador de suministro génico según la reivindicación 5, en el que la secuencia de nucleótidos que codifica para un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos desde el 1<sup>er</sup> hasta uno cualquiera del 4<sup>o</sup> al 18<sup>o</sup> aminoácido en el extremo N-terminal de la proteína de unión a ADN similar a histona es una secuencia de nucleótidos desde el 1482<sup>o</sup> hasta uno cualquiera del 1493<sup>er</sup> al 1535<sup>o</sup> nucleótido en SEQ ID NO: 15.
7. Método de construcción de un portador de suministro génico según la reivindicación 5 ó 6, en el que el péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos desde el 1<sup>er</sup> hasta uno cualquiera del 4<sup>o</sup> al 18<sup>o</sup> aminoácido en el extremo N-terminal de la proteína de unión a ADN similar a histona es un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos desde el 1<sup>er</sup> hasta uno cualquiera del 4<sup>o</sup> al 18<sup>o</sup> aminoácido en SEQ ID NO: 29.
8. Portador de suministro génico que consiste en un microorganismo anaerobio que puede crecer en un tejido tumoral en un entorno anaerobio, construyéndose el portador de suministro génico mediante un método de construcción según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7.
9. Portador de suministro génico según la reivindicación 8, en el que la bacteria anaerobia es una bacteria del género *Bifidobacterium*.

10. Portador de suministro génico según la reivindicación 9, en el que la bacteria del género *Bifidobacterium* es cualquier bacteria del género *Bifidobacterium* seleccionada de *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium thermophilum*, *Bifidobacterium pseudolongum*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve* y *Bifidobacterium longum*.

5

11. Composición farmacéutica que comprende un portador de suministro génico según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10.

Figura 1

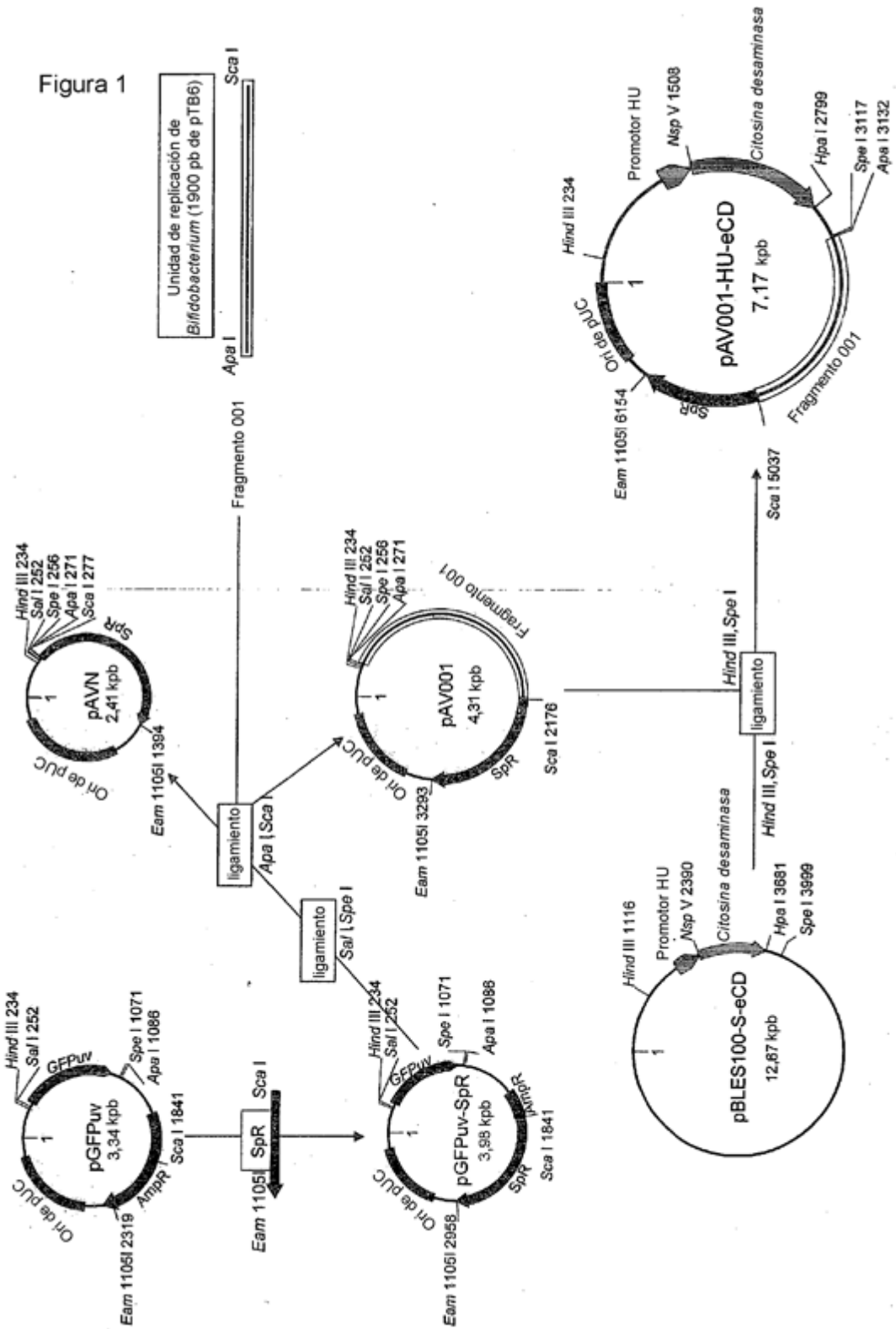


Figura 2

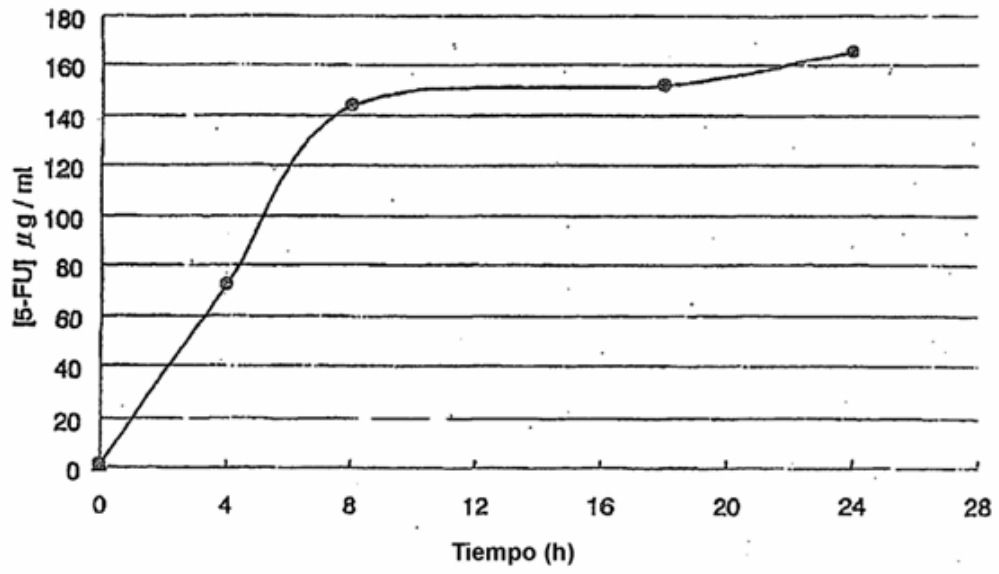


Figura 3

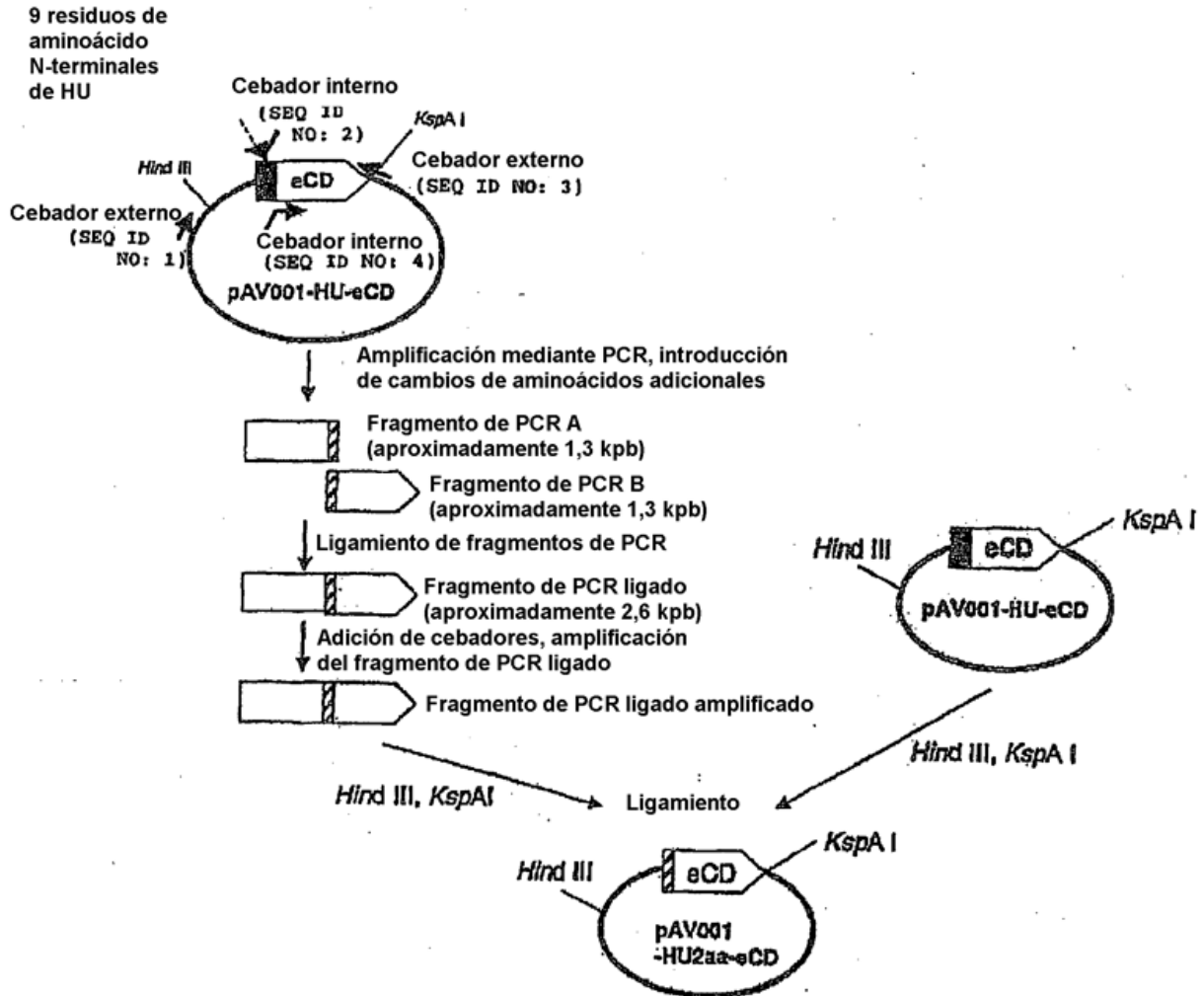


Figura 4

