

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 569 659**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/09** (2006.01)

**A61K 39/07** (2006.01)

**A61P 31/04** (2006.01)

**A61P 31/16** (2006.01)

**C12N 1/21** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.09.2010 E 10817294 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.04.2016 EP 2479270**

54 Título: **Gen que expresa una proteína de fusión presentada en la superficie de bifidobacterium**

30 Prioridad:

**17.09.2009 JP 2009216256**

**22.04.2010 JP 2010099218**

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

**12.05.2016**

73 Titular/es:

**MORISHITA JINTAN CO., LTD. (100.0%)  
2-40, Tamatsukuri 1-chome Chuo-ku Osaka-shi  
Osaka 540-8566, JP**

72 Inventor/es:

**SHIRAKAWA, TOSHIRO;  
YAMAMOTO, SAKURA;  
KATAYAMA, TAKANE;  
WADA, JUN;  
KANO, YASUNOBU;  
ASADA, MASANORI y  
SHIMAMOTO, KOSUKE**

74 Agente/Representante:

**LAZCANO GAINZA, Jesús**

ES 2 569 659 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**

Gen que expresa una proteína de fusión presentada en la superficie de bifidobacterium

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a una técnica para expresar y presentar una proteína o un péptido en la superficie de una bifidobacterium y una nueva vacuna producida a partir de una bifidobacterium utilizando esta técnica.

Antecedentes de la técnica

10 Una membrana celular es una biomembrana que separa el interior y el exterior de una célula. Muchas proteínas de membrana que tienen una función de proporcionar información celular o una función de transporte de una sustancia dentro y fuera de la célula están presentes en la superficie de la membrana celular. En los últimos años, se ha encontrado que las proteínas de membrana están jugando un papel importante en la inmunidad, y que las proteínas de la membrana de la superficie celular están dirigidas en las reacciones antígeno-anticuerpo. Por lo tanto, se propone un concepto que un antígeno específico debe ser fusionado con una proteína de membrana y presentada en la superficie de una célula microbiana para ser utilizado como una vacuna oral para inducir artificialmente una reacción antígeno-anticuerpo. En la actualidad, sin embargo, ningún ejemplo de tal uso se ha informado en la práctica, y sólo unos pocos ejemplos de aplicación se han descrito en trabajos de investigación. Por ejemplo, una proteína de enzima, tal como la sintetasa de ácido poli- $\gamma$ -glutámico, presentada en la superficie celular de un microorganismo huésped utilizando un vector que incluye un gen que codifica un sitio de unión a membrana (Documento de Patente 1). Sin embargo, sólo las bacterias lácticas, levaduras y *Escherichia coli* se han reportado como huéspedes.

20 Los microorganismos que pertenecen al género *Bifidobacterium* (estas bacterias se denominan colectivamente como "bifidobacterias") son bacterias nativas que están presentes en la parte inferior del intestino delgado o en el intestino grueso de los seres humanos y otros animales. Como las bifidobacterias son bacterias Gram-positivas anaerobias estrictas, las bifidobacterias crecen en medios de cultivo altamente selectivos (las bacterias aerobias no crecen), tienen alta afinidad por los organismos (predominante en los intestinos de los niños y también abundantes en los intestinos de los adultos), y no tienen endotoxinas a diferencia de las bacterias Gram-negativas (altamente seguras). De acuerdo con lo anterior, las bifidobacterias están generalmente reconocidos como seguras (GRAS). Como algunos informes muestran que *bifidobacterium longum* se une al moco que comprende mucinas, que cubre el tracto intestinal, se cree que las bifidobacterias son más adhesivas a la pared intestinal que otras bacterias en los intestinos.

Aunque las bifidobacterias atraen mucha atención como se describe anteriormente, aún no se han desarrollado los sistemas de expresión para presentar las proteínas en la superficie celular de las bifidobacterias.

30 Documentos de la técnica anterior

Documentos de Patentes

Documento de Patente 1: Publicación Nacional Japonesa No 2005-500054

Documento de Patente 2: Publicación de Patente Japonesa No. 3642755

Documentos no de Patente

35 Documento No Patente 1: Suzuki R. et al., J. Biol. Chem., 2008, vol. 283, p. 13165

Documento No Patente 2: McClelland M. et al., Nature, 2001, vol. 413, p. 852

Documento No Patente 3: Heidelberg et al., Nature, 2000, vol. 406, p. 477

Documento No Patente 4: Tominaga A. et al., Genes Genet. Syst., 2001, vol. 76, p. 111

Documento No Patente 5: Wada J. et al., Acta Crystallographica Section F., 2007, vol. F63, p. 751

40 Documento No Patente 6: Takata et al. Journal of Gene Medicine, 2006, vol. 8, no. 11. Takata et al. se refiere al uso de *bifidobacterium animalis* modificados genéticamente que expresa el gen de flagelina de salmonella para la inmunización de la mucosa de ratones. La flagelina de salmonella en la bifidobacterium modificado genéticamente se expresa a partir de un promotor similar a la histona en un vector lanzadera, plásmido de *Escherichia coli-bifidobacterium*.

Resumen de la invención

Problemas a resolver por la invención

Un objeto de la presente invención es proporcionar un medio de expresión y presentar una proteína o un péptido en la superficie celular de una bifidobacterium.

Medios para resolver los problemas

- 5 Como una proteína de membrana generalmente forma una estructura tridimensional sólo en la membrana celular, fue difícil de analizar la estructura tridimensional como una sola proteína y para presentar intencionalmente las proteínas de fusión que incluyen tales proteínas de la membrana en la superficie. En los últimos años, sin embargo, se analizó la estructura tridimensional de la proteína de membrana de unión del sustrato GNB/LNB (en lo sucesivo, denominado como GL-BP) presente en la membrana celular de las bifidobacterias (Documento No Patente 1). Los inventores de la
- 10 presente invención prestaron atención a GL-BP y llevaron a cabo diversas investigaciones sobre el uso de la presentación en superficie de proteínas diana. Como resultado, proporcionaron con éxito un medio de expresión y que presenta una proteína en la membrana celular de una bifidobacterium.
- 15 La presente invención proporciona un gen para la expresión de una proteína o péptido diana sobre una superficie de una bifidobacterium, en donde el gen codifica una proteína de fusión de proteína de membrana de unión de sustrato GNB/LNB de bifidobacterium y la proteína o péptido diana, que se unen en este orden desde el terminal-N.
- En una realización, la proteína o el péptido diana mencionados anteriormente es una proteína antigénica o un péptido antigénico.
- 20 En una realización adicional, la proteína o el péptido antigénico mencionados anteriormente es una flagelina derivada de salmonella, y en otra realización, la proteína o el péptido antigénico mencionados anteriormente es una proteína M2 de un virus de la gripe.
- En una realización, el gen mencionado anteriormente para la expresión de una proteína o péptido diana en una superficie de una bifidobacterium comprende un gen que codifica una proteína que tiene una función de adyuvante entre el gen mencionado anteriormente que codifica una proteína de membrana de unión de sustrato GNB/LNB y el gen mencionado anteriormente que codifica una proteína o péptido diana.
- 25 En una realización, la proteína mencionada anteriormente que tiene una función de adyuvante es una flagelina.
- La presente invención también proporciona un plásmido para la expresión génica, que comprende uno cualquiera de los genes mencionados anteriormente para la expresión de una proteína o péptido diana sobre una superficie de una bifidobacterium en una forma expresable.
- 30 Además, la presente invención proporciona una bifidobacterium transformada, que alberga el plásmido mencionado anteriormente y presenta una proteína o péptido diana en una superficie celular.
- Además, la presente invención proporciona una bifidobacterium transformada, que comprende en un genoma uno cualquiera del gen mencionado anteriormente para la expresión de una proteína o péptido diana sobre una superficie de una bifidobacterium en una forma expresable y que presenta la proteína o el péptido diana mencionados anteriormente en una superficie celular.
- 35 En una realización, la proteína o el péptido diana mencionados anteriormente es una flagelina derivada de salmonella.
- En una realización, la proteína o el péptido diana mencionados anteriormente es una proteína M2 de un virus de la gripe.
- En una realización, la bifidobacterium transformada mencionada anteriormente, además presenta una proteína que tiene una función de adyuvante en una superficie.
- 40 En una realización adicional, la proteína mencionada anteriormente que tiene una función de adyuvante es una flagelina.
- En una realización, la proteína o el péptido diana mencionados anteriormente es una proteína antigénica o un péptido antigénico o una proteína que tiene una función de adyuvante.
- 45 La presente invención también proporciona una vacuna oral contra la infección por salmonella, que comprende una bifidobacterium transformada que presenta una flagelina derivada de la salmonella en una superficie del mismo.

La presente invención también proporciona una vacuna contra la gripe oral, que comprende una bifidobacterium transformada que presenta una proteína M2 de un virus de la gripe en una superficie del mismo.

Efectos de la Invención

5 De acuerdo con la presente invención, una proteína o péptido diana se puede expresar y presentar en la superficie celular de una bifidobacterium. Por ejemplo, presentando una proteína antigénica o un péptido antigénico de un microorganismo, un virus, un protozoo, un cáncer, o similares en la superficie de una bifidobacterium, la bifidobacterium se puede utilizar como una vacuna oral o nasal que transporta la proteína antigénica a la membrana mucosa del intestino delgado o de la nariz como un portador e induce una reacción de anticuerpos con el antígeno presentado en la membrana mucosa.

10 Breve descripción de los dibujos

[Figura 1] La figura 1 es una vista esquemática que muestra un gen fusionado en el cual el gen de flagelina (FliC) se une en dirección 3' del gen de GL-BP.

15 [Figura 2] La figura 2(a) es una micrografía de fluorescencia que muestra una bifidobacterium transformada (presentación en la superficie GL-BP-FliC) obtenida en el Ejemplo 1. La figura 2(b) es una micrografía de fluorescencia que muestra una bifidobacterium sin tratar (no se presenta en la superficie GL-BPFliC).

[Figura 3] La figura 3 es una fotografía que muestra la transferencia Western de una solución de proteína de una bifidobacterium transformada (presentación en la superficie GL-BP-FliC) obtenida en el Ejemplo 1.

[Figura 4] La figura 4 es un gráfico que muestra los cambios con el tiempo en los niveles de IgA anti-flagelina en soluciones de heces de ratones dosificados por vía oral con una bifidobacterium.

20 [Figura 5] Las figuras 5(a), 5(b), y 5(c) son gráficos que muestran los cambios con el tiempo en los niveles de IgA de anti-flagelina, niveles de IgG de anti-flagelina, y los niveles de IgM de anti-flagelina, respectivamente, en suero de los ratones dosificados por vía oral con una bifidobacterium.

[Figura 6] La figura 6 es un gráfico que muestra los cambios con el tiempo en la tasa de supervivencia de los ratones dosificados por vía oral con una dosis letal de *Salmonella typhimurium*.

25 [Figura 7] La figura 7 es una vista transversal esquemática de una formulación de cápsula sin costuras de tres capas.

Modo de llevar a cabo la invención

(Bifidobacterias)

30 En la presente invención, "bifidobacterias" se refieren a los microorganismos que pertenecen al género *bifidobacterium*. Ejemplos de la bifidobacteria incluyen *bifidobacterium adolescentis*, *B. angulatum*, *B. animalis* subsp. *animalis*, *B. animalis* subsp. *lactis*, *B. asteroides*, *B. bifidum*, *B. boum*, *B. breve*, *B. catenulatum*, *B. choerinum*, *B. coryneforme*, *B. cuniculi*, *B. denticolens*, *B. dentium*, *B. gallicum*, *B. gallinarum*, *B. globosum*; *B. indium*, *B. infantis*, *B. inopinatum*, *B. lactis*, *B. longum*, *B. magnum*, *B. merycicum*, *B. minimum*, *B. parvulorum*, *B. pseudocatenulatum*, *B. pseudolongum* subsp. *globosum*, *B. pseudolongum* subsp. *pseudolongum*, *B. pullorum*, *B. ruminale*, *B. ruminantium*, *B. saeculare*, *B. scardovii*, *B. subtile*, *B. suis*, *B. thermacidophilum*, y *B. thermophilum*.

35 De éstos, se utilizan preferiblemente *bifidobacterium adolescentis*, *B. animalis* subsp. *animalis*, *B. animalis* subsp. *lactis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. lactis*, *B. longum*, and *B. pseudolongum* subsp. *pseudolongum*.

Por otra parte, se pueden utilizar cepas resistentes o cepas mutantes de estas bifidobacterias. Ambas cepas bacterianas están comercialmente disponibles o fácilmente disponibles a partir de depósitos. Ejemplos de las cepas bacterianas incluyen *B. longum* JCM1217 (ATCC15707) y *B. bifidum* ATCC11863.

40 (Proteína de membrana de unión de sustrato GNB/LNB)

45 La proteína de membrana de unión de sustrato GNB/LNB (GL-BP) es una proteína de membrana que pertenecen a la familia de proteínas de casete de unión de ATP (ABC), que transporta lacto-N-biose (i.e., N-acetil-3-O- (β-D-galactopiranosil) -D-glucosamina) y galacto-N-biose (i.e., N-acetil-3-O- (β-D-galactopiranosil) -D-galactosamina) de una bifidobacterium. Las proteínas ABC son importantes proteínas de la membrana que transportan activamente sustancias específicas en las membranas celulares de todos los organismos que utilizan una energía llamada trifosfato de adenosina (ATP), y diversas proteínas ABC están presentes en las membranas celulares. Por lo tanto, si se usa un

promotor apropiado, GL-BP, que es una proteína ABC, se expresa de forma ubicua en las bacterias que pertenecen al género *bifidobacterium* (bifidobacterias), que tienen una función celular para expresar GL-BP en la superficie del mismo. Por ejemplo, GL-BP derivada de la cepa *bifidobacterium longum* JCM1217 (ATCC15707) tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 en el listado de secuencias.

- 5 La estructura de GL-BP no se limita a la estructura de origen natural GL-BP, y los aminoácidos que constituyen el GL-BP puede incluir una o más de sustituciones, inserciones o deleciones, siempre y cuando la GL-BP tenga la capacidad de ser expresada en la superficie celular de una bifidobacterium.

(Proteína o péptido diana)

- 10 La proteína o péptido diana que se presentará en la superficie de una bifidobacterium no está particularmente limitada. La proteína o péptido diana es preferiblemente una proteína o un péptido que es por naturaleza no localizada en la superficie celular, pero está dispuesta en la superficie celular para la presentación en la superficie celular. Ejemplos de la proteína o péptido diana incluyen proteínas o péptidos antigénicos y enzimas. La estructura de la proteína o péptido diana no se limita a la estructura de una proteína o péptido de origen natural, y aminoácidos que constituyen la proteína o el péptido puede incluir una o más de las sustituciones, deleciones, o adiciones, siempre que la proteína o el péptido logren una función diana.

- 15 Los ejemplos de la proteína o péptido antigénico incluyen proteínas antigénicas o péptidos antigénicos derivados de bacterias, virus, protozoos y similares. Ejemplos de bacterias incluyen bacterias que pueden causar infecciones bacterianas, tales como las bacterias de salmonella, *Salmonella typhimurium*, bacterias que causan disentería, *Diplococcus pneumoniae* y bacterias de la tuberculosis. Los ejemplos de virus incluyen diversos tipos de virus de la gripe, virus del herpes, virus SARS, virus del SIDA, y diversos virus de la hepatitis. Los ejemplos de protozoos incluyen malaria, tricomonas, y toxoplasma. Ejemplos más específicos de la proteína o péptido antigénico incluyen proteínas de flagelina de bacterias de salmonella y de *Salmonella typhimurium*, la proteína M2 de un virus de la gripe, la proteína antígeno de serina de repetición (SERA) de protozoos malaria, la proteína GBS80 del grupo B *streptococcus*, que causa infección por el grupo B *streptococcus* en los recién nacidos, la proteína de envoltura pg40 de *Porphyromonas gingivalis*, que es una bacteria causante de la enfermedad periodontal, las proteínas de envoltura gp120 o gp160 del VIH, las proteínas E6, E7 o L2 de virus del papiloma humano, que causan cáncer endocervical, la glicoproteína de la envoltura E2/NS1 del virus de la hepatitis C (HCV), la proteína no estructural NS1 o la proteína DI, DII y DIII de virus que pertenecen al género *Flavivirus*, que causan la encefalitis japonesa, la proteína beta amiloide (A $\beta$ ), que causa la enfermedad de Alzheimer, la proteína gp53 de virus que pertenecen al género *Pestivirus*, que causa diarrea viral bovina viral (BVDV), la proteína de envoltura gp55 del virus del cólera del cerdo, la proteína VP2 de la cápside de parvovirus canino y parvovirus que causa la panleucopenia felina, y la proteína de envoltura VP28 del virus del síndrome de punto blanco, lo que provoca la muerte de camarones infectados.

- 20 Los ejemplos de enzimas incluyen glucoamilasa,  $\alpha$ -amilasa,  $\beta$ -amilasa, isoamilasa, endoglucanasa, exocelobiohidrolasa,  $\beta$ -glucosidasa, carboximetilcelulosa, glutamato deshidrogenasa, glutamina sintetasa, lipasa, lisina descarboxilasa, arabinofuranosidasa, peroxidasa y fosfatasa alcalina.

- 25 Los ejemplos de otras proteínas o péptidos diana incluyen proteínas fluorescentes (GFP, SIRIUS, BFP, CFP, YFP, RFP, Venus, DsRed, mCherry, mKO, mCerulean, etc.), proteínas de bioluminiscencia (luciferasa de luciérnaga, aequorina (*Aequorea victoria*), luciferasa de Renilla, luciferase de luciérnaga de mar etc.), los receptores de aril hidrocarburos utilizados para la detección de sustancias tóxicas, etiqueta His, proteína A, y los anticuerpos contra las proteínas expresadas específicamente en pacientes con cáncer o enfermedades específicas (por ejemplo, enfermedad de Alzheimer).

(Proteínas que tienen la función de adyuvante)

Como proteínas que tienen una función de adyuvante, proteínas flagelina, que constituyen un flagelo de un microorganismo, se sabe que inducen altos niveles de anticuerpos.

- 45 Un flagelo es una estructura larga que sobresale de la superficie celular y juega un papel importante en la motilidad y la invasión en una célula huésped. El flagelo se compone de una proteína llamada flagelina (en adelante puede ser denominada como FlIC). Por ejemplo, la proteína flagelina antigénica de *Salmonella typhimurium* (*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium) se describe en el Documento No de Patente 2. La proteína flagelina antigénica de una bacteria del cólera (*Vibrio cholerae*) se describe en el Documento No de Patente 3. La proteína flagelina antigénica de una bacteria que causa disentería (*Shigella dysenteriae*) se describe en el Documento No Patente 4. Por ejemplo, la flagelina derivada de *Salmonella typhimurium* tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 4 se muestra en el listado de secuencias. La proteína flagelina puede tener una o más de las sustituciones, deleciones o adiciones en los aminoácidos constituyentes, siempre que la proteína tenga una función de adyuvante.

(Proteína de fusión presentada en la superficie de bifidobacterium)

En la presente invención, una proteína o un péptido expresado y presentado en la superficie de una bifidobacterium se expresa como una proteína de fusión con GL-BP. En esta proteína de fusión, desde la GL-BP terminal N y la proteína o péptido diana están unidos en este orden. Si es necesario, una proteína que tiene una función de adyuvante se puede incluir entre GL-BP y la proteína o péptido diana.

(Preparación de la bifidobacterium transformada)

De ahora en adelante, la preparación de una bifidobacterium transformada en el cual se expresa una proteína o péptido diana y se presenta en la superficie de bifidobacterium como una proteína de fusión se describe en el orden del procedimiento.

#### 1. Obtención de los genes que codifican para las proteínas respectivas

El gen que codifica la GL-BP, el gen que codifica una proteína o péptido diana y el gen que codifica FliC se puede obtener basándose en la información conocida de la secuencia del gen o secuencia de aminoácidos. Por ejemplo, estos genes se pueden obtener por amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando ADN genómico o ADNc preparado a partir de cualquier bifidobacterium como una plantilla y un par de cebadores preparados basándose en la información de la secuencia del gen estructural de GL-BP de la bifidobacterium. En general, como un aminoácido permite más de un código genético, el gen puede tener una secuencia base que difiere de una secuencia base conocida o unas secuencias base basándose en una secuencia de aminoácidos conocida.

Por ejemplo, el gen que codifica la GL-BP de *bifidobacterium longum* se puede obtener de la secuencia del gen estructural de la GL-BP de *B. longum* descrita en el Documento No Patente 5. Por ejemplo, el gen se puede obtener por amplificación a través de PCR utilizando ADN cromosómico o ADNc de *B. longum* como una plantilla y un par de cebadores preparados basándose en la información de la secuencia.

El gen que codifica una proteína o péptido diana se puede obtener basándose en la información conocida de la secuencia del gen o información de la secuencia de aminoácidos. Por ejemplo, el gen que codifica la glucoamilasa derivada de *Rhizopus oryzae* se puede obtener por amplificación mediante PCR utilizando ADN genómico o ADNc preparado a partir de *R. oryzae* como una plantilla y un par de cebadores preparados basándose en la información de la secuencia del gen estructural de la glucoamilasa de *R. oryzae*.

El gen que codifica para FliC se puede obtener basándose en información conocida de la secuencia del gen o información de la secuencia de aminoácidos. El gen que codifica para FliC se puede obtener por amplificación mediante PCR utilizando ADN genómico o ADNc preparado a partir de, por ejemplo, una infección patógena de bacteria (por ejemplo, salmonella, cólera, o bacteria que causa disentería) como una plantilla y un par de cebadores preparados basándose en la información de la secuencia del gen estructural de FliC de la bacteria.

Más específicamente, el gen mencionado anteriormente que codifica cada proteína se puede obtener, por ejemplo, por un conocido método de síntesis química basándose en la información conocida de la secuencia base. Los ejemplos del método de síntesis química incluyen la síntesis química con un sintetizador de ADN utilizando fosoramidita. Además, el gen mencionado anteriormente también se puede obtener mediante la amplificación de ADN a través de PCR mediante la preparación de cebadores basados en las secuencias base en el extremo 5' y el extremo 3' de una secuencia base para ser obtenida y el uso de ADNc sintetizado a partir de ARNm contenida en diversos tejidos o células del organismo fuente o ADNc seleccionado de una biblioteca de ADNc como una plantilla. Además, el gen mencionado anteriormente se puede obtener mediante hibridación de colonias o hibridación de placas de ADNc sintetizado a partir de ARNm contenido en diversos tejidos o células del organismo fuente o de la biblioteca de ADNc, utilizando un ADN de longitud completa o parcial o polinucleótido sintetizado químicamente basándose en información conocida de la secuencia base como una sonda.

Además, el gen mencionado anteriormente que codifica cada proteína, también se puede obtener fácilmente basándose en la información conocida de la secuencia de aminoácido. Ejemplos de métodos para obtener el gen mencionado anteriormente que codifica cada proteína basándose en la información conocida de la secuencia de aminoácidos incluyen la amplificación de un gen diana de la biblioteca de ADNc mencionada anteriormente o similar a través de PCR utilizando cebadores de ADN sintetizados que tienen una secuencia base parcial del gen que codifica una secuencia de aminoácidos conocida, o la selección por hibridación de un gen incorporado en un vector apropiado con un fragmento de ADN marcado o ADN sintetizado (sonda) que codifica una parte o una longitud completa del gen mencionado anteriormente que codifica cada proteína.

El gen mencionado anteriormente que codifica cada proteína puede ser un ADN que se puede hibridar con un gen obtenido como se describe anteriormente en condiciones rigurosas. El ADN que se puede hibridar en condiciones

rigurosas significa un ADN que se puede obtener mediante hibridación de colonias, hibridación en placa, hibridación por transferencia Southern, o similares utilizando el ADN mencionado anteriormente como sonda. Los ejemplos específicos de tales ADN incluyen un ADN que puede ser identificado mediante la realización de la hibridación a aproximadamente 65 °C en presencia de aproximadamente cloruro de sodio 0.7 a 1.0 M utilizando un filtro en el cual se inmoviliza un ADN derivado de una colonia o una placa y después de lavar el filtro con una solución de SSC que tiene una concentración de aproximadamente 0.1 a 2 veces (una solución SSC con una concentración de 1 vez se compone de cloruro de sodio 150 mM y citrato de sodio 15 mM) a aproximadamente 65°C. Los ejemplos específicos del ADN que se puede hibridar mencionado anteriormente incluyen un ADN que tiene una homología de aproximadamente 80% o mayor, preferiblemente un ADN que tiene una homología de aproximadamente 90% o mayor, más preferiblemente un ADN que tiene una homología de aproximadamente 95% o mayor con la secuencia base del gen que codifica cada proteína obtenida basándose en la información conocida de la secuencia de base mencionado anteriormente o la información de la secuencia de aminoácidos.

## 2. Preparación de un vector para la transformación de bifidobacterium

Se prepara un ADN recombinante que incluye el gen que codifica cada proteína, preparado como se describe en el anterior 1. Un ADN recombinante puede ser un vector de expresión o un vector de incorporación de cromosoma (por ejemplo, un vector recombinante homólogo). Un plásmido utilizado para la preparación de tales vectores no está particularmente limitado siempre que el plásmido puede ser expresado en una bifidobacterium. Ejemplos de plásmidos derivados de bifidobacterias que se pueden utilizar incluyen pTB6, pBL67, pBL78, pNAL8H, pNAL8M, pNAC1, pBC1, pMB1, y pGBL8b. Los plásmidos del compuesto de estos plásmidos y los plásmidos derivados de *Escherichia coli* también se pueden utilizar, y los ejemplos de los mismos incluyen pBLES100, pKKT427, y pRM2.

Entre los plásmidos mencionados anteriormente, los plásmidos compuestos sintetizados a partir de plásmidos de *B. longum* y plásmidos de *E. coli* se prefieren desde el punto de vista de la expresión estable y preparación de ADN fácil para la preparación de una cepa transformante.

Los vectores de expresión tienen preferiblemente un marcador seleccionable tal como resistencia a antibióticos o auxotrofia de aminoácidos desde el punto de vista de la selección de una cepa transformante.

Los vectores de expresión incluyen preferiblemente una secuencia reguladora para la expresión de la proteína de fusión de GL-BP y una proteína o péptido diana, o para los vectores que es ventajoso para la expresión. Ejemplos de secuencias reguladoras incluyen secuencias promotoras, secuencias líder, secuencias de propéptido, secuencias potenciadoras, secuencias señal, y secuencias de terminación. El origen de estas secuencias reguladoras no está particularmente limitado siempre y cuando los vectores se expresen en una bifidobacterium.

Las secuencias promotoras no están particularmente limitadas, siempre y cuando los vectores se expresen en una bifidobacterium. Desde el punto de vista de la eficacia de la expresión, preferiblemente se utilizan la secuencia promotora de una proteína similar a la histona (HU), promotor de la LDH, y similares de *B. longum*.

Los vectores de expresión tienen preferiblemente una secuencia de terminación desde el punto de vista de la eficiencia de expresión mejorada. La secuencia de terminación del gen HU mencionado anteriormente se usa preferiblemente como una secuencia de terminación.

Además, una secuencia líder, una secuencia de propéptido, una secuencia potenciadora, una secuencia señal, y similares se pueden disponer como sea necesario. Además, un gen que codifica un enlazante que tiene una longitud apropiada puede ser colocado entre el gen que codifica la GL-BP y el gen que codifica una proteína o péptido diana.

Por lo tanto, un vector de clonación se prepara mediante la introducción de secuencias reguladoras tales como una secuencia promotora y una secuencia de terminación y un gen marcador seleccionable en el plásmido mencionado anteriormente según sea necesario. Ejemplos del marcador seleccionable incluyen marcadores de resistencia a antibióticos tales como la espectinomicina (SPr), ampicilina (Ampr), tetraciclina (TETr), kanamicina (KMr), estreptomycin (STr), y neomicina (NEOr); marcadores fluorescentes tales como la proteína fluorescente verde (GFP) y proteína fluorescente roja (REP); y enzimas tales como LacZ.

Un vector de clonación tiene preferiblemente, por ejemplo, un enlazante que tiene un sitio de multiclonación en dirección 3' del promotor. Mediante el uso de dicho enlazante, el gen (ADN) que codifica para la proteína de fusión mencionada anteriormente se incorpora en dirección 3' del promotor de modo que la proteína de fusión se puede expresar en marco. Ejemplos representativos de un plásmido para un vector de clonación incluyen pBLES100 y pBLEM100 (consultar el Documento de Patente 2).

Un vector que expresa una proteína de fusión en la superficie de una bifidobacterium se puede obtener mediante la incorporación en el marco de la secuencia promotora HU, el gen que codifica GL-BP, y el gen que codifica una proteína

o péptido diana obtenido como se describe anteriormente en el plásmido pBLES100. Se utiliza un vector de expresión como se obtiene por dicho método para la transformación de una bifidobacterium.

### 3. Preparación de bifidobacterium transformada que expresa la proteína de fusión

5 Un ADN recombinante, por ejemplo, un vector de expresión se introduce en una bifidobacterium huésped. Cualquier método de transformación conocido se puede utilizar. Los ejemplos específicos incluyen electroporación, método de fosfato de calcio, lipofección, método de ion de calcio, protoplastos, microinyección, y bombardeo de partículas. Se usa preferiblemente la electroporación. La electroporación se puede realizar a 0.5 a 20 kV/cm durante 0.5  $\mu$ seg a 10 mseg, más preferiblemente de 2 a 10 kV/cm durante 50  $\mu$ seg a 5 mseg.

10 Una cepa transformada se selecciona con un marcador seleccionable contenido en el vector de expresión de proteína de fusión. Un medio para el cultivo de la cepa transformada puede ser cualquier medio apropiado para el microorganismo huésped. Ejemplos del medio incluyen medio de agar de hígado sangre (BL), medio de agar de Man-Rogosa-Sharpe (MRS), medio de agar medio anaerobio Gifu (GAM), medio de agar GAM mejorado (TGAM), medio de agar Briggs, y medio de agar de levadura glucosa peptona (YGP). Para la presión de selección, se pueden adicionar antibióticos al medio, o se pueden eliminar o adicionar aminoácidos al medio, en función del marcador seleccionable.

15 El cultivo se lleva a cabo preferiblemente bajo condiciones anaerobias en las que las bifidobacterias se pueden cultivar. El crecimiento de bacterias aeróbicas se puede prevenir mediante la realización del cultivo bajo una condición anaeróbica. Un ejemplo de condiciones anaeróbicas es la condición en un recipiente sellado en la que suficiente anaerobicidad se puede mantener para crecer bifidobacterias, por ejemplo, condiciones que se pueden lograr en una cámara anaeróbica o una caja anaeróbica. Es suficiente que la temperatura de cultivo sea una temperatura a la que se pueden cultivar las bifidobacterias. La temperatura de cultivo es generalmente de 4°C a 45°C, preferiblemente de 15°C a 40°C, más preferiblemente de 24°C a 37°C.

Una bifidobacterium transformada se puede preparar en la que no sólo un vector de presentación en la superficie de una proteína de fusión de GL-BP y una proteína o péptido diana, sino también un vector de presentación en la superficie de una proteína de fusión de GL-BP y una proteína que tiene una función de adyuvante se introducen simultáneamente.

25 La introducción de un gen que codifica una proteína de fusión se puede confirmar mediante la extracción de un plásmido a partir de una bifidobacterium transformada, tratando el plásmido con enzimas de restricción, y luego realizando la electroforesis o secuenciación directa de la secuencia del fragmento tratado con enzimas de restricción.

30 La expresión de la proteína de fusión de una bifidobacterium transformada obtenida se puede confirmar, por ejemplo, utilizando la transferencia de Western. En primer lugar, se lisa la bifidobacterium transformada, por ejemplo, utilizando un surfactante no iónico, incluyendo éster de polioxietileno sorbitán (Tween (marca registrada) 20, 40, 60, 65, 80, 85), y éster de sorbitán (Span (marca registrada) 20, 40, 60, 65, 80, 85), y similares; después se diluyó con solución reguladora de fosfato, solución reguladora de citrato, solución reguladora de borato, tris (hidroximetil) aminometano (Tris) solución reguladora - clorhidrato, o similares; después se sometieron a electroforesis con gel de sodio dodecil sulfato-poliacrilamida (SDS-PAGE), gel de tris-glicina-poliacrilamida, o similares; después se transfiere a membrana de nitrocelulosa, membrana de fluoruro de polivinilideno (PVF), o similares; y luego se hace reaccionar con un anticuerpo (inmunoglobulina G (IgG)) contra la proteína o péptido diana, y se hace reaccionar adicionalmente con un anticuerpo secundario con un marcador fluorescente. De esta manera, se puede confirmar la expresión de la proteína de fusión.

40 En particular, la presentación de una proteína o péptido diana en la superficie de la bifidobacterium se puede confirmar fácilmente mediante la realización en la bifidobacterium transformada de un método de inmunoanticuerpo utilizando un anticuerpo contra la proteína o péptido diana y un anticuerpo anti-IgG marcado con FITC. Cuando se expresa una proteína de fusión de GL-BP, una proteína que tiene una función de adyuvante, y una proteína o péptido diana, ya que la proteína que tiene una función de adyuvante y la proteína o péptido diana presentadas en la superficie de bifidobacterium, el anticuerpo utilizado para la confirmación puede ser un anticuerpo contra cualquier proteína (o péptido).

45 La bifidobacterium transformada en la cual la presentación en superficie de la proteína o péptido diana se ha confirmado se pueden cultivar, recuperar, y utilizar directamente para la producción de una formulación, utilizando cualquiera de los métodos comúnmente utilizados por los expertos en el arte. Alternativamente, la bifidobacterium transformada se puede usar en una forma seca. La bifidobacterium transformada se puede secar por el tratamiento en el cual un tratamiento a baja temperatura, tal como liofilización o secado a baja temperatura se realiza de modo que la bifidobacterium puede crecer cuando se expone a condiciones de crecimiento tales como las de en un entorno intestinal o un medio.

50 La bifidobacterium transformada se puede someter a un post-tratamiento realizado de acuerdo con un método conocido. Por ejemplo, la purificación en bruto se puede realizar por centrifugación o similares. Además, después de la purificación en bruto, la bifidobacterium transformada se puede disolver o suspender en un solvente utilizado convencionalmente en

este campo, tal como solución salina fisiológica, solución salina regulada con fosfato (PBS), o solución de Ringer lactato, si se desea. Además, la liofilización o secado por pulverización se puede realizar para polvo y granular la bifidobacterium transformada, si se desea.

(Formulación que contiene bifidobacterium transformada)

5 Cuando se administra la proteína o péptido diana presentada en la superficie preferiblemente para el tratamiento o prevención de una enfermedad, la bifidobacterium transformada de la presente invención se administra en cualquier forma de formulación. La vía de administración no está particularmente limitada, y los ejemplos de las rutas de administración incluyen administración oral y administración parenteral. Cuando la proteína o péptido diana es una proteína o péptido antigénico, se prefiere la administración oral o nasal.

10 Los ejemplos de una formulación apropiada para la administración oral incluyen comprimidos, gránulos, gránulos finos, polvo, jarabe, solución, cápsula, y suspensión. Ejemplos de una formulación apropiada para la administración parenteral incluyen inyección, infusión por goteo, inhalante, aerosol, supositorio, agente de absorción percutánea, y agente de absorción transmucosal.

15 Para la producción de una formulación líquida para la administración oral, por ejemplo, pueden ser utilizados aditivos de formulación que incluyen sacáridos tales como agua, sacarosa, sorbitol, y fructosa; glicoles tales como polietilenglicol y propilenglicol; aceites tales como aceite de sésamo, aceite de oliva, y aceite de soja; y conservantes tales como ésteres del ácido p-hidroxibenzoico. Además, por ejemplo, excipientes tales como lactosa, glucosa, sacarosa y manitol; agentes de desintegración tales como almidón y alginato de sodio; lubricantes tales como estearato de magnesio y talco; aglutinantes tales como alcohol polivinílico, hidroxipropil celulosa, y gelatina; surfactantes tales como ésteres de ácidos grasos; y plastificantes tales como glicerina se pueden utilizar para la producción de una formulación sólida tal como

20 cápsula, comprimido, polvo o gránulo.

Entre las formulaciones para administración parenteral, las formulaciones para la administración intravascular, tales como inyección e infusión por goteo se pueden preparar utilizando preferiblemente un vehículo acuoso que es isotónico con la sangre humana. Por ejemplo, las inyecciones se pueden preparar como una solución, suspensión o dispersión

25 utilizando un vehículo acuoso seleccionado de una solución salina, una solución de glucosa, o una mezcla de una solución salina y una solución de glucosa, junto con un agente auxiliar apropiado de acuerdo con un método habitual. Los supositorios para la administración enteral se pueden preparar utilizando un portador tal como manteca de cacao, aceite hidrogenado y grasa, o un ácido graso hidrogenado.

Entre las formulaciones para administración parenteral, los aerosoles se pueden preparar utilizando un portador que no estimula las membranas mucosas de la cavidad oral humana y el tracto respiratorio y puede promover la absorción por dispersión de una bifidobacterium transformada, un ingrediente activo, en forma de partículas finas. Ejemplos de dicho portador incluyen lactosa y glicerina. Dependiendo de las propiedades de una bifidobacterium transformada y un portador para ser utilizado, una formulación se puede preparar en forma de un aerosol, polvo seco, o similares. Uno o

30 más aditivos de formulación seleccionados de, por ejemplo, diluyentes, saborizantes, conservantes, excipientes, agentes disgregantes, lubricantes, aglutinantes, surfactantes, plastificantes, y similares se pueden utilizar para la producción de una formulación para la administración parenteral.

35

(Vacuna oral)

40 Cuando la proteína o péptido diana es una proteína antigénica, una bifidobacterium transformada es preferible como una vacuna oral. Por ejemplo, cuando la proteína antigénica es una flagelina, la flagelina es reconocida en la pared del tracto intestinal como un antígeno, y por lo tanto se produce un anticuerpo. Por lo tanto, se produce una vacuna oral eficaz para la infección con un microorganismo que tiene flagelinas.

Por ejemplo, cuando una formulación de cápsula resistente al ácido (formulación de cápsula sin costuras, formulación de cápsula blanda, o formulación de cápsula dura) descrita a continuación se administra por vía oral, la formulación pasa a través del estómago, que tiene un pH de 1 a 3, sin ser disuelta y llega a los intestinos donde se disuelve la formulación de cápsula. Después se disuelve la cápsula, una bifidobacterium transformada liberada de la formulación

45 crece en el medio entérico y muestra la proteína o péptido diana en la superficie del mismo.

(Producción de formulación de cápsula resistente a los ácidos que contiene la bifidobacterium transformada)

50 La vacuna oral de la presente invención es preferiblemente en forma de una formulación de cápsula. En la presente memoria, una cápsula que contiene el contenido se conoce como una "formulación de cápsula". La formulación de cápsulas en la presente invención se compone de una membrana de la cápsula y una bifidobacterium transformada que expresa una proteína o péptido diana en la superficie de la misma. Esta membrana de la cápsula es resistente a los ácidos. Una formulación de cápsula compuesta de una membrana de la cápsula resistente a los ácidos y una

bifidobacterium transformada que expresa una proteína o péptido diana en la superficie de los mismos pueden tener cualquier configuración y forma, y no se impide que la formulación de cápsula contenga otros componentes, siempre que la formulación de cápsula tenga una membrana de la cápsula resistente a los ácidos y una bifidobacterium transformada que expresa una proteína o péptido diana en la superficie de la misma como un contenido de cápsula. Por lo tanto, la bifidobacterium transformada que expresa una proteína o péptido diana en la superficie de la misma se encapsula con o envuelta en una membrana de la cápsula resistente a los ácidos (i.e., contenido en la región interna de una cápsula formada por la membrana resistente a los ácidos). En la presente memoria, esta formulación de cápsula también se conoce como una "formulación de cápsula resistente a los ácidos".

Con el fin de que la bifidobacterium transformada exprese una proteína o péptido diana en la superficie de la misma para funcionar como una vacuna oral, la bifidobacterium transformada debe pasar a través del estómago, alcanzar los intestinos, y crecer en los intestinos. Mientras tanto, el pH del estómago es de 1 a 3. La mayoría de las bifidobacterias ingeridas mueren por vía oral debido a este pH marcadamente bajo. En general, se dice que menos de la diezmilésima de una dosis de bifidobacterium alcanza los intestinos, mientras que se mantiene la capacidad de crecimiento. Por lo tanto, con el fin de que la bifidobacterium transformada utilizada en la presente invención sobreviva y alcance los intestinos humanos y crezcan en el intestino para expresar una proteína o péptido diana, es preferible que sea improbable que la bifidobacterium transformada sea afectada por el ácido gástrico.

Para este fin, la bifidobacterium transformada preferiblemente está incluida o encapsulada por una membrana de la cápsula resistente a los ácidos en la presente invención. Específicamente, se proporciona una formulación de cápsula en la que la bifidobacterium transformada está contenida dentro de la cápsula con una membrana resistente a los ácidos. La configuración, forma, y similares de la formulación en cápsulas no están particularmente limitadas, siempre y cuando la membrana sea resistente al ácido gástrico. Es decir, es deseable configurar la formulación de cápsula de modo que el ácido gástrico no entra en la cápsula o no se pone en contacto con la bifidobacterium transformada. La membrana de la cápsula puede ser una membrana que no se disuelve a pH 4 o menos, preferiblemente pH 1 a 3. Los métodos de encapsulación tampoco están particularmente limitados.

(Formulación de cápsula sin fisuras)

La cápsula para proporcionar la resistencia al ácido gástrico puede estar preferiblemente en la forma de una cápsula sin costuras. En este documento, "cápsula sin costuras" se refiere a un tipo de cápsula blanda en la que los contenidos son cubiertos por una membrana sin costuras. La cápsula sin costuras puede tener una estructura de múltiples capas que consta de dos o más capas, y preferiblemente tiene una estructura de múltiples capas que consta de tres o más capas. Por vía tópica, una capa más interna puede contener los contenidos (siendo la bifidobacterium transformada en el caso de la presente invención), y una capa externa (o la capa más externa) puede actuar como la membrana. Específicamente, la bifidobacterium transformada se encapsula con la membrana.

En lo sucesivo, se describirá la preparación de una formulación de cápsula sin costuras de tres capas. La figura 7 es una vista esquemática en sección transversal de una formulación de cápsula sin costuras de tres capas. Esta estructura de tres capas consiste en una capa más interna, una capa intermedia que cubre la capa más interna, y una capa externa que cubre la capa intermedia.

La capa más interna se compone de la bifidobacterium transformada y un solvente no acuoso o componente sólido para la suspensión o la mezcla de la bifidobacterium transformada (en lo sucesivo, cuyo componente que se conoce como una "sustancia de capa más interna"). No hay limitación particular sobre la sustancia de capa más interna. Ejemplos de los mismos incluyen diversas grasas y aceites, ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos de azúcares, hidrocarburos alifáticos, hidrocarburos aromáticos, éteres lineales, ésteres de ácidos grasos superiores, alcoholes superiores, y terpenos. Los ejemplos específicos de los mismos incluyen, pero no se limitan a, aceite de soja, aceite de sésamo, aceite de palma, aceite de almendra de palma, aceite de maíz, aceite de semilla de algodón, aceite de coco, aceite de colza, manteca de cacao, sebo de vaca, manteca de cerdo, aceite de caballo, aceite de ballena, grasa hidrogenada y aceites de estas grasas y aceites naturales que tienen un punto de fusión de 40°C o menos, margarina, manteca, ésteres de ácidos grasos de glicerina, ésteres de ácidos grasos de sacarosa, aceite de alcanfor, aceite de menta,  $\alpha$ -pineno, D-limoneno, y similares. Estas sustancias de capa más interna se pueden utilizar solos o en una combinación de dos o más.

Un material utilizado para la capa intermedia es, entre las sustancias de capa más interna mencionadas anteriormente, un material que tiene un punto de fusión de 20°C a 50°C y diferente de la sustancia de capa más interna, más preferiblemente un material que a temperatura ambiente está en un estado sólido. Como, en los ejemplos expuestos a continuación, aceite hidrogenado de almendra de palma que tiene un punto de fusión de 34°C y aceite hidrogenado de almendra de palma que tiene un punto de fusión de 43°C se utilizan como la sustancia de capa más interna y el material de la capa interior, respectivamente, la misma especie de la grasa y los aceites se pueden utilizar como la sustancia de capa más interna y el material de la capa interior, que se someten a hidrogenación con el fin de tener diferentes puntos de fusión. Esta capa intermedia puede actuar como la prevención de la permeación de agua y oxígeno y evitar el

contacto con el ácido gástrico. El material a ser seleccionado se puede determinar en consideración del período de almacenamiento de la cápsula y similares.

5 Un material utilizado para la capa externa (que es la capa más externa en el caso de una estructura que tiene tres o más capas) puede ser una mezcla de una proteína y un alcohol polivalente soluble en agua; una mezcla de una proteína, un alcohol polivalente soluble en agua, y un polisacárido; una mezcla de un polisacárido y un alcohol polivalente soluble en agua; o similares. Los ejemplos de la proteína incluyen gelatina y colágeno. Ejemplos del alcohol polivalente soluble en agua incluyen sorbitol, manitol, glicerina, propilenglicol, y polietilenglicol. Los ejemplos de polisacárido incluyen, agar, goma gellan, goma de xantano, goma de algarroba, pectina, alginato, carragenina, goma arábica, dextrina, dextrina modificada, almidón, almidón modificado, pululano, pectina, y la sal de carboximetilcelulosa.  
10 En el caso donde se usa pectina, alginato, goma de gelano, o carragenano, una sal de metal alcalino o una sal de metal alcalinotérreo se pueden adicionar según sea apropiado.

15 La formulación de cápsulas sin costura de tres capas se prepara utilizando cualquier técnica conocida por los expertos en el arte, tal como el método de goteo utilizando una boquilla triple descrito en la Patente Japonesa No. 1398836. En este método de goteo, la sustancia de capa más interna combinada con la bifidobacterium transformada (por ejemplo, las células liofilizadas de la bifidobacterium), que es preferiblemente una suspensión de la bifidobacterium transformada (preferiblemente, las células liofilizadas de la bifidobacterium) en un material solvente hidrófobo que es no fluido de 20 a 50°C, desde la boquilla más interna de la triple boquilla concéntrica, un material que forma la capa intermedia (por ejemplo, un líquido obtenido por la fusión de un material en forma de un sólido a temperatura ambiente) de la boquilla intermedia, y una solución de un material que forma la capa externa (membrana) de la boquilla más externa se expulsa  
20 simultáneamente, y se deja caer en un líquido portador (por ejemplo, aceite de maíz, aceite de colza, o similares), que fluye bajo enfriamiento, formando de este modo una cápsula de tres capas "sin costura" en la que la bifidobacterium transformada está contenida en la capa más interna. De acuerdo con lo anterior, la bifidobacterium transformada se encapsula con o envuelve en la membrana externa sin costuras.

25 A continuación, se seca la cápsula formada como se describe anteriormente. Por ejemplo, el secado se realiza por la ventilación a temperatura ambiente. Normalmente, la cápsula se seca, por ejemplo, en el aire de 5°C a 30°C. El tiempo de secado es preferiblemente de 2 a 12 horas. Como se describe en la Publicación de la Patente Revelada Japonesa No. 07-069867, una cápsula que se ha secado de ordinario como se describe anteriormente puede ser preferiblemente sometida además a un secado al vacío o secado por congelación al vacío. El grado de vacío se puede mantener de 0.5-0.02 torr. La cápsula puede ser congelada y se seca a -20°C o menos en el caso del secado por congelación al vacío.  
30 No hay limitación particular sobre el tiempo de secado al vacío o secado por congelación al vacío, pero el tiempo es por lo general de 5 a 60 horas, preferiblemente de 24 a 48 horas. Si el tiempo es de 5 horas o más corto, el secado es insuficiente y el agua presente en la cápsula puede afectar negativamente los contenidos.

35 En el caso de una cápsula obtenida utilizando el método que se describe en la Publicación de Patente Revelada Japonesa No. 07-069867, se elimina el agua suficiente de la cápsula mediante secado por congelación al vacío, y, por lo tanto, el valor de Aw puede ser 0.20 o menos, y la conductividad térmica puede ser 0.16 kcal/mh°C o menos. Por secado al vacío o secado por congelación al vacío, la cantidad de agua se reduce, naturalmente, mientras la cápsula está suficientemente seca y se vuelve porosa. Por lo tanto, la conductividad térmica es significativamente más baja que en el caso en que se lleva a cabo simplemente secado común.

40 El valor Aw no hace referencia a un contenido absoluto de agua presente en la muestra, pero a un valor determinado por el estado en el cual el agua está presente, es decir, los grados de libertad para el agua en la muestra. El valor Aw es indicador que indica un agua que puede afectar directamente el crecimiento de microorganismo o reacción química, y se mide utilizando un método de medición de actividad de agua de tipo de resistencia eléctrica (por ejemplo, Aw meter WA-360, Shibaura Electronics Co., Ltd.). La conductividad térmica se mide utilizando el método de Fitch o similares. El valor Aw es preferiblemente 0.20 o menos, y la conductividad térmica es preferiblemente de 0.02 hasta 0.08 kcal/mh°C.

45 Con el fin de proporcionar a la membrana de la cápsula de la formulación en cápsula sin costuras con resistencia a los ácidos, se forma una capa externa resistente a los ácidos, o la membrana (la capa más externa) de la cápsula sin costuras preparada es tratada de manera que sea resistente a los ácidos.

50 Los ejemplos del método para la formación de una capa externa resistente a los ácidos incluyen la adición de pectina, alginato, goma arábica, o similares en una cantidad de 0.01 a 20% en peso, preferiblemente de 0.1 a 10% en peso de gelatina, agar, carragenina, o similares, que tiene una capacidad de gelificación.

Los ejemplos del método para proporcionar la membrana (la capa más externa) de la cápsula sin costuras preparada con resistencia a los ácidos incluyen reticulación de la capa externa (la capa más externa) de la cápsula sin costuras y recubrimiento de la superficie de la cápsula sin costuras, que se puede llevar a cabo solo o en combinación.

5 Para la reticulación de la capa externa que contiene una proteína, en primer lugar, se prepara la cápsula sin costuras, y después se lava suficientemente con agua y, a continuación, se adiciona la cápsula sin costuras lavada con agua a una solución acuosa que contiene un agente de reticulación. Por lo tanto, la superficie de la capa externa se somete a un tratamiento de reticulación. Como el agente de reticulación, se pueden utilizar agentes de reticulación conocidos convencionalmente. Ejemplos del agente de reticulación incluyen formaldehído, acetaldehído, propionaldehído, glioxal, glutaraldehído, cinamaldehído, aldehído vainílico, acetona, acetato de metil cetona, óxido de etileno, óxido de propileno, alumbre de potasio, y alumbre de amonio. Por lo general, la capa externa es tratada mediante la adición de 1 parte en peso de la cápsula sin costuras para 50 a 100 partes en peso de solución acuosa que contiene 0.1 a 2% p/v, preferiblemente de 0.5 a 2% p/v, de un agente de reticulación, y agitando la mezcla durante 10 a 300 segundos. En este documento, la cantidad de agente de reticulación utilizada y el período de tiempo para la acción varían en función del tipo de agente de reticulación. Después de que la superficie de la membrana externa se somete al tratamiento de reticulación, la membrana externa se lava suficientemente con agua para eliminar la solución acuosa que contiene el agente de reticulación, y el agua en la capa externa se seca.

15 Para la reticulación de la capa externa que contiene proteínas, la reticulación se puede realizar a través de tratamiento enzimático con transglutaminasa. En este caso, la capa externa es tratada mediante la adición de 1 parte en peso de la cápsula sin costuras producida a 50 a 100 partes en peso de solución acuosa que contiene 0.1 a 10% p/v, preferiblemente de 0.5 a 2% p/v, de enzima, y agitando la mezcla durante 1 a 300 minutos. El producto resultante se lava con agua y se seca como se describió anteriormente.

20 Para el recubrimiento, después la cápsula sin costuras húmeda producida se seca, la cápsula sin costuras convencionalmente se recubre con goma laca, etilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, polivinilpirrolidona, celulosa TC-5, copolímero de vinilpirrolidona-acetato de vinilo, zeína, cera de etileno, o similares como el material de base, y aceite de ricino, aceite de semilla de uva, ftalato de dibutilo, polietilenglicol, glicerina, ácido esteárico, éster de ácido graso, palmitato de sorbitán, estearato de polioxietileno, monoglicérido acetilado, o similares como el plastificante.

25 La membrana de la cápsula puede ser provisto además con entericidad. De este modo, la cápsula está protegida de una solución ácida y similares (tal como el ácido gástrico) en el estómago, y se desintegra en el intestino de manera que la bifidobacterium transformada se libera desde el interior de la cápsula para efectuar suficientemente la producción de antígeno en el intestino. La membrana de la cápsula puede estar provista de entericidad mediante la producción de una cápsula entérica como se practica comúnmente por los expertos en el arte. Una mezcla de gelatina y la pectina se puede utilizar como material de la capa externa de la cápsula sin costuras para hacer que la membrana entérica. La capa externa resistente a los ácidos está provista además de entericidad mediante la preparación mediante la adición de pectina, alginato, goma arábica, o similares en una cantidad de 0.01 a 20% en peso, preferiblemente de 0.1 a 10% en peso de gelatina, agar, carragenano, o similares, que tiene una capacidad de gelificación.

35 La formulación de cápsula sin costuras puede estar en la forma de una esfera, debido al método de producción. El tamaño medio de partícula de la cápsula sin costuras es de 0.3 a 10 mm, preferiblemente de 1.5 a 8.0 mm.

La formulación de cápsula sin costuras así obtenida se puede almacenar durante seis meses o más mientras se mantiene la actividad de la bifidobacterium transformada a temperatura ambiente. Si la formulación se almacena a 10°C o menos, es posible el almacenaje prolongado por un año o más.

(Formulación de cápsula blanda)

40 Como en el caso de la formulación en cápsulas sin costuras, una formulación de cápsula blanda puede ser la encapsulación de una suspensión de la bifidobacterium transformada en un solvente no acuoso (como contenido de la cápsula) con una lámina de membrana. El material de la lámina de membrana es como se menciona para la capa externa de la cápsula sin costuras.

45 Una formulación de cápsula blanda se puede preparar utilizando cualquier procedimiento conocido, por ejemplo, como se describe en la Patente Japonesa No. 2999535. Por ejemplo, utilizando una matriz rotativa, mientras que los contenidos se inyectan y se llenan, la lámina de membrana se calienta a través del molde, con el fin de envolver y encapsular los contenidos, con lo que se consigue la encapsulación. Para la acción de liberar la bifidobacterium transformada en el intestino, un aceite, que es un agente de liberación, se retira de la cápsula blanda resultante a través de lavado con un solvente polar (por ejemplo, metanol, etanol, propanol, o isopropanol). Posteriormente, la cápsula se puede hacer resistente al ácido al realizar el tratamiento de reticulación y el tratamiento de recubrimiento en combinación, o la realización de cualquiera de los tratamientos, como en el caso de la cápsula sin costuras.

50 La lámina de membrana resistente a los ácidos también se puede preparar basándose en cualquiera de los métodos conocidos tales como mediante la adición de pectina, alginato, goma arábica, o similares en una cantidad de 0.01 a 20% en peso, preferiblemente de 0.1 a 10% en peso de gelatina, agar, carragenina, o similares, que tiene una

capacidad de gelificación. Alternativamente, la lámina de membrana se puede hacer resistente a los ácidos, al realizar el tratamiento de reticulación y el tratamiento de recubrimiento en combinación, o la realización de una cualquiera de los tratamientos. La lámina de membrana resistente a los ácidos así obtenida se puede utilizar para producir una formulación de cápsula blanda en la que la bifidobacterium transformada se encapsula con la membrana resistente a los ácidos. Por ejemplo, a partir de la lámina de membrana resistente a los ácidos obtenida se forma una cápsula, los contenidos se introducen en la cápsula, y luego se funde una costura de la cápsula y se unieron con el fin de envolver los contenidos, utilizando técnicas conocidas.

La formulación de cápsula blanda que puede estar en la forma de una esfera, una elipse, o un rectángulo. La cápsula blanda tiene preferiblemente un eje mayor de 3 a 16 mm y un eje menor de 2 a 10 mm, y más preferiblemente tiene un eje mayor de 5 a 7 mm y un eje menor de 2 a 3 mm.

La formulación de cápsula blanda obtenida de esta manera se puede almacenar durante seis meses o más mientras se mantiene la actividad de la bifidobacterium transformada a temperatura ambiente. Si la formulación se almacenó a 10°C o menos, el almacenaje prolongado por un año o más es posible.

(Formulación de cápsula dura)

Una formulación de cápsula dura se puede producir por moldeo de una membrana de la cápsula en un cuerpo y una tapa de antemano, llenando el cuerpo de la cápsula con el contenido, y la combinación de la resultante con la tapa de la cápsula.

Los ejemplos del material de la membrana de la formulación cápsula dura incluyen gelatina, celulosa, pululano, carragenano, y derivados de celulosa tales como hidroxipropilmetilcelulosa. La cápsula dura se puede moldear utilizando cualquiera de los métodos comúnmente utilizados por los expertos en el arte. La cápsula moldeada puede ser cápsulas disponibles comercialmente. Los contenidos pueden ser abarcados con y envueltas en la membrana.

Los contenidos pueden ser una mezcla obtenida mezclando suficientemente la bifidobacterium transformada con un excipiente (por ejemplo, anhídrido silícico, silicato de aluminio sintético, lactosa, almidón de maíz o celulosa cristalina), o polvos que contienen polvos secos de la bifidobacterium transformada.

Después de que los contenidos están contenidos en la cápsula, la membrana de la cápsula se puede revestir. Para este recubrimiento, los materiales y los métodos que se han mencionado para la capa externa de la cápsula sin costuras se pueden aplicar para proporcionar la membrana con resistencia a los ácidos y preferiblemente desintegrativo en el intestino (entericidad). Este recubrimiento también permite que la membrana de la cápsula para sellar con el fin de encapsular los contenidos.

La lámina de membrana resistente a los ácidos también se puede preparar basándose en cualquiera de los métodos conocidos tales como mediante la adición de pectina, alginato, goma arábiga, o similares en una cantidad de 0.01 a 20% en peso, preferiblemente de 0.1 a 10% en peso gelatina, agar, carragenina, o similares, que tiene una capacidad de gelificación. Alternativamente, la lámina de membrana se puede hacer resistente a los ácidos, al realizar el tratamiento de reticulación y el tratamiento de recubrimiento en combinación, o realizando uno cualquiera de los tratamientos. La lámina de membrana resistente a los ácidos así obtenida se puede utilizar para producir una formulación de cápsula dura en la que la bifidobacterium transformada está encapsulada por la membrana resistente a los ácidos. Por ejemplo, a partir de la lámina de membrana resistente a los ácidos obtenida se forma una cápsula dura, los contenidos se introducen en la cápsula dura formada, y luego se funde una costura de la cápsula y se unen con el fin de envolver los contenidos, utilizando una técnica conocida.

La formulación de cápsula dura obtenida de este modo se puede almacenar durante seis meses o más mientras se mantiene la actividad de la bifidobacterium transformada a temperatura ambiente. Si la formulación se almacena a 10°C o menos, es posible el almacenaje prolongado por un año o más.

Ejemplos

En lo sucesivo, la presente invención se describirá ahora más específicamente con referencia a los Ejemplos. Sin embargo, el alcance de la presente invención no está limitado a los siguientes Ejemplos.

(Ejemplo 1: Preparación de bifidobacterium se presentan GL-BP-FlIC en la superficie)

A. Aislamiento del gen de GL-BP

Para amplificar el gen de GL-BP del genoma *bifidobacterium longum* JCM1217 (ATCC15707) (Número de acceso: EU193949), se realizó la PCR utilizando cebadores *glt-f*: 5'-ggggtgctgatattggttg-3' (SEQ ID NO: 5) y *glt-r*: 5'-

gctcgagctcgaaacagacagggccgaagt-3' (SEQ ID NO: 6) que permitió que el codón de parada sea sustituido con *XhoI*, así como KOD-Plus-(TOYOBO). Los productos de PCR incluyendo el gen de GL-BP amplificados se sometieron a electroforesis en gel de agarosa para escindir un producto de PCR 1989-pb, y se aisló sólo un fragmento de amplificación de GL-BP y se purificaron utilizando Wizard SV Gel y el sistema PCR Clean-Up (Promega).

5 B. Construcción del plásmido pMW118 incluyendo el gen de GL-BP aislado

El fragmento de amplificación de genes de GL-BP aislado y purificado se introdujo en el sitio *SmaI* de pMW118 que incluyendo el gen de resistencia a ampicilina (*Ampr*) (Nippon Gene) para construir un plásmido. Para la unión se utilizó el kit de unión de ADN Ver. 2 (Takara Bio Inc.). El plásmido construido se introdujo en *Escherichia coli DH5α* (Takara Bio Inc.) por el método de choque térmico (42°C, 30 segundos), y las células bacterianas se diseminan sobre un medio de agar LB que contiene 100 µg/mL de ampicilina (Difco) y se cultivan durante la noche a 37°C, para obtener *Escherichia coli* transformada que alberga el plásmido que incluye el gen de GL-BP. El plásmido se extrajo y purificó a partir de los *Escherichia coli* transformado mediante Kit Quantum Prep plásmido Miniprep (Bio-Rad), y la secuencia se confirmó por secuenciación para mostrar que se obtuvo el plásmido recombinante en el cual se introdujo el gen de la GL-BP. El plásmido recombinante obtenido se designó como pJT101.

15 C. Aislamiento de gen *FliC*

Para amplificar el gen *FliC* del genoma de *Salmonella typhimurium* (*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium) ATCC13312 (adquirido de Summit Pharmaceutical International Corporation), se realizó la PCR utilizando cebadores *fliC*-f: 5'-cctcgagatggcacaagtcattaatacaaacag-3' (SEQ ID NO: 7) al cual se le adicionó la secuencia *XhoI* y *fliC*-r: 5'-cctcgagttaacgcagtaaagagaggacg-3' (SEQ ID NO: 8). Los productos de PCR amplificados incluyendo el gen *FliC* se sometieron a electroforesis en gel de agarosa para escindir un producto de PCR de 1502-pb, y se aisló solo el fragmento de amplificación de *FliC* y se purificó utilizando Wizard SV Gel y el sistema PCR Clean-Up.

D. Construcción del plásmido incluyendo gen de *FliC* en dirección 3' del gen de GL-BP

El fragmento de amplificación de genes de *FliC* aislado y purificado en la anterior C se digirió con una enzima de restricción *XhoI*. El fragmento de amplificación del gen *FliC* digerido con *XhoI* fue introducido en el plásmido pJT101 mencionada digerido de manera similar con la enzima de restricción *XhoI* utilizando Kit de unión de ADN Ver. 2 para construir un plásmido. El plásmido construido se introdujo en *Escherichia coli* DH5α mediante el método de choque térmico, y las células bacterianas se diseminaron sobre un medio de agar LB que contiene 100 µg/mL de ampicilina y cultivadas durante la noche a 37°C para obtener una *Escherichia coli* transformada que alberga el plásmido incluyendo un gen de fusión del gen de GL-BP y el gen de *FliC* (La figura 1). El plásmido se extrajo y se purificó del *Escherichia coli* transformado utilizando el Kit Quantum Prep plásmido Miniprep, y la secuencia se confirmó por secuenciación para mostrar que se obtuvo el plásmido recombinante en el cual el gen *FliC* se unió en dirección 3' del gen de GL-BP. El plásmido recombinante obtenido se designó como pJT102.

E. Construcción del vector lanzadera *Escherichia coli*-bifidobacterium

Para acortar el tiempo mientras que se mantiene el origen de replicación de bifidobacterium en un vector lanzadera de *Escherichia coli*-bifidobacterium pBLES100, se realizó PCR utilizando como una plantilla pBLES100 (Matsumura H. et al., Biosci. Biotech. Biochem., 1997, vol. 61, pp. 1211-1212) y como cebadores pBLES-f: 5'-agggactgatctgctcatccag-3' (SEQ ID NO: 9) y pBLES-r: 5'-ttcccattaataataaaaacaaaaaat-3' (SEQ ID NO: 10) Los productos de amplificación de PCR se sometieron a electroforesis en gel de agarosa para escindir el producto de la PCR utilizando Gel Wizard SV y el sistema PCR Clean-Up, y sólo el fragmento de amplificación por PCR fue aislado y purificado. Después de la purificación, se realizó la auto-unión utilizando el Kit de unión de ADN Ver. 2.1 (Takara Bio Inc.). El plásmido obtenido por auto-unión fue designado como pTK1751. PCR se realizó utilizando como plantilla pTK1751 y como cebadores pBLES-f3581: 5'-tagttgcgcaacggtgtgccc-3' (SEQ ID NO: 11) y pBLESr93: 5'-gatttcatacacgggtgctgac-3' (SEQ ID NO: 12) para obtener un producto de PCR que incluye el gen de resistencia a espectinomicina (SPr) y la región *ori* del origen de replicación de bifidobacterium, que se purificó por el método de precipitación con etanol. Además, por separado, la PCR se realizó utilizando como plantilla pMW118 y como cebadores pMW118-f: 5'-atcacgaggcccttctgcttc-3' (SEQ ID NO: 13) y pMW118-r: 5'-cctgttctattagggtgttacatgc-3' (SEQ ID NO: 14) para obtener un producto de PCR que incluye la región *ori* de origen de replicación de *Escherichia coli*, que se purificó por el método de precipitación con etanol. Estos dos productos de PCR se unieron utilizando el Kit de unión de ADN Ver. 2.1. El plásmido obtenido se introdujo en *Escherichia coli* DH5α mediante el método de choque térmico, y las células bacterianas se diseminaron sobre un medio de agar LB que contiene 70 µg/mL de espectinomicina y se cultivaron durante la noche a 37°C para obtener una *Escherichia coli* transformada que alberga el plásmido incluyendo la región *ori* del origen de replicación de *Escherichia coli*, el gen de resistencia a espectinomicina (SPr), y región *ori* del origen de replicación de bifidobacterium. El plásmido se extrajo y se purificó de *Escherichia coli* transformada obtenida utilizando el Kit Quantum Prep Plasmid Miniprep para obtener el plásmido recombinante que incluye la región *ori* del origen de replicación de *Escherichia coli*, el gen de

resistencia a espectinomicina (SPr), y la región *ori* del origen de replicación de bifidobacterium. El plásmido recombinante obtenido se designó como vector lanzadera pJW241.

F. Incorporación del gen obtenido mediante la unión de genes GL-BP y gen de FliC en el vector lanzadera pJW241 de *Escherichia coli*-bifidobacterium

5 Se realizó la PCR utilizando el vector pJT102 que tiene un gen obtenido mediante la unión del gen GL-BP y como plantilla el gen FliC y como cebadores GL-BP-Ndel-f: 5'-ccatatgaagtacgttgcttgaaggggag-3' (SEQ ID NO: 15) y FliC-Ndel-r: 5'-ccatatgtaacgcagtaaagagaggacg-3' (SEQ ID NO: 16). El producto de amplificación PCR se purificó por el método de precipitación con etanol y luego se digirió con una enzima de restricción *NdeI*. Por separado, el vector lanzadera *Escherichia coli*:bifidobacterium obtenido en el anterior E, también se digirió con la enzima de restricción  
10 *NdeI*. El fragmento del gen PCR digerido con *NdeI* y pJW241 se unieron utilizando el Kit de unión de ADN Ver. 2.1, y el plásmido obtenido se introdujo en *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  por el procedimiento de choque térmico, y las células bacterianas se diseminaron sobre un medio de agar LB que contiene 70  $\mu$ g/mL de espectinomicina y se cultivaron durante la noche a 37°C para obtener *Escherichia coli* transformada que alberga el plásmido que incluye la región *ori* del origen de replicación de *Escherichia coli*, el gen de resistencia a espectinomicina (SPr), la región *ori* del origen de  
15 replicación de bifidobacterium, y un gen de fusión del gen de la GL-BP y el gen FliC. El plásmido se extrajo y se purificó del *Escherichia coli* transformado mediante Kit Quantum Prep Plasmid Miniprep, y se confirmó la presencia de la secuencia del gen obtenido uniendo el gen de GL-BP y el gen FliC. El plásmido recombinante obtenido se designó como pJW245.

G. Preparación de la solución de bifidobacterium huésped

20 *Bifidobacterium longum* 105-A (Matsumura H. et al., Biosci. Biotech. Biochem., 1997, vol. 61, pp. 1211-1212: donada por Tomotari Mitsuoka, profesor emérito de la Universidad de Tokio) fue inoculada en 50 mL de un medio GAM (Nissui Pharmaceutical Co., Ltd.) y se cultivó a 37°C utilizando AnaeroPack Kenki (Mitsubishi Gas Chemical Company, Inc.). Durante el cultivo, se midió la absorbancia a una longitud de onda de 600 nm, y el cultivo se terminó cuando la absorbancia alcanzó 0.4 a 0.8. Después de la finalización del cultivo, el caldo de cultivo se centrifugó a 6000 X g,  
25 durante 10 minutos utilizando una centrifuga de alta velocidad para recoger las células bacterianas. Las células bacterianas recogidas se lavaron 2 o 3 veces por estar suspendidas en 10 mL de solución de glicerol al 10% (v/v) y se centrifugó utilizando una centrifuga de alta velocidad.

H. Preparación de bifidobacterium que presenta GL-BP-FliC en la superficie mediante la transformación de bifidobacterium con plásmido pJW245 recombinante

30 Una solución de la bifidobacterium huésped obtenida en el anterior G se suspendió en 500  $\mu$ l de solución de glicerol al 10% (v/v). Doseos  $\mu$ l de esta suspensión se vertió en un tubo separado, 5  $\mu$ l de una solución que contiene el plásmido pJW245 recombinante obtenido en la anterior F se añadió y se mezcló, y la mezcla se dejó reposar sobre el hielo durante 5 minutos. Después, la mezcla se colocó en una cubeta de electroporación de 0.2-cm (Bio-Rad) y se sometió a electroporación utilizando el Sistema de electroporación Gene Pulser X Cell (Bio-Rad) bajo condiciones de 2  
35 kV, 2.5  $\mu$ F, y 200  $\Omega$ . Inmediatamente después la electroporación, se adicionaron 0.8 mL de un medio GAM caliente de antemano a 37°C, y las células se cultivaron utilizando AnaeroPack Kenki a 37°C durante 3 horas. A continuación, el caldo de cultivo, se diseminaron sobre un medio de agar GAM que contiene 70  $\mu$ g/mL de espectinomicina (Nissui Pharmaceutical Co., Ltd.), y las células bacterianas se cultivaron a 37°C utilizando AnaeroPack Kenki para obtener una bifidobacterium transformada. La bifidobacterium transformada obtenida se inoculó en un medio de agar GAM que  
40 contiene 70  $\mu$ g/mL de espectinomicina y se cultivaron a 37°C utilizando AnaeroPack Kenki. Después de la finalización del cultivo, el caldo de cultivo se dividió en tubos de 1.5 mL y se suspendió en una cantidad igual de solución de glicerol al 50% (v/v). La suspensión obtenida se almacenó a -80°C para preparar un stock bacteriano congelado, que se usó como una célula maestra de la bifidobacterium que presenta GL-BP-FliC en la superficie del mismo (también se puede denominar como bifidobacterium transformada).

45 (Ejemplo 2: Confirmación de la presentación en superficie de GL-BP-FliC en Bifidobacterium-1 transformada)

El stock congelado de la bifidobacterium transformada obtenida en el anterior Ejemplo 1 se descongeló, y las células bacterianas se cultivaron en un medio GAM que contiene 70  $\mu$ g/mL de espectinomicina. El caldo de cultivo obtenido de la bifidobacterium transformada se centrifugó con una centrifuga de alta velocidad para recoger las células bacterianas. Las células bacterianas recogidas se suspendieron en una solución reguladora de PBS (Nippon Gene Co., Ltd.) y se  
50 lavaron 3 veces por centrifugación con una centrifuga de alta velocidad. A continuación, se adicionó un anticuerpo primario anticuerpo de ratón anti-FliC (BioLegend, Inc.) a PBS que contiene 1% de BSA (p/v), la mezcla se suspendió en la solución bifidobacteriana, y la suspensión se dejó en reposo a 37°C, durante 30 minutos. La suspensión bacteriana se dejó en reposo durante 30 minutos se centrifugó con una centrifuga de alta velocidad para recoger las células bacterianas. Las células bacterianas recogidas se suspendieron en PBS y se lavaron dos veces por centrifugación con  
55 una centrifuga de alta velocidad. A continuación, se adicionó un anticuerpo secundario anticuerpo IgG anti-ratón de

5 conejo Alexa Fluor™ 488 (Molecular Probes) a PBS que contenía 1% (p/v) de BSA, y la mezcla se suspendió en la solución bifidobacteriana, y la suspensión se dejó en reposo a 37°C, durante 30 minutos. La suspensión bacteriana se dejó en reposo durante 30 minutos se centrifugó con una centrifuga de alta velocidad para recoger las células bacterianas. Las células bacterianas recogidas se suspendieron en PBS, se lavaron dos veces por centrifugación con una centrifuga de alta velocidad, y luego se observaron bajo un microscopio de fluorescencia (KEYENCE). Los resultados se muestran en la fig. 2.

10 La figura 2(a) es una micrografía de fluorescencia que presenta la bifidobacterium transformada (que presenta GL-BP-FliC en la superficie de la misma) obtenida en el anterior Ejemplo 1. La figura 2(b) es una micrografía de fluorescencia de la bifidobacterium huésped (que no muestra GL-BP-FliC en la superficie de la misma). La presencia de FliC en la superficie celular de la bifidobacterium transformada se confirmó a partir de estas micrografías de fluorescencia.

(Ejemplo 3: Confirmación de la presentación en superficie de GL-BP-FliC en bifidobacterium-2 transformada)

15 El stock congelado de la bifidobacterium transformada obtenida en el anterior Ejemplo 1 se descongeló, y las células bacterianas se cultivaron en un medio GAM que contiene 70 µg/mL de espectinomicina. La bifidobacterium transformada cultivada se centrifugó con una centrifuga de alta velocidad para recoger las células bacterianas. Las células bacterianas recogidas se suspendieron en PBS y se lavaron 3 veces por centrifugación con una centrifuga de alta velocidad. Se adicionó una solución que contiene PBS, Tris-HCl 1 M (pH 8.0) (Nippon Gene Co., Ltd.), y Triton X-100 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) a las células bacterianas, y la solución se dejó reposar en hielo durante 30 minutos. Se adicionó una cantidad igual de 2 X SDS solución reguladora de electroforesis en gel a esta solución, y la mezcla se dejó en reposo a 95°C, durante 5 minutos para obtener una muestra para la electroforesis. A continuación, gel de acrilamida al 8% (p/v) se colocó en un aparato de electroforesis (ATTO Corporation), la muestra obtenida se aplicó y se sometió a electroforesis junto con un marcador de peso molecular a una corriente de 20 mA, durante 1.5 horas. Después de la electroforesis, el gel se colocó sobre una membrana de nitrocelulosa (ATTO Corporation) y se cargó en un aparato de transferencia (Bio-Rad) a una corriente de 20 mA para transferencia. Después de la transferencia, la membrana de nitrocelulosa se sumergió en una solución reguladora de TBS (Nippon Gene Co., Ltd.) que contiene 4% (p/v) de leche descremada (BD), durante 1 hora para bloquear. Después del bloqueo, la membrana de nitrocelulosa se lavó dos veces con TBS. La membrana de nitrocelulosa lavada se sumergió en TBS que contiene 0.5% (p/v) de anticuerpo primario (anticuerpo Anti FliC de ratón: BioLegend) durante 1.5 horas y se lavó 3 veces con TBS. A continuación, la membrana de nitrocelulosa se sumergió en TBS que contiene anticuerpo secundario al 0.5% (p/v) (IgG anti- ratón de cabra conjugado con fosfatasa alcalina: BioLegend) durante 3 horas. A continuación, la membrana de nitrocelulosa se lavó 3 veces con TBS, se dejó desarrollar un color utilizando Kit -Steptm NBT/BCIP Plus Suppressor (PIERCE), durante 30 minutos con protección de la luz, y se enjuagó con agua pura, y a continuación, la expresión superficial de una proteína de fusión de FliC y GL-BP (GL-BP-FliC) fue confirmada por la coloración. Los resultados de la transferencia Western se muestran en la figura 3.

35 Como se muestra en la figura 3, la muestra mostró una banda clara en 98 kDa, que corresponde a la suma de los pesos moleculares de FliC y GL-BP FliC, un control positivo, mostró una banda a aproximadamente 50 kD. Por lo tanto, se confirmó que la bifidobacterium transformada expresa GL-BP-FliC.

(Ejemplo 4: Preparación de bifidobacterium transformada para la administración a ratones)

40 El stock congelado de la bifidobacterium transformada obtenida en el anterior Ejemplo 1, se descongeló y se inocularon las células bacterianas en un medio GAM que contiene 70 µg/mL de espectinomicina y se cultivaron durante la noche a 37°C utilizando AnaeroPack Kenki. El caldo de cultivo se centrifugó con una centrifuga de alta velocidad para recoger las células bacterianas. Las células bacterianas recogidas se suspendieron en PBS y se lavaron dos veces por centrifugación con una centrifuga de alta velocidad. A continuación, se suspendieron las células bacterianas en PBS a una concentración de  $2.5 \times 10^7$  ufc/100 µl para obtener una bifidobacterium transformada para la administración a los ratones.

45 (Ejemplo 5: Confirmación de la producción de anticuerpos en ratones mediante la administración de bifidobacterium transformada)

50 Cincuenta µl de la bifidobacterium transformada para la administración a ratones preparados en el Ejemplo 4 anterior, se administraron por vía oral a ratones BALB/c, hembras de 8-12 semanas (Japan Charles River Laboratories Japan, Inc.) 3 veces a la semana durante 4 semanas (grupo de ensayo). Una bifidobacterium en la cual se introdujo un vector vacío (vector pJW241) como un control (grupo de control) y 50 µl de PBS como un control negativo (grupo de control negativo) se administraron a los ratones de la misma manera que para el grupo de ensayo. El grupo de ensayo, el grupo control y el grupo de control negativo incluyeron 7, 6 y 5 animales, respectivamente.

En los días 0, 14 y 28 después del inicio de la administración, se recogió sangre de la vena caudal de los animales en cada grupo. La sangre recogida se centrifugó a 4°C a 3000 rpm durante 15 minutos para obtener el suero, que se

almacenó a  $-80^{\circ}\text{C}$ . En los días 0, 4, 7, 11, 14, 18, 21, 25 y 28 después del inicio de la administración, se recogieron y se liofilizaron heces. Se adicionaron cinco % (p/v) de leche descremada (BD), 0.1 mg/mL de inhibidor de tripsina de soja (Roche Applied Science), y fluoruro de fenilmetilsulfonilo 2 mM (Sigma) a PBS para preparar una solución de heces. Veinte  $\mu\text{L}$  de la solución para heces se adicionaron a 1 mg de heces secas. La mezcla se sometió a un vórtice para disolver las heces y se centrifugó a  $4^{\circ}\text{C}$  a 15.000 rpm durante 10 minutos para obtener un sobrenadante, que se almacenó a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Se realizó un ELISA en el suero obtenido y la solución fecal de la siguiente manera. En primer lugar, se adicionaron 50  $\mu\text{L}$ /pozo de 1.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de flagelina (InvivoGen) a 3 Placas Nunc Immunoplate F96 Maxisorb (Nalge Nunc) y se dejó reposar durante la noche a  $4^{\circ}\text{C}$ . Las placas se lavaron con PBS, se adicionaron 200  $\mu\text{L}$ /pozo de PBS que contenía 1% (p/v) de BSA (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), y la mezcla se dejó reposar a temperatura ambiente durante 2 horas. Las placas se lavaron con TBS, y después se adicionaron 50  $\mu\text{L}$ /pozo de suero de ratón diluido en serie con PBS y además se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 3 horas. Las placas se lavaron con TBS, y después se adicionaron respectivamente 50  $\mu\text{L}$ /pozo de solución diluida 1/1000 de IgG anti ratón de cabra poly-HRP (R & D Systems), solución diluida 1/2000 de IgA anti ratón de cabra poly-HRP (Santa Cruz Biotechnology), y solución diluida 1/2000 de IgM de anti ratón de cabra poly-HRP (Santa Cruz Biotechnology) a las 3 placas y se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 3 horas. Las placas se lavaron con TBS, y se adicionaron luego 100  $\mu\text{L}$ /pozo de un reactivo sustrato OptEIA™ (BD) y se hacen reaccionar a temperatura ambiente durante 20 minutos con protección de la luz. Se adicionaron cien  $\mu\text{L}$ /pozo de ácido sulfúrico 1 N (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) para terminar la reacción, y la absorbancia a 450 nm se midió utilizando un espectrómetro de absorción Ultrospec Visible Plate Reader II 96 (Amersham Biosciences).

Los cambios con el tiempo en los niveles de IgA anti-flagelina en la solución fecal se muestran en la figura 4, que muestra que cuanto mayor es la absorbancia a 450 nm, mayor será el nivel de IgA. En el gráfico de la figura 4, un valor representa el valor medio de los ratones en cada grupo. La barra representa la desviación estándar. Los niveles de anticuerpos anti-flagelina de IgA en las heces aumentó notablemente sólo en el grupo tratado con bifidobacterium transformada en 11 a 14 días después del inicio de la administración.

Los cambios con el tiempo en los niveles de diversos anticuerpos anti-flagelina en suero se muestran en la figura 5. La figura 5(a) muestra los cambios con el tiempo en los niveles de IgA anti-flagelina, La figura 5(b) muestra los cambios con el tiempo en los niveles de IgG anti-flagelina, y la fig. 5(c) muestra los cambios con el tiempo en los niveles de IgM anti-flagelina. Los niveles de IgA se aumentaron a los 14 días después del inicio de la administración como se observa en la solución fecal. Tanto los niveles de IgG como los de IgM se aumentaron a los 14 días después del inicio de la administración y se mantuvieron altos en el día 28. Por lo tanto, se confirmó la presencia de anticuerpos anti-flagelina en suero mediante la administración por vía oral de la bifidobacterium que presenta flagelina en la superficie.

(Ejemplo 6: Confirmación de la respuesta inmune de células de bazo a bifidobacterium transformada)

Se abrieron los abdómenes de ratones BALB/c hembras de 8 a 12 semanas de edad, y los bazos se pincharon con una jeringa con una aguja 18-G para eliminar las células de bazo, que se transfirieron luego a una placa. Las células del bazo se separan en células individuales utilizando un filtro de células y se lavaron dos veces con PBS esterilizado. Las células del bazo se suspendieron en solución de cloruro de amonio 0.1 M, y esta suspensión de células se incubó en un cuarto oscuro a  $25^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos. A continuación, la suspensión se centrifugó para recoger las células de bazo. Las células de bazo recogidas fueron suspendidas en un medio RPMI1640 (GIBCO) que contiene 10% de suero fetal de ternero, 100 U/mL de penicilina, 2-mercaptoetanol 100  $\mu\text{M}$ , y L-glutamina 2 mM, y se contó el número de células.

Las células del bazo fueron transferidas a los pozos respectivos de una placa de 96 pozos (Pierce Biotechnology) a los  $3 \times 10^6$  células/pozo, la bifidobacterium transformada para la administración a ratones preparados en el Ejemplo 4 anterior se adicionó a 50  $\mu\text{g}$ /pozo, y las células del bazo se cultivaron a  $25^{\circ}\text{C}$ , durante 48 horas. Como control, las células del bazo fueron transferidas a los pozos respectivos de una placa de 96 pozos a  $3 \times 10^6$  células/pozo y se cultivaron a  $25^{\circ}\text{C}$ , durante 48 horas sin adicionar la bifidobacterium transformada. A continuación, el caldo de cultivo se centrifugó a 5000 g durante, 10 minutos para obtener un sobrenadante, que se almacenó a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

La concentración de citoquinas en el sobrenadante se midió utilizando kits de ELISA disponibles comercialmente para  $\text{IFN}\gamma$  e IL-12 (Pierce Biotechnology). Como resultado, se detectaron altos niveles de  $\text{IFN}\gamma$  e IL-12 en el sobrenadante de todos los pozos que contienen las células de bazo cultivadas en presencia de la bifidobacterium transformada. Por lo tanto, se confirmó que se indujo la producción de  $\text{IFN}\gamma$  e IL-12 en células de bazo de ratón mediante la administración por vía oral a los ratones de la bifidobacterium que presenta flagelina sobre la superficie de la misma.

(Ejemplo 7: Prueba de la infección del ratón utilizando Bifidobacterium-1 transformada)

Para los ratones BALB/c hembras de 8 a 12 semanas de edad,  $2.5 \times 10^7$  ufc/100  $\mu\text{L}$  de la bifidobacterium transformada para la administración a ratones preparados en el Ejemplo 4 anterior administrados por vía oral cada dos días durante 2

semanas (grupo de ensayo). Una bifidobacterium en la cual se introdujo un vector vacío (vector pJW241) como un control (grupo de control) y se les administró 100 µL de PBS como un control negativo (grupo de control negativo) a los ratones de la misma manera que para el grupo de ensayo. Cada grupo incluyó 14 animales.

5 El día 14 después del inicio de la administración,  $1.0 \times 10^7$  ufc, una dosis letal, de *Salmonella typhimurium* (*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar typhimurium) ATCC14028 (adquirida de Summit Pharmaceutical International Corporation) se administró por vía oral, y luego los animales fueron inspeccionados visualmente cada día durante 40 días. Los cambios con el tiempo en la tasa de supervivencia de ratones en cada grupo se muestran en la figura 6. Los resultados muestran que 9 de 14 animales en el grupo de control y 12 de 14 animales en el grupo de control negativo murieron (los días promedio de supervivencia fueron del 14 y 25 días, respectivamente), pero la mayoría de los animales sobrevivieron en el grupo de ensayo, y sólo 2 de 14 animales murieron.

10 Las concentraciones de citoquinas producidas por células de bazo en los animales supervivientes en cada grupo se midieron utilizando kits de ELISA disponibles comercialmente para IFN- $\gamma$  e IL-12. Los resultados mostraron que las células de bazo aisladas a partir de animales en el grupo de ensayo producían niveles significativamente más altos de IFN- $\gamma$  e IL-12 que los animales de los otros grupos. Por lo tanto, era posible impedir eficazmente el efecto fatal de la administración oral de *Salmonella typhimurium* a los ratones mediante la administración por vía oral de la bifidobacterium que presenta flagelina sobre la superficie de la misma a los ratones.

(Ejemplo 8: Prueba de la infección del ratón utilizando Bifidobacterium-2 transformada)

20 A los 11 días después de la administración oral de *Salmonella typhimurium* en el Ejemplo 7 anterior, se extirparon los bazos de los animales que sobrevivieron en cada grupo, y *Salmonella typhimurium* en los bazos se detectó por análisis de PCR en tiempo real. En primer lugar, se aisló el ADN a partir del bazo y se purificó utilizando Kit DNeasy Blood & Tissue (QIAGEN) para preparar una solución de ADN de la muestra. ADN genómico se aisló de manera similar y se purificó  $10^6$  a  $10^{10}$  ufc de *Salmonella Typhimurium*, que se diluyó en serie para preparar soluciones de ADN para la elaboración de una curva de calibración. Luego, 12.5 µL de SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) que contiene 0.3 µmol/L de cada uno de los cebadores ST11: 5'-gccaaccattgctaaattggcgca-3' (SEQ ID NO: 17) y ST15: 5'-ggtagaaattcccagcggtactgg-3' (SEQ ID NO: 18) (Soumet C et al., Lett. Appl. Microbiol., 1999, vol. 28, pp. 113-117), y 1 µL de la solución de ADN de la muestra o las soluciones de ADN para la elaboración de una curva de calibración se vertieron en un tubo de reacción de PCR y se mezcló. La PCR se realizó de acuerdo con el protocolo adjunto a la SYBR Green Master Mix (mantenimiento a 50°C, durante 2 minutos, seguido por mantenimiento a 95°C, durante 10 minutos, y luego repitiendo un ciclo que consta de mantenimiento a 95°C, durante 15 segundos y mantenimiento a 60°C, durante 1 minuto 50 veces). PCR se realizó 3 veces en cada solución de ADN de la muestra.

30 Como resultado, no se detectó ADN de *Salmonella typhimurium* de los bazos de los animales en el grupo de ensayo. Por otra parte, se detectaron  $2.34 \pm 0.36 \times 10^{10}$  y  $2.23 \pm 0.20 \times 10^{10}$  copias de ADN de *Salmonella typhimurium* por miligramo del ADN de bazo de los bazos de los animales en el grupo control y el grupo de control negativo, respectivamente. Por lo tanto, fue posible para prevenir eficazmente la infección por *Salmonella typhimurium* a los ratones causada por la administración oral mediante la administración por vía oral a los ratones de la bifidobacterium que presenta flagelina sobre la superficie de la misma

(Ejemplos 9 a 14: Preparación de bifidobacterium que presenta GL-BP-FliC en la superficie de la misma y la confirmación de la presentación en superficie de GL-BP-FliC)

40 Bifidobacteria transformada con el plásmido recombinante pJW245 se obtuvieron de la misma manera que en el Ejemplo 1 excepto que *bifidobacterium adolescentis* ATCC15703 (Ejemplo 9), *B. animalis* ATCC25527 (Ejemplo 10), *B. bifidum* ATCC11863 (Ejemplo 11), *B. breve* ATCC15700 (Ejemplo 12), *B. infantis* ATCC25962 (Ejemplo 13), o *B. pseudocatenulatum* ATCC27919 (Ejemplo 14) en lugar de *B. longum* 105-a en el Ejemplo 1. El mismo procedimiento que en el Ejemplo 2 se llevó a cabo entonces, y se confirmó la presencia de GL-BP-FliC en la superficie celular de estas bifidobacterias transformantes.

45 Aplicabilidad Industrial

De acuerdo con la presente invención, una proteína o péptido diana se puede expresar y presentar en la superficie celular de una bifidobacterium. Por ejemplo, presentando una proteína antigénica de un microorganismo, un virus, un protozoo, un cáncer, o similares en la superficie de una bifidobacterium, la bifidobacterium se puede utilizar como una vacuna oral o nasal para el transporte de la proteína antigénica a la membrana mucosa del intestino delgado o de la nariz como un portador y la inducción de una reacción de anticuerpo contra el antígeno presentado en la membrana mucosa.

Como una vacuna oral, la bifidobacterium puede ser fácilmente tomada por los niños y los ancianos y no causa el dolor habitual asociado a la vacunación por inyección. En particular, la vacuna oral de la presente invención es altamente

segura porque se usan bifidobacterias que tienen una larga historia de consumo. Además, la inmunidad se induce a través del tracto intestinal, que es la misma ruta como la ruta de infección real, y se inducen tanto la inmunidad humoral como la inmunidad mediada por células.

5 Por otra parte, la mejora de los productos de microorganismos, la producción de nuevos productos, la conversión de los microorganismos, y similares se puede lograr presentando una enzima en la superficie bifidobacteriana, y la presentación de la enzima se puede aplicar para biomarcadores, análisis de interacción, selección, y similares utilizados en la práctica o investigación clínica.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Morishita Jintan Co., Ltd.

10 Kobe University

<120> Gen para expresar una proteína de fusión en la capa superficial de Bifidobacterium

<130> P2-10M03091

<150> 2009-216256

<151> 2009-09-17

15 <150> 2010-99218

<151> 2010-04-22

<160> 18

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

20 <211> 1317

<212> ADN

<213> Bifidobacterium longum subsp. longum JCM1217

<220>

<221> CDS

25 <222> (1)..(1317)

<223>

<400> 1

ES 2 569 659 T3

atg gta tct cgc aat aag cgc atc gtg gct gct ttt gcc gcg gta gca 48  
 Met Val Ser Arg Asn Lys Arg Ile Val Ala Ala Phe Ala Ala Val Ala  
 1 5 10 15

gca atg gga atg ggc ttg gcc ggt tgc ggc agc gac act gcc ggc gac 96  
 Ala Met Gly Met Gly Leu Ala Gly Cys Gly Ser Asp Thr Ala Gly Asp  
 20 25 30

acg aag acc acc gat gat ggt ggc gtg gtc aac atc acc tac atg cac 144  
 Thr Lys Thr Thr Asp Asp Gly Gly Val Val Asn Ile Thr Tyr Met His  
 35 40 45

cgt ctg ccg gat tcc gag ggc atg act ctg gtc aac gac atc gtt gcc 192  
 Arg Leu Pro Asp Ser Glu Gly Met Thr Leu Val Asn Asp Ile Val Ala  
 50 55 60

aag tgg aat aag cag cat ccg gat att cag gtc aag gcc acc aag ttc 240  
 Lys Trp Asn Lys Gln His Pro Asp Ile Gln Val Lys Ala Thr Lys Phe  
 65 70 75 80

gat ggt aag gcc tct gac atg atc aag aag ctt gag acc gac gtc aag 288  
 Asp Gly Lys Ala Ser Asp Met Ile Lys Lys Leu Glu Thr Asp Val Lys  
 85 90 95

tcc ggc gag gct ccg gat ctg gct cag gtc ggt tac gcc gag ctg cct 336

ES 2 569 659 T3

Ser Gly Glu Ala Pro Asp Leu Ala Gln Val Gly Tyr Ala Glu Leu Pro  
100 105 110

gag gtc ttc acc aag ggt ctg ctg cag gat gtg acc cag tat gcc gag 384  
Glu Val Phe Thr Lys Gly Leu Leu Gln Asp Val Thr Gln Tyr Ala Glu  
115 120 125

cag tac aag aac gac ttc gca tcc ggc ccg tac agc ctg gtt cag gtt 432  
Gln Tyr Lys Asn Asp Phe Ala Ser Gly Pro Tyr Ser Leu Val Gln Val  
130 135 140

ggc ggc aag gct tac ggc ctg ccg cag gac acc ggc ccg ctg gtt tac 480  
Gly Gly Lys Ala Tyr Gly Leu Pro Gln Asp Thr Gly Pro Leu Val Tyr  
145 150 155 160

ttc tac aac aag gct gag ttc gag aag ctg ggc atc acc gag att ccg 528  
Phe Tyr Asn Lys Ala Glu Phe Glu Lys Leu Gly Ile Thr Glu Ile Pro  
165 170 175

cag acc gcc gat gag ttt atc gcc gct gcc aag acc gct gcc gcc gct 576  
Gln Thr Ala Asp Glu Phe Ile Ala Ala Ala Lys Thr Ala Ala Ala Ala  
180 185 190

ggc aag tac atc atg tcc tac cag cct gat gag gcc ggc aac atg atc 624  
Gly Lys Tyr Ile Met Ser Tyr Gln Pro Asp Glu Ala Gly Asn Met Ile  
195 200 205

tcc ggt ctg gct ggc gcc tcc ggt ggt tgg tac aag gtg aag ggc gac 672  
Ser Gly Leu Ala Gly Ala Ser Gly Gly Trp Tyr Lys Val Lys Gly Asp  
210 215 220

tcc tgg gtc gtc aac acc gag acc gat ggc tcc aag gca acc gct gac 720  
Ser Trp Val Val Asn Thr Glu Thr Asp Gly Ser Lys Ala Thr Ala Asp  
225 230 235 240

ttc tac cag cag ctg ctg gac gcc aag gca gcc acc acc aac ccg cgt 768  
Phe Tyr Gln Gln Leu Leu Asp Ala Lys Ala Ala Thr Thr Asn Pro Arg  
245 250 255

tgg gat ccg tcc ttc gat gca tcc atc aag gat ggc tgg ttg atc ggt 816  
Trp Asp Pro Ser Phe Asp Ala Ser Ile Lys Asp Gly Ser Leu Ile Gly  
260 265 270

act gtg gcc gcc gct tgg gaa gcc ccg ctg ttc atg acc tcc tcc ggt 864  
Thr Val Ala Ala Ala Trp Glu Ala Pro Leu Phe Met Thr Ser Ser Gly  
275 280 285

ggc acc ggc tcc ggc gaa tgg cag gtc gct cag ctg ggt gac tgg ttc 912  
Gly Thr Gly Ser Gly Glu Trp Gln Val Ala Gln Leu Gly Asp Trp Phe  
290 295 300

ggc aac gct ggc aag acc ggc cct gac ggt ggt tcc gcc gtg gcc gtg 960  
Gly Asn Ala Gly Lys Thr Gly Pro Asp Gly Gly Ser Ala Val Ala Val  
305 310 315 320

ES 2 569 659 T3

ctg aag aac tcc aag cac ccg aag gaa gca atg gag ttc ctg gat tgg 1008  
 Leu Lys Asn Ser Lys His Pro Lys Glu Ala Met Glu Phe Leu Asp Trp  
           325          330          335

ttc aac acc cag gtt cct gat ctg gtt tcc cag ggc ctc gtg ccg gct 1056  
 Phe Asn Thr Gln Val Pro Asp Leu Val Ser Gln Gly Leu Val Pro Ala  
           340          345          350

gct acc act gaa gac gct gag act cct tcc gag tgg tcc acc ttc ttc 1104  
 Ala Thr Thr Glu Asp Ala Glu Thr Pro Ser Glu Trp Ser Thr Phe Phe  
           355          360          365

ggt ggt cag gac atc atg aag gaa ttc aag acc gct aac aac aac atg 1152  
 Gly Gly Gln Asp Ile Met Lys Glu Phe Lys Thr Ala Asn Asn Asn Met  
           370          375          380

ggt gac ttc acc tac atg cct ggc ttc tcc gca gtc gcc gcc aag atg 1200  
 Gly Asp Phe Thr Tyr Met Pro Gly Phe Ser Ala Val Ala Ala Lys Met  
 385          390          395          400

aac gaa acc gcc gcc aag gcc acc gat ggc tcc ggc aag gtt gca gac 1248  
 Asn Glu Thr Ala Ala Lys Ala Thr Asp Gly Ser Gly Lys Val Ala Asp  
           405          410          415

atc ttc tcc gac gca cag acc acc tct gtg gat acg ctg aag aac ttc 1296  
 Ile Phe Ser Asp Ala Gln Thr Thr Ser Val Asp Thr Leu Lys Asn Phe  
           420          425          430

ggc ctg tct gtt tcc gag tga 1317  
 Gly Leu Ser Val Ser Glu  
 435

<210> 2

<211> 438

<212> PRT

5 <213> Bifidobacterium longum subsp. longum JCM1217

<400> 2

Met Val Ser Arg Asn Lys Arg Ile Val Ala Ala Phe Ala Ala Val Ala  
 1          5          10          15

Ala Met Gly Met Gly Leu Ala Gly Cys Gly Ser Asp Thr Ala Gly Asp  
           20          25          30

Thr Lys Thr Thr Asp Asp Gly Gly Val Val Asn Ile Thr Tyr Met His  
           35          40          45

Arg Leu Pro Asp Ser Glu Gly Met Thr Leu Val Asn Asp Ile Val Ala  
           50          55          60

ES 2 569 659 T3

Lys Trp Asn Lys Gln His Pro Asp Ile Gln Val Lys Ala Thr Lys Phe  
65                    70                    75                    80

Asp Gly Lys Ala Ser Asp Met Ile Lys Lys Leu Glu Thr Asp Val Lys  
                  85                    90                    95

Ser Gly Glu Ala Pro Asp Leu Ala Gln Val Gly Tyr Ala Glu Leu Pro  
                  100                    105                    110

Glu Val Phe Thr Lys Gly Leu Leu Gln Asp Val Thr Gln Tyr Ala Glu  
                  115                    120                    125

Gln Tyr Lys Asn Asp Phe Ala Ser Gly Pro Tyr Ser Leu Val Gln Val  
                  130                    135                    140

Gly Gly Lys Ala Tyr Gly Leu Pro Gln Asp Thr Gly Pro Leu Val Tyr  
145                    150                    155                    160

Phe Tyr Asn Lys Ala Glu Phe Glu Lys Leu Gly Ile Thr Glu Ile Pro  
                  165                    170                    175

Gln Thr Ala Asp Glu Phe Ile Ala Ala Ala Lys Thr Ala Ala Ala Ala  
                  180                    185                    190

Gly Lys Tyr Ile Met Ser Tyr Gln Pro Asp Glu Ala Gly Asn Met Ile  
                  195                    200                    205

Ser Gly Leu Ala Gly Ala Ser Gly Gly Trp Tyr Lys Val Lys Gly Asp  
210                    215                    220

Ser Trp Val Val Asn Thr Glu Thr Asp Gly Ser Lys Ala Thr Ala Asp  
225                    230                    235                    240

Phe Tyr Gln Gln Leu Leu Asp Ala Lys Ala Ala Thr Thr Asn Pro Arg  
                  245                    250                    255

Trp Asp Pro Ser Phe Asp Ala Ser Ile Lys Asp Gly Ser Leu Ile Gly  
                  260                    265                    270

Thr Val Ala Ala Ala Trp Glu Ala Pro Leu Phe Met Thr Ser Ser Gly  
                  275                    280                    285

ES 2 569 659 T3

Gly Thr Gly Ser Gly Glu Trp Gln Val Ala Gln Leu Gly Asp Trp Phe  
290 295 300

Gly Asn Ala Gly Lys Thr Gly Pro Asp Gly Gly Ser Ala Val Ala Val  
305 310 315 320

Leu Lys Asn Ser Lys His Pro Lys Glu Ala Met Glu Phe Leu Asp Trp  
325 330 335

Phe Asn Thr Gln Val Pro Asp Leu Val Ser Gln Gly Leu Val Pro Ala  
340 345 350

Ala Thr Thr Glu Asp Ala Glu Thr Pro Ser Glu Trp Ser Thr Phe Phe  
355 360 365

Gly Gly Gln Asp Ile Met Lys Glu Phe Lys Thr Ala Asn Asn Asn Met  
370 375 380

Gly Asp Phe Thr Tyr Met Pro Gly Phe Ser Ala Val Ala Ala Lys Met  
385 390 395 400

Asn Glu Thr Ala Ala Lys Ala Thr Asp Gly Ser Gly Lys Val Ala Asp  
405 410 415

Ile Phe Ser Asp Ala Gln Thr Thr Ser Val Asp Thr Leu Lys Asn Phe  
420 425 430

Gly Leu Ser Val Ser Glu  
435

<210> 3

<211> 1488

<212> ADN

5 <213> Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1488)

<223>

10 <400> 3

atg gca caa gtc att aat aca aac agc ctg tcg ctg ttg acc cag aat 48  
Met Ala Gln Val Ile Asn Thr Asn Ser Leu Ser Leu Leu Thr Gln Asn  
1 5 10 15

ES 2 569 659 T3

aac ctg aac aaa tcc cag tcc gct ctg ggc acc gct atc gag cgt ctg 96  
 Asn Leu Asn Lys Ser Gln Ser Ala Leu Gly Thr Ala Ile Glu Arg Leu  
 20 25 30

tct tcc ggt ctg cgt atc aac agc gcg aaa gac gat gcg gca ggt cag 144  
 Ser Ser Gly Leu Arg Ile Asn Ser Ala Lys Asp Asp Ala Ala Gly Gln  
 35 40 45

gcg att gct aac cgt ttt acc gcg aac atc aaa ggt ctg act cag gct 192  
 Ala Ile Ala Asn Arg Phe Thr Ala Asn Ile Lys Gly Leu Thr Gln Ala  
 50 55 60

tcc cgt aac gct aac gac ggt atc tcc att gcg cag acc act gaa ggc 240  
 Ser Arg Asn Ala Asn Asp Gly Ile Ser Ile Ala Gln Thr Thr Glu Gly  
 65 70 75 80

gcg ctg aac gaa atc aac aac aac ctg cag cgt gtg cgt gaa ctg gcg 288  
 Ala Leu Asn Glu Ile Asn Asn Asn Leu Gln Arg Val Arg Glu Leu Ala  
 85 90 95

gtt cag tct gct aac agc acc aac tcc cag tct gac ctc gac tcc atc 336  
 Val Gln Ser Ala Asn Ser Thr Asn Ser Gln Ser Asp Leu Asp Ser Ile  
 100 105 110

cag gct gaa atc acc cag cgc ctg aac gaa atc gac cgt gta tcc ggc 384  
 Gln Ala Glu Ile Thr Gln Arg Leu Asn Glu Ile Asp Arg Val Ser Gly  
 115 120 125

cag act cag ttc aac ggc gtg aaa gtc ctg gcg cag gac aac acc ctg 432  
 Gln Thr Gln Phe Asn Gly Val Lys Val Leu Ala Gln Asp Asn Thr Leu  
 130 135 140

acc atc cag gtt ggt gcc aac gac ggt gaa act atc gat atc gat ctg 480  
 Thr Ile Gln Val Gly Ala Asn Asp Gly Glu Thr Ile Asp Ile Asp Leu  
 145 150 155 160

aag cag atc aac tct cag acc ctg ggt ctg gat acg ctg aat gtg caa 528  
 Lys Gln Ile Asn Ser Gln Thr Leu Gly Leu Asp Thr Leu Asn Val Gln  
 165 170 175

caa aaa tat aag gtc agc gat acg gct gca act gtt aca gga tat gcc 576  
 Gln Lys Tyr Lys Val Ser Asp Thr Ala Ala Thr Val Thr Gly Tyr Ala  
 180 185 190

gat act acg att gct tta gac aat agt act ttt aaa gcc tcg gct act 624  
 Asp Thr Thr Ile Ala Leu Asp Asn Ser Thr Phe Lys Ala Ser Ala Thr  
 195 200 205

ggt ctt ggt ggt act gac cag aaa att gat ggc gat tta aaa ttt gat 672  
 Gly Leu Gly Gly Thr Asp Gln Lys Ile Asp Gly Asp Leu Lys Phe Asp  
 210 215 220

gat acg act gga aaa tat tac gcc aaa gtt acc gtt acg ggg gga act 720  
 Asp Thr Thr Gly Lys Tyr Tyr Ala Lys Val Thr Val Thr Gly Gly Thr  
 225 230 235 240

ES 2 569 659 T3

ggt aaa gat ggc tat tat gaa gtt tcc gtt gat aag acg aac ggt gag 768  
 Gly Lys Asp Gly Tyr Tyr Glu Val Ser Val Asp Lys Thr Asn Gly Glu  
 245 250 255

gtg act ctt gct ggc ggt gcg act tcc ccg ctt aca ggt gga cta cct 816  
 Val Thr Leu Ala Gly Gly Ala Thr Ser Pro Leu Thr Gly Gly Leu Pro  
 260 265 270

gcg aca gca act gag gat gtg aaa aat gta caa gtt gca aat gct gat 864  
 Ala Thr Ala Thr Glu Asp Val Lys Asn Val Gln Val Ala Asn Ala Asp  
 275 280 285

ttg aca gag gct aaa gcc gca ttg aca gca gca ggt gtt acc ggc aca 912  
 Leu Thr Glu Ala Lys Ala Ala Leu Thr Ala Ala Gly Val Thr Gly Thr  
 290 295 300

gca tct gtt gtt aag atg tct tat act gat aat aac ggt aaa act att 960  
 Ala Ser Val Val Lys Met Ser Tyr Thr Asp Asn Asn Gly Lys Thr Ile  
 305 310 315 320

gat ggt ggt tta gca gtt aag gta ggc gat gat tac tat tct gca act 1008  
 Asp Gly Gly Leu Ala Val Lys Val Gly Asp Asp Tyr Tyr Ser Ala Thr  
 325 330 335

caa aat aaa gat ggt tcc ata agt att aat act acg aaa tac act gca 1056  
 Gln Asn Lys Asp Gly Ser Ile Ser Ile Asn Thr Thr Lys Tyr Thr Ala  
 340 345 350

gat gac ggt aca tcc aaa act gca cta aac aaa ctg ggt ggc gca gac 1104  
 Asp Asp Gly Thr Ser Lys Thr Ala Leu Asn Lys Leu Gly Gly Ala Asp  
 355 360 365

ggc aaa acc gaa gtt gtt tct att ggt ggt aaa act tac gct gca agt 1152  
 Gly Lys Thr Glu Val Val Ser Ile Gly Gly Lys Thr Tyr Ala Ala Ser  
 370 375 380

aaa gcc gaa ggt cac aac ttt aaa gca cag cct gat ctg gcg gaa gcg 1200  
 Lys Ala Glu Gly His Asn Phe Lys Ala Gln Pro Asp Leu Ala Glu Ala  
 385 390 395 400

gct gct aca acc acc gaa aac ccg ctg cag aaa att gat gct gct ttg 1248  
 Ala Ala Thr Thr Thr Glu Asn Pro Leu Gln Lys Ile Asp Ala Ala Leu  
 405 410 415

gca cag gtt gac acg tta cgt tct gac ctg ggt gcg gta cag aac cgt 1296  
 Ala Gln Val Asp Thr Leu Arg Ser Asp Leu Gly Ala Val Gln Asn Arg  
 420 425 430

ttc aac tcc gct att acc aac ctg ggc aac acc gta aac aac ctg act 1344  
 Phe Asn Ser Ala Ile Thr Asn Leu Gly Asn Thr Val Asn Asn Leu Thr  
 435 440 445

tct gcc cgt agc cgt atc gaa gat tcc gac tac gcg acc gaa gtt tcc 1392  
 Ser Ala Arg Ser Arg Ile Glu Asp Ser Asp Tyr Ala Thr Glu Val Ser

ES 2 569 659 T3

```

450          455          460
aac atg tct cgc gcg cag att ctg cag cag gcc ggt acc tcc gtt ctg 1440
Asn Met Ser Arg Ala Gln Ile Leu Gln Gln Ala Gly Thr Ser Val Leu
465          470          475          480
gcg cag gcg aac cag gtt ccg caa aac gtc ctc tct tta ctg cgt taa 1488
Ala Gln Ala Asn Gln Val Pro Gln Asn Val Leu Ser Leu Leu Arg
          485          490          495

```

<210> 4

<211> 495

5 <212> PRT

<213> Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium

<400> 4

```

Met Ala Gln Val Ile Asn Thr Asn Ser Leu Ser Leu Leu Thr Gln Asn
1      5      10     15

Asn Leu Asn Lys Ser Gln Ser Ala Leu Gly Thr Ala Ile Glu Arg Leu
20     25     30

Ser Ser Gly Leu Arg Ile Asn Ser Ala Lys Asp Asp Ala Ala Gly Gln
35     40     45

Ala Ile Ala Asn Arg Phe Thr Ala Asn Ile Lys Gly Leu Thr Gln Ala
50     55     60

Ser Arg Asn Ala Asn Asp Gly Ile Ser Ile Ala Gln Thr Thr Glu Gly
65     70     75     80

Ala Leu Asn Glu Ile Asn Asn Asn Leu Gln Arg Val Arg Glu Leu Ala
85     90     95

Val Gln Ser Ala Asn Ser Thr Asn Ser Gln Ser Asp Leu Asp Ser Ile
100    105    110

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

Gln Thr Gln Phe Asn Gly Val Lys Val Leu Ala Gln Asp Asn Thr Leu
130    135    140

Thr Ile Gln Val Gly Ala Asn Asp Gly Glu Thr Ile Asp Ile Asp Leu

```

ES 2 569 659 T3

145            150            155            160  
Lys Gln Ile Asn Ser Gln Thr Leu Gly Leu Asp Thr Leu Asn Val Gln  
                 165                    170                    175  
Gln Lys Tyr Lys Val Ser Asp Thr Ala Ala Thr Val Thr Gly Tyr Ala  
                 180                    185                    190  
Asp Thr Thr Ile Ala Leu Asp Asn Ser Thr Phe Lys Ala Ser Ala Thr  
                 195                    200                    205  
Gly Leu Gly Gly Thr Asp Gln Lys Ile Asp Gly Asp Leu Lys Phe Asp  
                 210                    215                    220  
Asp Thr Thr Gly Lys Tyr Tyr Ala Lys Val Thr Val Thr Gly Gly Thr  
                 225                    230                    235                    240  
Gly Lys Asp Gly Tyr Tyr Glu Val Ser Val Asp Lys Thr Asn Gly Glu  
                 245                    250                    255  
Val Thr Leu Ala Gly Gly Ala Thr Ser Pro Leu Thr Gly Gly Leu Pro  
                 260                    265                    270  
Ala Thr Ala Thr Glu Asp Val Lys Asn Val Gln Val Ala Asn Ala Asp  
                 275                    280                    285  
Leu Thr Glu Ala Lys Ala Ala Leu Thr Ala Ala Gly Val Thr Gly Thr  
                 290                    295                    300  
Ala Ser Val Val Lys Met Ser Tyr Thr Asp Asn Asn Gly Lys Thr Ile  
                 305                    310                    315                    320  
Asp Gly Gly Leu Ala Val Lys Val Gly Asp Asp Tyr Tyr Ser Ala Thr  
                 325                    330                    335  
Gln Asn Lys Asp Gly Ser Ile Ser Ile Asn Thr Thr Lys Tyr Thr Ala  
                 340                    345                    350  
Asp Asp Gly Thr Ser Lys Thr Ala Leu Asn Lys Leu Gly Gly Ala Asp  
                 355                    360                    365

ES 2 569 659 T3

Gly Lys Thr Glu Val Val Ser Ile Gly Gly Lys Thr Tyr Ala Ala Ser  
370 375 380

Lys Ala Glu Gly His Asn Phe Lys Ala Gln Pro Asp Leu Ala Glu Ala  
385 390 395 400

Ala Ala Thr Thr Thr Glu Asn Pro Leu Gln Lys Ile Asp Ala Ala Leu  
405 410 415

Ala Gln Val Asp Thr Leu Arg Ser Asp Leu Gly Ala Val Gln Asn Arg  
420 425 430

Phe Asn Ser Ala Ile Thr Asn Leu Gly Asn Thr Val Asn Asn Leu Thr  
435 440 445

Ser Ala Arg Ser Arg Ile Glu Asp Ser Asp Tyr Ala Thr Glu Val Ser  
450 455 460

Asn Met Ser Arg Ala Gln Ile Leu Gln Gln Ala Gly Thr Ser Val Leu  
465 470 475 480

Ala Gln Ala Asn Gln Val Pro Gln Asn Val Leu Ser Leu Leu Arg  
485 490 495

<210> 5

<211> 22

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> cebador glt-f

<400> 5

ggggtgctga tatattggtt tg 22

10 <210> 6

<211> 31

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> cebador glt-r  
 <400> 6  
 gctcgagctc ggaaacagac aggccgaagt t 31  
 <210> 7  
 5 <211> 33  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> cebador fliC-f  
 10 <400> 7  
 cctcgagatg gcacaagtca ttaatacaaa cag 33  
 <210> 8  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 15 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> cebador fliC-r  
 <400> 8  
 cctcgagtta acgcagtaaa gagaggacg 29  
 20 <210> 9  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 25 <223> cebador pBLES-f  
 <400> 9  
 agggacttga tctgctcatc cag 23  
 <210> 10  
 <211> 28  
 30 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>

<223> cebador pBLES-r  
 <400> 10  
 ttccattaa ataataaac aaaaaaat 28  
 <210> 11  
 5 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> cebador pBLES-f3581  
 10 <400> 11  
 tagttgcgc aacgtgttg cc 22  
 <210> 12  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 15 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> cebador pBLES-r93  
 <400> 12  
 gattcatcac acggtgcctg ac 22  
 20 <210> 13  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 25 <223> cebador pMW 118-f  
 <400> 13  
 atcacgaggc ccttcgtct tc 22  
 <210> 14  
 <211> 24  
 30 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>

<223> cebador pMW118-r  
 <400> 14  
 cctgttctat taggtgttac atgc 24  
 <210> 15  
 5 <211> 31  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> cebador GL-BP-NdeI-f  
 10 <400> 15  
 ccatatgaag tacgttgctt tgtaagggga g 31  
 <210> 16  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 15 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> cebador FliC-NdeI-r  
 <400> 16  
 ccatatgta acgcagtaaa gagaggacg 29  
 20 <210> 17  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 25 <223> cebador ST11  
 <400> 17  
 gccaaaccatt gctaaattgg cgca 24  
 <210> 18  
 <211> 25  
 30 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>

# ES 2 569 659 T3

<223> cebador ST15

<400> 18

ggtagaaatt cccagcgggt actgg

25

Reivindicaciones

1. Un gen para la expresión de una proteína o péptido diana en una superficie de una bifidobacterium, en donde el gen codifica una proteína de fusión de proteína de membrana de unión de sustrato GNB/LNB, de bifidobacterium y la proteína o péptido diana, que están vinculados en este orden desde el terminal-N.
- 5 2. El gen para la expresión de una proteína o péptido diana en una superficie de una bifidobacterium de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la proteína o péptido diana es una proteína antigénica o un péptido antigénico.
3. El gen para la expresión de una proteína o péptido diana en una superficie de una bifidobacterium de acuerdo con la reivindicación 2, en donde la proteína o péptido antigénico es una flagelina de salmonella.
- 10 4. El gen para la expresión de una proteína o péptido diana en una superficie de una bifidobacterium de acuerdo con la reivindicación 2, en donde la proteína o péptido antigénico es una proteína M2 de un virus de la gripe.
5. El gen para la expresión de una proteína o péptido diana en una superficie de una bifidobacterium de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en donde un gen que codifica una proteína que tiene una función de adyuvante está situado entre el gen que codifica una proteína de membrana de unión de sustrato GNB/LNB y el gen que codifica una proteína o péptido diana.
- 15 6. El gen para la expresión de una proteína o péptido diana en una superficie de una bifidobacterium de acuerdo con la reivindicación 5, en donde la proteína que tiene una función de adyuvante es una flagelina.
7. Un plásmido para la expresión génica, que comprende el gen para la expresión de una proteína o péptido diana en una superficie de una bifidobacterium de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en una forma expresable.
- 20 8. Una bifidobacterium transformada, que alberga el plásmido de la reivindicación 7 y que presenta una proteína o péptido diana en una superficie celular.
9. Una bifidobacterium transformada, que comprende en un genoma del gen para la expresión de una proteína o péptido diana sobre una superficie de una bifidobacterium de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en una forma expresable y que presenta la proteína o péptido diana en una superficie celular.
- 25 10. La bifidobacterium transformada de acuerdo con la reivindicación 8 o 9, en donde la proteína o péptido diana es una proteína antigénica o un péptido antigénico o una proteína que tiene una función de adyuvante.
11. La bifidobacterium transformada de acuerdo con la reivindicación 8 o 9, en donde la proteína o péptido diana es una flagelina de salmonella.
12. Una vacuna oral contra la infección por salmonela, que comprende la bifidobacterium transformada de la reivindicación 11.
- 30 13. La bifidobacterium transformada de acuerdo con la reivindicación 8 o 9, en donde la proteína o péptido diana es una proteína M2 de un virus de la gripe.
14. La bifidobacterium transformada de acuerdo con la reivindicación 13, en donde una proteína que tiene una función de adyuvante presentada adicionalmente en una superficie.
- 35 15. La bifidobacterium transformada de acuerdo con la reivindicación 14, en donde la proteína que tiene una función de adyuvante es una flagelina.
16. Una vacuna contra la gripe oral, que comprende la bifidobacterium transformada de una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15.

Fig. 1

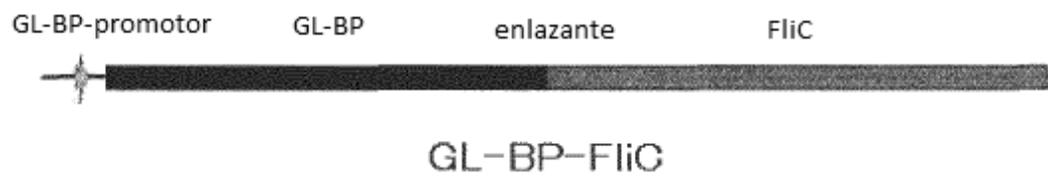
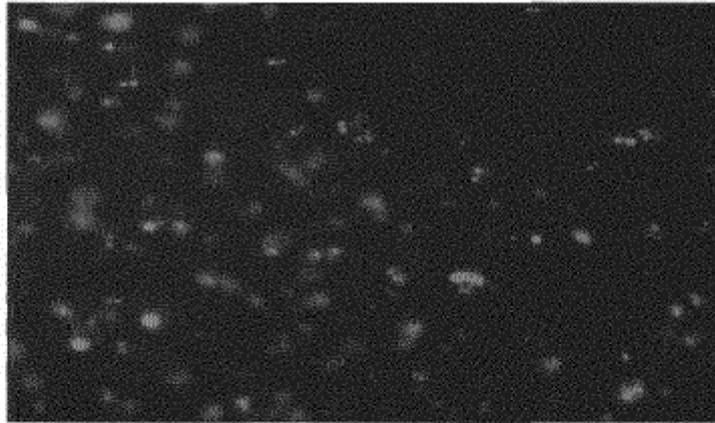


Fig. 2

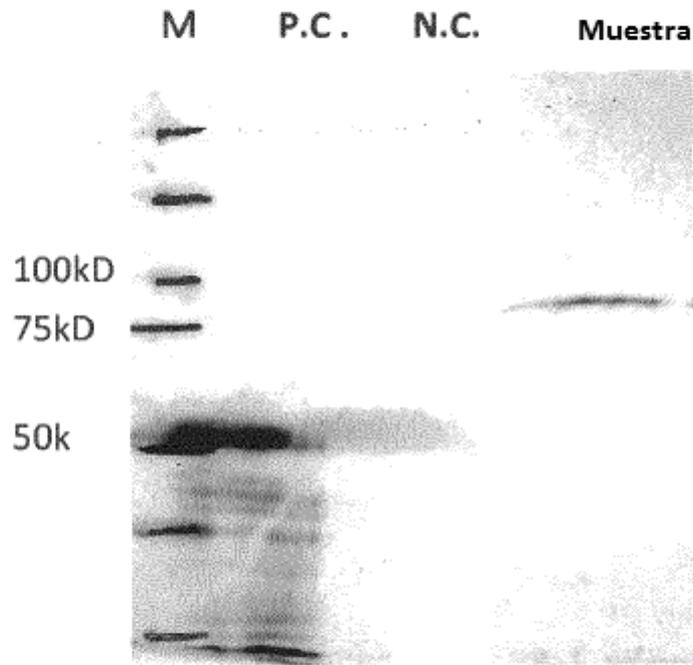
(a)



(b)



Fig. 3



P.C. Control positivo (flagelina derivada de bacteria salmonela)  
N.C. Control negativo (solución de proteína de Bifidobacterium huésped )  
Muestra Solución de proteína de Bifidobacterium transformada  
M Marcador de peso molecular

Fig. 4

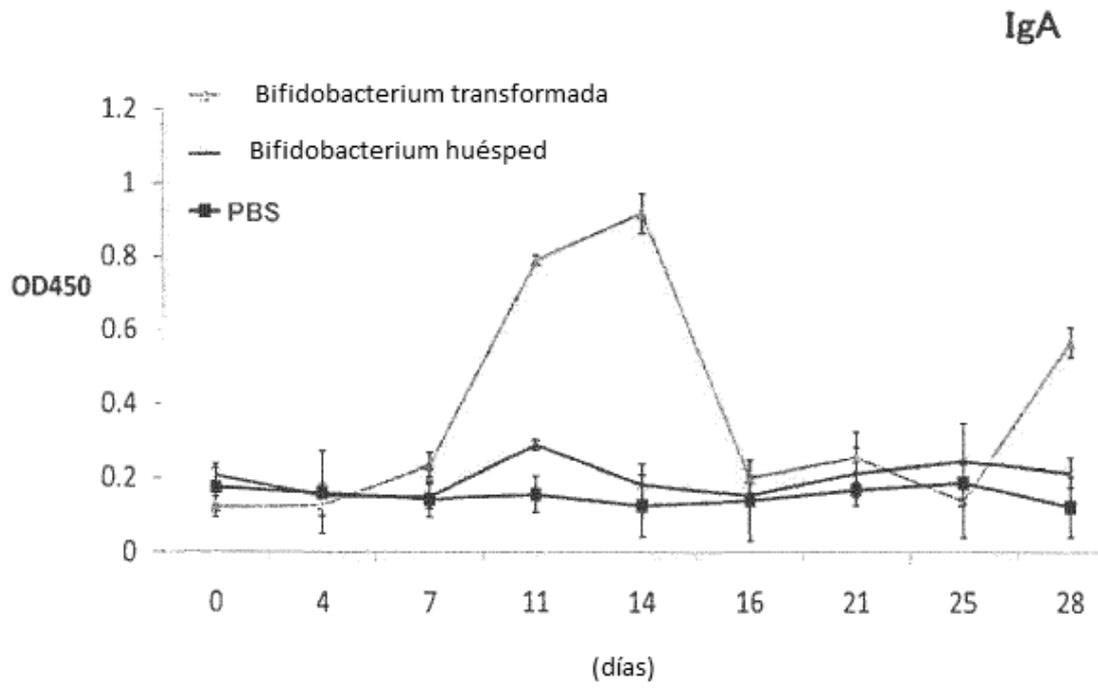


Fig. 5

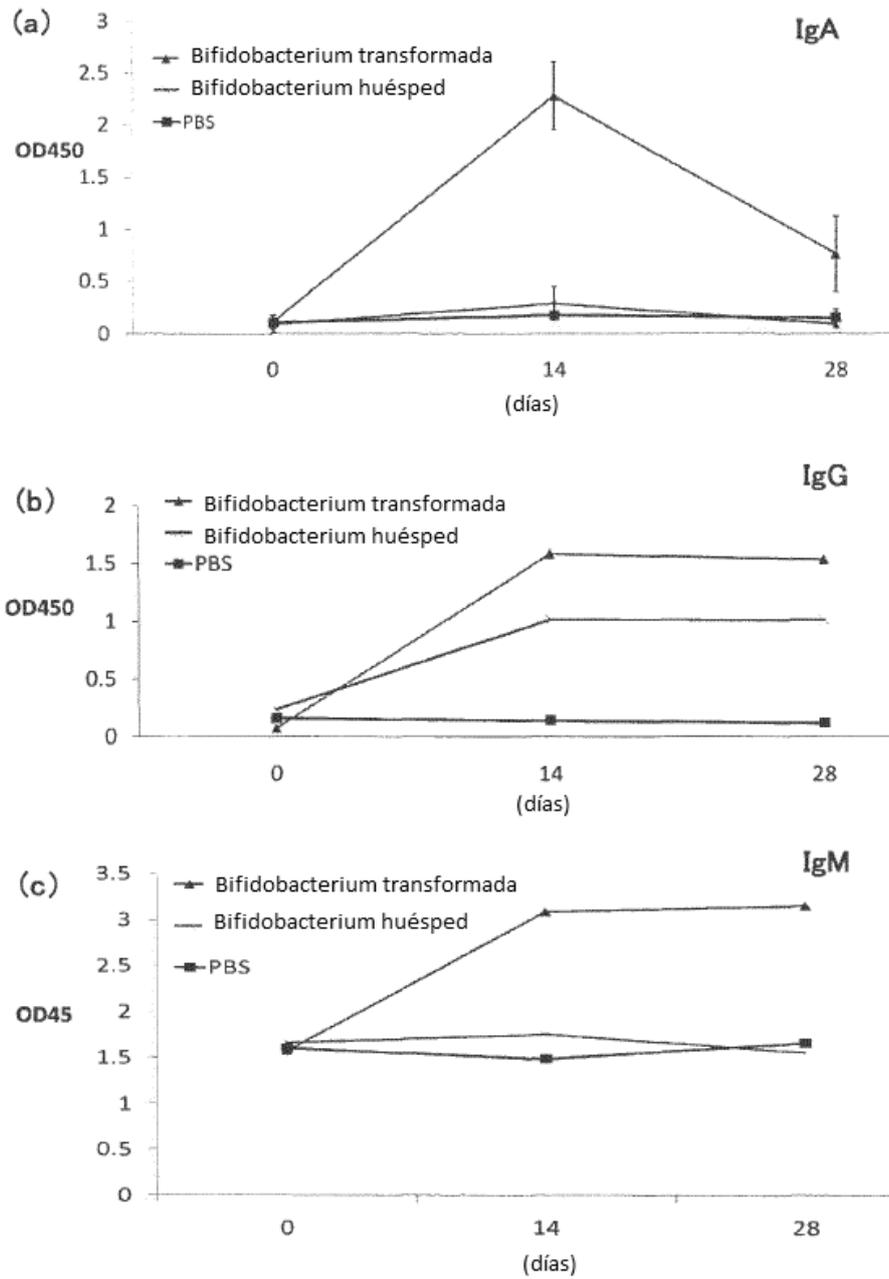


Fig. 6

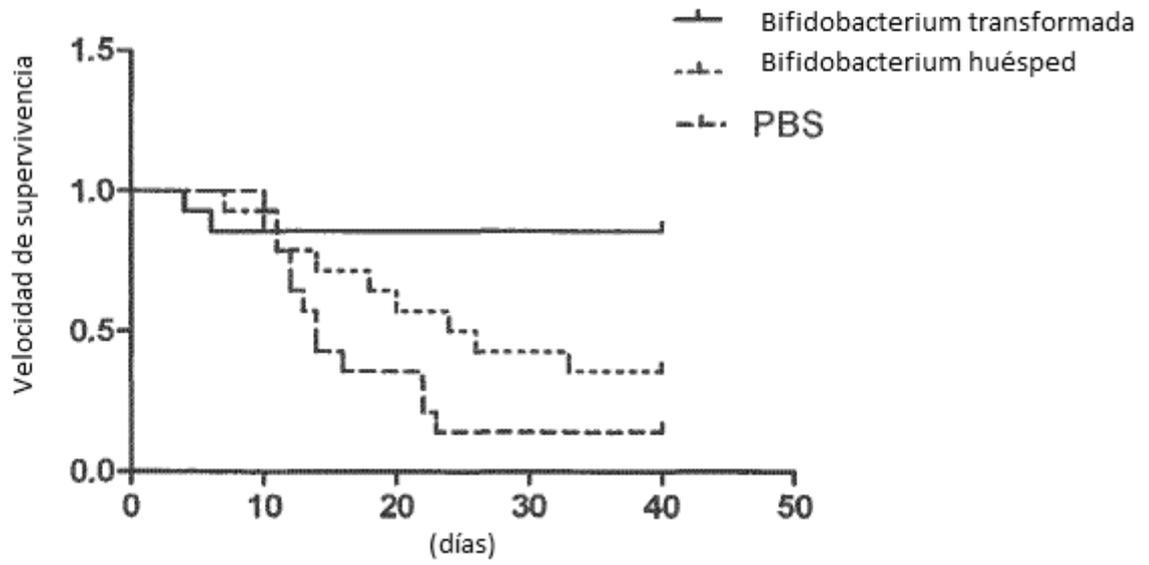


Fig. 7

