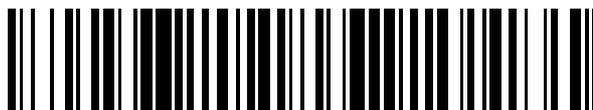


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 628 378**

51 Int. Cl.:

C12N 15/09 (2006.01)

A61K 35/74 (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.04.2009 PCT/JP2009/001768**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.10.2009 WO09128272**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.04.2009 E 09733074 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.03.2017 EP 2274422**

54 Título: **Vector plasmídico**

30 Prioridad:

17.04.2008 US 124528 P

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

02.08.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**SHIMATANI-SHIBATA, YUKO;
SHIMIZU, HITOMI y
YONEKURA, HIROMI**

74 Agente/Representante:

LAHIDALGA DE CAREAGA, José Luis

ES 2 628 378 T3

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

DESCRIPCIÓN

VECTOR PLASMÍDICO

5 CAMPO TÉCNICO

La presente invención se refiere a un vector plasmídico y a una composición farmacéutica o agente terapéutico para agente de tratamiento de tumor sólido que está constituido por una secuencia de ADN representada por la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 4 (pBifiCD).

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

En el campo de la ingeniería genética, fagos, virus animales o vegetales, plásmidos, etc., se usan ampliamente como vectores de expresión para transformar microorganismos. Como transformantes que se transforman y se hacen para expresar una proteína objetivo de un producto génico, *E.coli* levadura, etc., se usan ampliamente. Estos microorganismos transformados tienen como objetivo expresar una proteína objetivo y no se contempla la utilización de los propios microorganismos.

15

20

En los últimos años, con respecto a la utilización de un microorganismo transformado propiamente dicho, un método para tratar un tumor maligno ha estado atrayendo una atención en la que se usa una bacteria anaeróbica transformada como transportador de genes; a modo de ejemplo, se ha propuesto un método para transportar un gen a un sitio de tumor usando *Clostridium* transformado (véase, p.ej., publicaciones de patentes US 6,416,754, US pat. Número 6,652,849, US 2003/0103952) y además, se ha sugerido la aplicación de *Bifidobacterium longum* transformada al tratamiento de tumores sólidos (véase p.ej., Yazawa et al., *Cancer Gene Ther.*, 7, 269-274 (2000) y Yazawa et al., *Breast Cancer Res. Treat.*, 66, 165-170 (2001)).

25

Además, con respecto a una *Bifidobacterium* transformada útil como un transportador de genes para el tratamiento de un tumor sólido, se ha informado que se puede esperar que la *Bifidobacterium longum* transformada para expresar citosina desaminasa (denominada, en lo sucesivo CD) tenga una aplicación en una terapia de enzima-profármaco (véase por ejemplo, JP, A, 2002-97144 y Nakamura et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 66, 2362-2366 (2002), Fujimori et al., *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.*, 5, 200-203 (2002)). CD es una enzima que convierte 5-fluorocitosina (en lo sucesivo denominada 5-FC), que es un profármaco (precursor) de 5-fluorouracilo (en lo sucesivo denominado 5-FU) que tiene una actividad antitumoral, en 5-FU.

30

35

La construcción de dicha bacteria transformada de este tipo requiere un denominado vector de expresión. Sin embargo, puesto que un vector plasmídico derivado de *E.coli* convencionalmente utilizado para transformar *E.coli* en el campo de la ingeniería genética es naturalmente incapaz de replicarse en bacterias distintas de *E.coli*,

40

Es necesaria la construcción de tales bacterias transformadas para el tratamiento de un tumor maligno y las publicaciones de patentes US 6,416,754, US pat nº 6,652,849, US 2003/0103952 informan de los plásmidos lanzaderas pNTR500F, pCD540FT, etc., JP, A, 2002-97144, pBLES100-S-eCD, que pueden transformar a *Bifidobacterium longum* con un rendimiento elevado de más de 100 veces el del plásmido lanzadera pBLES100-S-eCD, que se replican tanto en *E.coli* y *Bifidobacterium*.

45

Además, el plásmido lanzadera pAV001-HU-eCD-M968, que es una variante de un solo nucleótido de plásmido del plásmido lanzadera pAV001-HU-eCD en el que el ADN del gen objetivo insertado en el plásmido lanzadera pAV001 ha sido parcialmente variado, de lo que se ha informado (véase, p.ej., WO 2007-136107).

50

Además, a modo de ejemplo, el plásmido lanzadera pDG7, que se replica tanto en *E.coli* como en *Bifidobacterium*, los plásmidos lanzadera pEBM3 y pECM2, que se replican tanto en *E.coli* como en *Clostridium*, el plásmido lanzadera pLP825, que se replica tanto en *E.coli* y *Lactobacillus*, etc., han sido informados a este respecto (véase p.ej., el documento de Alessandra Argani et al., *Microbiology*; 142: 109-114 (1996).

55

Vía SEQ ID 4 que se recupera de EBI accesión nº GSN: AOD86426 y WO 2007/136107 A, se da a conocer una *Bifidobacterium longum* pAV001HU4 aa-eCD como secuencia de plásmidos. Dentro de la secuencia comprende nucleótidos 1796º a 3391º de SEQ ID: 4 y una composición farmacéutica con un microorganismo del gen *Bifidobacterium* transformada con el plásmido que comprende un gen de citosina desaminasa para el tratamiento de un tumor sólido.

60

Como se ha descrito anteriormente, varios vectores transmídicos utilizados para construir un transformante distinto de *E.coli* han sido informados a este respecto, siendo todos ellos vectores lanzadores que se replican en *E.coli* y una bacteria transformante distinta de *E.coli*, y no existe ningún vector plasmídico conocido que sea capaz de replicarse solamente en una bacteria transformante no *E.coli*.

65

PROBLEMA TÉCNICO

5 En un método para el tratamiento de una enfermedad que se encuentra en un entorno anaeróbico (en lo sucesivo, denominada enfermedad anaeróbica), tal como un tumor sólido o una enfermedad isquémica, utilizando un transportador de gen transformante, se requiere que el transportador de genes a ser utilizado sea un agente no patógeno, obliga al anaerobio que sobrevive y prolifera solamente en tejido enfermo en un estado anaeróbico y no sobrevive ni prolifera en tejido normal que no está en un estado anaeróbico.

10 Además, es extremadamente importante que el gen en el transportador de genes no se transfiera horizontalmente a una bacteria patógena, una bacteria aeróbica o anaerobio facultativo que no sea el transportador de genes y que, incluso si el gen de transformación se transfiera horizontalmente, no se debe replicar en esa bacteria. Debido a lo que antecede, un vector de expresión utilizado para construir un transportador de genes transformantes se replica deseablemente sólo en el transformante y no se replica en una bacteria distinta del transformante, en particular, no es una bacteria patógena, aeróbica o anaerobio facultativo.

15 La mayoría de los vectores de expresión informados hasta ahora han sido vectores lanzadores que se replican tanto en la bacteria transformante como en una bacteria distinta a la bacteria transformante a modo de ejemplo *E.coli* y no son vectores de expresión que se replican sólo en una región no *E.coli* transformante.

20 Es un objeto de la presente invención reducir el riesgo de una transferencia de genes horizontal produciendo un vector no lanzadera en una bacteria anaeróbica. Además, es otro objeto de la presente invención proporcionar un transportador de genes constituido por un microorganismo anaeróbico transformado por el vector de expresión. Una composición farmacéutica que contiene el transportador de genes y un agente para el tratamiento de la enfermedad anaeróbica que contiene la bacteria transformante.

25 SOLUCIÓN AL PROBLEMA

Los problemas se resuelven por las características que figuran en las reivindicaciones 1 a 7.

30 Los presentes inventores han seleccionado previamente un gen que expresa CD, entre proteínas que tienen la actividad de convertir un precursor de sustancia antitumoral en una sustancia antitumoral, como un gen objetivo; a continuación, han construido el plásmido lanzadera pBLES100-S-eCD como un vector plasmídico que tiene el gen objetivo insertado en el mismo, en el que se fusionan un plásmido de *E.coli* que lleva un gen que expresa CD y un plásmido derivado de *Bifidobacterium longum*. Los inventores han encontrado e informado que el *Bifidobacterium longum* 105A/pBLES100-S-eCD generado por recombinación de *Bifidobacterium longum* 105A utilizando lo anterior es prometedor como un transportador de genes útil para el tratamiento de tumores malignos (JP, A, 2002-97144).

35 Con el fin de mejorar todavía más el plásmido fusionado, los presentes inventores han descrito *Bifidobacterium longum* 105A/pAV001-HU-eCD-M968 y un método para su construcción, en el que el plásmido pAV001-HU-eCD-M968, que es un plásmido único-nucleótido del plásmido pAV001-HU-eCD, se produce mediante la variación parcial del ADN del gen objetivo insertado, y *Bifidobacterium longum* 105A se recombina utilizando el anterior (WO 2007-136107). Puesto que todos estos plásmidos son plásmidos lanzaderas que se replican tanto en *Bifidobacterium* como en *E.coli*, cuando se transfieren horizontalmente a *E.coli* por cualquier causa, se replican en *E.coli*.

45 Los presentes inventores han llevado a cabo una investigación intensiva con el fin de resolver los problemas anteriores y han construido el plásmido pBifiCD eliminando pUC ori, que es un fragmento que contiene un origen de replicación para *E.coli* a partir del plásmido anterior pAV001-HU-eCD-M968. Se ha confirmado que una célula competente de *E.coli* JM109 (Takara Bio Inc.) no se transformó con el plásmido pBifiCD de la presente invención mediante un choque térmico y que no había posibilidad de transferencia horizontal.

50 Una bacteria transformada con el plásmido de la presente invención, a modo de ejemplo, *Bifidobacterium longum* 105-A/pBifiCD (El Instituto Nacional de Tecnología y Depósito de Microorganismos de Patentes de Evaluación (NPMD) n° de acceso NITE BP-491), que es una *Bifidobacterium longum* 105-A recombinante que presenta una buena actividad de expresión de CD, y exhibe un efecto marcado de supresión del crecimiento tumoral cuando se usa en combinación con el profármaco 5-FC, que es convertido por dicho CD en la sustancia antitumoral 5-FU, indicando que es prometedor como un excelente agente terapéutico para un tumor sólido.

55 Sorprendentemente, se ha encontrado, además, que esta *Bifidobacterium* recombinante tiene una alta estabilidad de retención de plásmidos y, además, puesto que no contiene un origen de replicación para *E.coli*, incluso si se produce una transferencia horizontal a *E.coli*, no existe la posibilidad de su replicación en *E.coli*. Por lo tanto, la bacteria recombinante es prometedora como un transportador de genes extremadamente seguro y de alta calidad.

En consecuencia, la presente invención se refiere a

65 <1> un vector de expresión que es un vector plasmídico que funciona en un microorganismo anaeróbico, no conteniendo el vector de expresión una unidad de replicación del plásmido que funciona en *E.coli*,

- <2> el vector de expresión según <1>, en donde el microorganismo anaeróbico es una enterobacteria distinta de *E.coli*,
- 5 <3> el vector de expresión según <2>, en donde la enterobacteria distinta de *E.coli* es una enterobacteria seleccionada de entre el grupo constituido por *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* y *Clostridium*,
- 10 <4> el vector de expresión según cualquiera de <1> a <3>, en donde el vector de expresión comprende (1) una unidad de replicación de plásmido que funciona en un microorganismo anaeróbico distinto de *E.coli* y (2) una unidad de expresión de proteínas que comprende un ADN que codifica una proteína que tiene actividad objetivo y un fragmento de ADN que comprende un promotor y un terminador que funcionan en el microorganismo anaeróbico,
- 15 <5> el vector de expresión según <4>, en donde la unidad de replicación de plásmido que funciona en un microorganismo anaeróbico distinto de *E.coli* es una unidad de replicación de plásmido que funciona en un microorganismo anaeróbico seleccionado del grupo constituido por *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* y *Clostridium*,
- 20 <6> el vector de expresión según <5>, en donde la unidad de replicación de plásmido que funciona en un microorganismo anaeróbico distinto de *E.coli* es una unidad de replicación de plásmido que funciona en *Bifidobacterium*,
- <7> el vector de expresión según <6>, en donde la unidad de replicación de plásmido que funciona en *Bifidobacterium* es una unidad de replicación de pTB6 que comprende una región OriV y un gen RepB,
- 25 <8> el vector de expresión según <7>, en donde un gen que codifica la unidad rep pTB6 que comprende la región OriV y el gen RepB es un ADN representado por la secuencia de nucleótidos desde el 1796^o al 3391^o nucleótido de SEQ ID NO:4 o un polimorfismo de un solo nucleótido del mismo,
- 30 <9> el vector de expresión según cualquiera de <4> a <8>, en donde el promotor y el terminador que funcionan en un microorganismo anaeróbico son un promotor y un terminador que funcionan en una bacteria seleccionada del grupo constituido por *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* y *Clostridium*,
- <10> el vector de expresión según <9>, en donde el promotor y el terminado que funcionan en un microorganismo anaeróbico son un promotor y un terminador que funcionan en *Bifidobacterium*,
- 35 <11> el vector de expresión según <10>, en donde el promotor y el terminador que funcionan en *Bifidobacterium* son un promotor y un terminador de un gen que codifica una proteína de unión al ADN de tipo histona que funciona en un *Bifidobacterium*,
- 40 <12> el vector de expresión según <11>, en donde el promotor y el terminador de un gen que codifica una proteína de unión al ADN de tipo histona que funciona en *Bifidobacterium* son un promotor y un terminador de un gen que codifica una histona derivada de *Bifidobacterium* como una proteína de unión al ADN,
- 45 <13> el vector de expresión según <12>, en donde el gen que codifica un promotor y un terminador de un gen que codifica una proteína de unión al ADN de tipo histona es el ADN representado por la secuencia de nucleótidos del 7^o al 367^o y desde el 1676^o al 1789^o nucleótidos de SEQ ID NO:4, respectivamente, o un polimorfismo de un solo nucleótido del mismo,
- <14> el vector de expresión según <4> a <13>, en donde la proteína que tiene actividad objetivo es una proteína que tiene una actividad terapéutica para una enfermedad que está en un entorno anaeróbico,
- 50 <15> el vector de expresión según <14>, en donde la proteína que tiene una actividad terapéutica para una enfermedad que está en un entorno anaeróbico es (a) una proteína que tiene una actividad antitumoral o (b) una proteína que tiene una actividad de convertir un precursor de sustancia antitumoral en una sustancia antitumoral,
- 55 <16> el vector de expresión según <15>, en donde la proteína que tiene una actividad terapéutica para una enfermedad que está en un entorno anaeróbico es una proteína que tiene una actividad de convertir un precursor de sustancia antitumoral en una sustancia antitumoral,
- 60 <17> el vector de expresión según <16>, en donde la proteína que tiene una actividad de convertir un precursor de sustancia antitumoral en una sustancia antitumoral se selecciona de entre el grupo constituido por citosina desminasa, nitroreductasa y beta-glucuronidasa,
- 65 <18> el vector de expresión según <17>, en donde la proteína que tiene una actividad de convertir un precursor de sustancia antitumoral en una sustancia antitumoral es la citosina desminasa,

<19> el vector de expresión según <18>, en donde una codificación de genes para citosina desaminasa es un ADN representado por la secuencia de nucleótidos desde el 395º al 1675º nucleótidos de SEQ ID NO:4 o un polimorfismo de nucleótido único del mismo,

5 <20> el vector de expresión según cualquiera de <4> a <19> que comprende, además, (3) una unidad de gen de actividad de marcador de selección, en donde la actividad de marcador de selección se selecciona de entre el grupo constituido por resistencia a fármacos, resistencia a neomicina, auxotrofia y selectividad del medio de cultivo.

10 <21> el vector de expresión según <20>, en donde la actividad de marcador de selección es una resistencia al fármaco seleccionada del grupo constituido por resistencia a espectinomomicina, resistencia a ampicilina, resistencia a tetraciclina, resistencia a neomicina y resistencia a la kanamicina,

15 <22> el vector de expresión según <21>, en donde la actividad de marcador de selección es una resistencia a la espectinomomicina,

<23> el vector de expresión según <22>, en donde una codificación de ADN para una proteína que presenta una actividad de marcador de selección es una codificación de ADN para espectinomomicina adeniltransferasa,

20 <24> el vector de expresión según <23>, en donde un ADN que comprende una codificación de ADN para espectinomomicina adeniltransferasa y una secuencia de promotor es un ADN representado por la secuencia de nucleótidos desde el 3398º al 4476º nucleótidos de SEQ ID NO:4 o un polimorfismo de nucleótido único del mismo, y

25 <25> el vector de expresión según <24>, que comprende una secuencia de ADN representada por la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:4 (pBif1CD).

Además, la presente invención se refiere a

30 <26> un proceso para construir un vector de expresión, que comprende el procedimiento de la producción de un plásmido lanzadera que comprende (1) una unidad de replicación de plásmido que funciona en un microorganismo anaeróbico distinto de *E.coli* y (2) una unidad de expresión de proteínas que comprende una codificación de ADN para una proteína que tiene una actividad objetivo y un fragmento de ADN que comprende un promotor y un terminador que funcionan en el microorganismo anaeróbico, estando el plásmido lanzadera replicado tanto en *E.coli* como en una bacteria huésped distinta de *E.coli* y retirando del plásmido lanzadera una unidad de replicación de plásmido que funciona en *E.coli*.

35 Además, la presente invención se refiere a

40 <27> un transportador de genes que comprende un microorganismo anaeróbico transformado por el vector de expresión según cualquiera de <1> a <25>,

<28> el transportador de genes según <27>, en donde el microorganismo anaeróbico es una enterobacteria distinta de *E.coli*,

45 <29> el transportador de genes según <28>, en donde la enterobacteria distinta de *E.coli* se selecciona del grupo constituido por Bifidobacterium, Lactobacillus, Enterococcus, Streptococcus y Clostridium,

<30> el transportador de genes según <29>, en donde la enterobacteria distinta de *E.coli* es Bifidobacterium,

50 <31> el transportador de genes según <30>, en donde la Bifidobacterium se selecciona de entre el grupo constituido por Bifidobacterium adolescentis, Bifidobacterium animalis, Bifidobacterium infantis, Bifidobacterium thermophilum, Bi-fidobacterium pseudolongum, Bifidobacterium bifidum, Bifidobacterium breve, y Bifidobacterium longum,

<32> el transportador de genes según <31>, en donde la Bifidobacterium es la Bifidobacterium longum,

55 <33> el transportador de genes según cualquiera de <27> a <32>, en donde es capaz de crecer en un tejido tumoral en un entorno anaeróbico y es capaz de expresar una proteína que tiene una actividad terapéutica para una enfermedad que está en un entorno anaeróbico,

60 <34> el transportador de genes según <33>, en donde es capaz de crecer dentro de un tejido tumoral que está en un entorno anaeróbico y la proteína que tiene una actividad terapéutica para una enfermedad que está en un entorno anaeróbico es (a) una proteína que tiene una actividad antitumoral o (b) una proteína que tiene una actividad de convertir un precursor de sustancia antitumoral en una sustancia antitumoral,

65 <35> el transportador de genes según <34>, en donde es capaz de crecer en un tejido tumoral que está en un entorno anaeróbico y la proteína que tiene una actividad terapéutica para una enfermedad que está en un entorno anaeróbico es una proteína que tiene una actividad de convertir un precursor de sustancia antitumoral en una

sustancia antitumoral,

<36> el transportador de genes según <35>, en donde la proteína que tiene una actividad de convertir un precursor de sustancia antitumoral en una sustancia antitumoral es citosina desminasa, nitroreductasa y beta-glucuronidasa,

<37> el transportador de genes según <36>, en donde la proteína que tiene una actividad de convertir un precursor de sustancia antitumoral en una sustancia antitumoral es la citosina desminasa, y

<38> el transportador de genes según <37>, en donde el transportador de genes es la Bifidobacterium longum 105-A/pBifiCD (el Instituto Nacional de Tecnología y de Evaluación y el Depósito de Microorganismos de Patentes de Evaluación (NPMD) n° de acceso NITE BP-491).

Además, la presente invención se refiere a

<39> una composición farmacéutica que comprende el transportador de genes según cualquiera de <27> a <38>,

<40> una composición farmacéutica que comprende en combinación el transportador de genes según cualquiera de <34> a <38> y un precursor de sustancia antitumoral que se convierte en una sustancia antitumoral mediante una proteína que el transportador de genes es capaz de expresar y que tiene una actividad de convertir el precursor de sustancia antitumoral en la sustancia antitumoral y

<41> la composición farmacéutica según <40>, en donde la proteína que tiene una actividad de convertir el precursor de sustancia antitumoral en la sustancia antitumoral es citosina desminasa y el precursor de sustancia antitumoral es 5-fluorocitosina.

Además, la presente invención se refiere a

<42> un agente terapéutico para un tumor sólido que comprende el transportador de genes según cualquiera de <34> a <38> en una cantidad suficiente para expresar una dosis terapéutica efectiva de una proteína que tiene una actividad antitumoral,

<43> un agente terapéutico para un tumor sólido que comprende, en combinación, el transportador de genes según cualquiera de <34> a <38> en una cantidad suficiente para expresar una proteína que tiene una actividad de convertir un precursor de sustancia antitumoral en una dosis terapéutica efectiva de una sustancia antitumoral, y un precursor de sustancia antitumoral en una cantidad que puede convertirse en una dosis terapéutica eficaz de la sustancia antitumoral, convirtiéndose el precursor de sustancia antitumoral por la proteína que el transportador de genes es capaz de expresar y

<44> el agente de tratamiento de tumor sólido según <43>, en donde la proteína que tiene una actividad de convertir un precursor de sustancia antitumoral en una sustancia antitumoral es citosina desminasa y el precursor de sustancia antitumoral es 5-fluorocitosina.

En la presente invención, un ADN que codifica para (a) una proteína que tiene una actividad antitumoral o un ADN que codifica para (b) una proteína que tiene una actividad de convertir un precursor de sustancia antitumoral en una sustancia antitumoral que puede denominarse en lo sucesivo 'un ADN que codifica para una proteína objetivo'.

Efectos ventajosos de la invención

El vector de expresión de la presente invención no incluye un origen de replicación que funcione en una bacteria, en particular, en *E.coli*, distinta de una bacteria transformante, y es un vector extremadamente seguro que no tiene posibilidad de ser replicado en una bacteria distinta de la bacteria transformada y, en particular, no en una bacteria anaeróbica, patogénica, aeróbica o facultativa, tal como *E.coli*.

Un transportador de genes transformado usando el vector de expresión de la presente invención tiene una alta estabilidad de retención de plásmidos; y, según se describió anteriormente, incluso si el vector se transfirió horizontalmente a una bacteria distinta del transformante, en particular, a una bacteria anaeróbica, patogénica, aeróbica o facultativa, tal como *E.coli*, no existe el riesgo de ser replicado en tal otra bacteria. Por lo tanto, el transportador de genes de la presente invención es prometedor como un transportador de genes de altas seguridad y calidad.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 es un diagrama que muestra una etapa de construcción de un plásmido marcador de selección (pSPCM-pUCori) (etapa 1).

La Figura 2 es un diagrama que muestra una etapa de construcción de un plásmido de proteína de actividad de marcador de selección (pHU-eCDm-SPCM-pUCori) (etapa 2).

La Figura 3 es un diagrama que muestra una etapa de construcción de un plásmido lanzadera (pCDshuttle) (etapa 3).

La Figura 4 es un diagrama que muestra una etapa de construcción del plásmido 'pBifiCD' (Etapa 4).

La Figura 5 es un diagrama que muestra el efecto antitumoral de la cepa de clonación *B. longum* Re-105A/pBifiCD

DESCRIPCIÓN DE LAS FORMAS DE REALIZACIÓN

El vector de expresión de la presente invención es un vector plasmídico que funciona en una bacteria anaeróbica y, en particular, una enterobacteria distinta de *E.coli*, tal como *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* o *Clostridium*, y es un vector de expresión que no contiene una unidad de replicación de plásmido que funciona en una bacteria, en particular *E.coli* distinta de la bacteria transformada.

Más concretamente, es, a modo de ejemplo, un vector de expresión que comprende (1) una unidad de replicación de plásmido que funciona en un microorganismo anaeróbico distinto de *E.coli* y (2) una unidad de expresión de proteínas que comprende un ADN que codifica una proteína que tiene una actividad objetivo y un fragmento de ADN que comprende un promotor y un terminador que funciona en el microorganismo anaeróbico y el vector de expresión no contiene una unidad de replicación de plásmido que funciona en una bacteria distinta de la bacteria transformante, en particular en *E.coli*.

La mayoría de los vectores plasmídicos que se han informado hasta ahora se construyen mediante la fusión de un plásmido derivado de *E.coli* y de un plásmido derivado de una bacteria transformante debido a la información acumulada sobre las técnicas de transfección génica y la seguridad de la transfección. Son vectores lanzadera que funcionan tanto en *E.coli* como en una bacteria transformante, y no son vectores de expresión que funcionan solamente en una bacteria transformante no *E.coli*.

El vector de expresión de la presente invención está caracterizado por cuanto que, a modo de ejemplo, consiste esencialmente en (1) una unidad de replicación de plásmido que funciona en un microorganismo anaeróbico distinto de *E.coli* y (2) una unidad de expresión de proteínas que consiste esencialmente un ADN que codifica para una proteína que tiene actividad objetivo y un fragmento de ADN que comprende un promotor y un terminador que funcionan en el microorganismo anaeróbico, y el vector de expresión no contiene una unidad de replicación de plásmido que funciona en una bacteria distinta de la bacteria transformante, en particular, *E.coli*.

La unidad de replicación de plásmido del vector de expresión de la presente invención que funciona en un microorganismo anaeróbico distinto de *E.coli*, puede ser cualquier unidad de replicación del plásmido, siempre y cuando funcione en un microorganismo anaeróbico distinto de *E.coli*, a modo de ejemplo, en una enterobacteria tal como *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* y *Clostridium*, y siempre y cuando no funcione en un microorganismo anaeróbico distinto de la bacteria transformante; ejemplos de los mismos incluyen una unidad de replicación de los plásmidos que funciona en un microorganismo anaeróbico distinto de *E.coli*, a modo de ejemplo, en *Bifidobacterium*. Ejemplos específicos incluyen una unidad rep de pTB6 que consiste esencialmente en una región OriV y un gen RepB que funciona en *Bifidobacterium*, o un polimorfismo de nucleótido único del mismo. Ejemplos más específicos incluyen un ADN representado por la secuencia de nucleótidos de los nucleótidos 1796° a 3391° de SEQ ID NO:4 o un polimorfismo de un solo nucleótido del mismo.

Además, el promotor y el terminador de la unidad de expresión proteica del vector de expresión de la presente invención pueden ser cualquier promotor y terminador siempre y cuando funcionen en un microorganismo anaeróbico, a modo de ejemplo, en una enterobacteria tal como *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* y *Clostridium*; ejemplos de los mismos incluyen un promotor y un terminador de un gen que codifica una proteína de unión a ADN de tipo histona que funciona en un microorganismo anaeróbico, a modo de ejemplo, un ADN promotor y un terminador de un gen que codifica una unión de ADN similar a histona derivada de la *Bifidobacterium* o un polimorfismo de un solo nucleótido del mismo. Ejemplos específicos incluyen un ADN representado por la secuencia de nucleótidos de los nucleótidos 7° a 367° y desde 1676° a 1786° de SEQ ID NO:4, respectivamente, o un polimorfismo de un solo nucleótido del mismo.

Además, el vector de expresión de la presente invención puede incluir, además, (3) una unidad genética de actividad de marcador de selección. La actividad de marcador de selección poseída por el vector de expresión de la presente invención no está particularmente limitada mientras sea capaz de seleccionar un microorganismo anaeróbico transformado por el vector plasmídico de la presente invención; los ejemplos de los mismos incluyen un marcador de resistencia a fármacos tal como una resistencia a espectinomina, resistencia a ampicilina, resistencia a tetraciclina, resistencia a neomicina o resistencia a kanamicina y auxotrofia así como resistencia a espectinomina, que es preferible.

Ejemplos de la unidad genética de actividad de marcador de selección incluyen, a modo de ejemplo, un ADN que contiene un ADN que codifica una proteína que presenta actividad de resistencia a la espectinomicina o una variante de nucleótido único de la misma y una secuencia promotora de la misma; a modo de ejemplo, un ADN que codifica *Enterococcus faecalis* – espetinomicina adeniltransferasa derivada (en lo sucesivo, denominado casete AAD9) o un polimorfismo de un solo nucleótido del mismo. Unos ejemplos específicos incluyen un ADN representado por la secuencia de nucleótidos de los nucleótidos 3398° a 4476° de SEQ ID NO:4 o un polimorfismo de un solo nucleótido del mismo.

La ‘variante de un solo nucleótido’ referida en la presente invención significa un polimorfismo de un solo nucleótido en el que se ha alterado un nucleótido de al menos un sitio (en lo sucesivo, denominado SNP), e incluye no sólo un SNP en un sitio sino también SNPs en una pluralidad de sitios.

Un gen que se incorpora a la unidad de expresión proteica del vector de expresión de la presente invención puede ser, a modo de ejemplo, cuando el agente terapéutico para una enfermedad anaeróbica de la presente invención se usa como un agente terapéutico para un tumor maligno, cualquier gen siempre y cuando exprese una proteína que tenga actividad antitumoral o una proteína que tenga una actividad de convertir un precursor de sustancia antitumoral en una sustancia antitumoral y siempre que no sea ADN el que inhiba la transformación tal como un ADN gigante (al menos aproximadamente 10 kb) o un ADN que sea tóxico para las células receptoras.

La proteína expresada por dicho gen que tiene actividad antitumoral incluye, a modo de ejemplo, una citoquina, y ejemplos específicos de la citoquina incluyen interferones (IFN)-alpha, beta, y gamma, factor estimulante de colonias de granulocitos macrófagos (GM-CSF), interleucinas (IL)-1 alpha, 1 beta, 2, 3, 4, 6, 7, 10, 12, 13, 15, y 18, factor de necrosis tumoral (TNF)-alpha, linfotóxina (LT)-beta, factor de estimulación de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), factor de inhibición de la migración de macrófagos (MIF), factor inhibidor de leucemia (LIF), factores coestimuladores de activación de células B7 (CD80) y B7-2 (CD86), enlazando KIT y oncostatina M. además, los ejemplos incluyen sustancias supresoras de angiogénesis tales como endostatina, angiostatina y kringles 1, 2, 3, 4 y 5.

Las secuencias de estas proteínas son conocidas para diversos organismos y se puede obtener un ADN que codifica una proteína que tiene actividad antitumoral usada en la presente invención, utilizando una técnica conocida tal como un método de PCR basado en la información de secuencia.

Además, ejemplos de la proteína que tiene una actividad de convertir un precursor de sustancia antitumoral en una sustancia antitumoral incluyen: citosina desaminasa (en adelante denominada CD) que es una enzima que convierte la 5-fluorocitosina (en lo sucesivo 5-FC) en el antitumoral 5-fluorouracilo (en lo sucesivo denominado 5-FU); nitrorreductasa, que es una enzima que convierte la 5-aziridino-2,4-dinitrobenzamida (en adelante, denominada CB1945) en un agente alquilante antitumoral activo; la timidina quinasa del tipo 1 del virus del herpes simple (en adelante, denominada HSV1-TK), que es una enzima que convierte el ganciclovir en un metabolito antitumoral activo; y beta-glucuronidasa, que es una enzima que convierte una sustancia antitumoral activa glucoronizada en una sustancia actividad antitumoral. Los ejemplos preferidos incluyen CD, que es la enzima que convierte la 5-FC en 5-FU.

Un ADN que codifica CD puede ser, a modo de ejemplo, el plásmido pAdex 1 CSCD (RDB nº 1591 de Riken Generación Bank), que contiene ADN que codifica para *E.coli*. CD derivada de, o uno aislado del plásmido pMK116, que contiene de manera similar un ADN que codifica para *E.coli* derivada de CD (D. A. Mead et al., Protein Engineering 1: 67-74 (1986)).

Ejemplos de la codificación de ADN para *E.coli* derivada de CD incluyen un ADN representado por la secuencia de nucleótidos del 395° al 1675 nucleótidos de SEQ ID NO:4 o un polimorfismo de un solo nucleótido del mismo.

Además, cuando el agente terapéutico para una enfermedad anaeróbica de la presente invención se utiliza como un agente terapéutico para una enfermedad isquémica, una proteína que tiene actividad de promoción de angiogénico, que es útil para el tratamiento de una enfermedad isquémica se puede utilizar como un gen incorporado en una unidad de expresión de la proteína del vector de expresión de la presente invención. Los ejemplos específicos incluyen el factor de crecimiento de fibroblasto 2 (FGF2), factor de crecimiento de célula endotelial (ECGF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y factor de crecimiento de hepatocitos (HGF).

De modo similar, las secuencias de estas proteínas son conocidas para varios organismos, y un ADN que codifica para una proteína que tiene una actividad promotora de angiogénica utilizada en la presente invención puede obtenerse mediante la utilización de una técnica conocida, tal como un método de PCR basado en la información de secuencia.

El vector de la presente invención incluye cualquier vector, siempre y cuando se trate de un plásmido que comprende, a modo de ejemplo, una unidad de replicación de plásmido que funciona en un microorganismo anaeróbico distinto de *E.coli*, una unidad de expresión de proteínas que comprende un ADN que codifica para una proteína que tiene actividad objetivo y un fragmento de ADN que contiene un promotor y un terminador que

funcionan en el microorganismo anaeróbico, y una unidad de gen con actividad de marcador de selección, y siempre que el plásmido sea capaz de funcionar dentro de un microorganismo anaeróbico cuando se transforma en el microorganismo anaeróbico, y siempre y cuando el plásmido no contenga una unidad de replicación del plásmido que funciona en una bacteria que no sea la bacteria transformante, en particular, *E.coli*.

5 Los ejemplos incluyen un plásmido construido incorporando en los plásmidos lanzadera pBLES100 (publicación de patente 4), pAV001 (publicación de patente 5), pBRASTA101(Tanaka et al., 2005, Biosci. Biotechnol. Biochem., 69(2): 422-425), pDG7, pEBM3, pECM2, pLP825, etc. (publicación no de patente 5), que han sido informados en las publicaciones, una unidad de expresión de proteínas que comprende un ADN que codifica para una proteína dada
10 que tiene actividad objetivo y un fragmento de ADN que comprende un promotor y un terminador que funcionan en un microorganismo anaeróbico y la eliminación de una unidad de replicación del plásmido que funciona en *E.coli*.

Otros ejemplos de los mismos incluyen los construidos mediante recombinación de una unidad de expresión de la proteína que ha sido incorporada en el plásmido, a modo de ejemplo, pNTR500F, pCD540FT, etc. (publicaciones de patentes 1 a 3), pBLES100-S-eCD (publicación de patente 4), pAV001-HU-eCD (publicación de patente 5), pAV001-HU-eCD-M968 (publicación de patente 6), etc., con otra unidad de expresión de proteína dada y la eliminación,
15 además, de una unidad de replicación del plásmido que funciona en *E.coli*.

Ejemplos específicos del vector de expresión de la presente invención incluyen, a modo de ejemplo, un vector que tiene una unidad de rep pTB6 que comprende un gen RepB y una región OriV que funcionan en una Bifidobacterium como la unidad de replicación del plásmido que funciona en un microorganismo anaeróbico que no sea *E.coli* y un promotor y un terminador de un gen que codifica para una Bifidobacterium proteína de unión a ADN de la histona como derivada del fragmento de ADN que contiene el promotor y un terminador que funcionan en el microorganismo anaeróbico y un ADN que codifica para la enzima CD que convierte 5-FC en 5-FU como el ADN que codifica la
20 proteína que tiene actividad objetivo y un ADN (casete AAD9) que codifica para Enterococcus-faecalis derivada de espectinomicina adeniltransferasa como la unidad génica de actividad de marcador de selección.

Ejemplos más específicos incluyen pBifiCD, que está representado por la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 4.
30

El vector de la presente invención puede construirse, a modo de ejemplo, por el método siguiente.

A modo de ejemplo, el vector de la presente invención puede construirse por:

- 35 (1) construir un plásmido que comprende un origen de replicación de *E.coli*, a modo de ejemplo, pUC ori, y una unidad genética de actividad de marcador de selección, a modo de ejemplo, un casete de AAD9 (en adelante, denominado un plásmido de marcador de selección) (en adelante, denominada Etapa 1),
- 40 (2) la preparación un plásmido lineal del plásmido marcador de selección, enlazándolo con un promotor y un terminador, a modo de ejemplo, un promotor y un terminador de un gen que codifica para una Bifidobacterium derivada de la histona- como proteína de unión a ADN, y (a) una proteína que tiene una actividad antitumoral o (b) una proteína que tiene una actividad de convertir un precursor de la sustancia antitumoral en una sustancia antitumoral, a modo de ejemplo, un fragmento que comprende un CD (en adelante, denominada unidad de expresión de proteínas), para construir un plásmido que tiene una unidad génica con actividad de marcador de
45 selección y una unidad de expresión de la proteína (en adelante, denominada un plásmido de marcador de selección con actividad de proteína) (en adelante, denominada Etapa 2),
- 50 (3) la preparación de un plásmido lineal de este plásmido de proteína con actividad de marcador de selección, enlazándolo con una unidad de replicación del plásmido que funciona en un microorganismo anaeróbico que no sea *E.coli*, a modo de ejemplo, un fragmento de ADN de una unidad de pTB6 rep que comprende un gen RepB y una región OriV que funcionan a partir de una Bifidobacterium (en adelante, denominada una unidad de replicación del plásmido), para construir un plásmido que tiene un *E.coli* origen de replicación y una unidad génica con actividad de marcador de selección, una unidad de expresión de proteínas y una unidad de replicación del plásmido (en adelante, denominado un plásmido lanzadera) (en adelante, denominada Etapa 3),
55 y
- (4) la eliminación del *E.coli* origen de replicación a partir del plásmido lanzadera (en adelante, denominada Etapa 4).

60 El procedimiento de cada etapa se puede llevar a cabo de conformidad con un método conocido descrito en las referencias.

El vector puede ser construido también incorporando, mediante un método estándar, una unidad de expresión de proteína que comprende un ADN que codifica para una proteína dada que tiene actividad objetivo y un fragmento de
65 ADN que contiene un promotor y un terminador que funcionan en el microorganismo anaeróbico anteriormente mencionado –diversos plásmidos lanzadera tales como los plásmidos lanzadera pBLES100 (publicación de patente

4), pAV001 (publicación de patente 5), pBRASTA101 (Tanaka et al., 2005, Biosci. Biotechnol. Biochem., 69(2): 422-425), pDG7, pEBM3, pECM2, pLP825, etc. (publicación no de patente 5) pNTR500F, pCD540FT, etc. (publicaciones de patentes 1 a 3), seguido por la eliminación de modo similar de una unidad de funcionamiento de replicación del plásmido en *E.coli* mediante un método estándar.

Además, de la misma manera que para el plásmido anterior pBifiCD de la presente invención en donde el pUC ori del fragmento que contiene *E.coli* origen de la replicación se elimina desde el plásmido pAV001-HU-eCD-M968 (publicación de patente 6), el vector de la presente invención también puede construirse mediante la eliminación de una unidad de replicación del plásmido que funciona en *E.coli* de los plásmidos pNTR500F, pCD540FT (publicación de patente 1 a 3), pBLES 100-S-eCD (publicación de patente 4), pAV001-HU-eCD (publicación de patente 5), etc.

Además, el vector de la presente invención puede construirse también recombinando una unidad de expresión de proteínas que ha sido incorporada en los plásmidos pNTR500F, pCD540FT (publicaciones de patentes 1 a 3), pBLES100-S-eCD (publicación de patente 4), pAV001-HU-eCD (publicación de patente 5), pAV001-HU-eCD-M968 (publicación de patente 6), etc., con otra unidad de expresión de proteínas dada y luego, retirar de la misma una unidad de replicación del plásmido que funcione en colisión.

El transportador de genes para el tratamiento de una enfermedad anaeróbica de la presente invención puede construirse mediante la transformación de un microorganismo anaeróbico dado que se transforma de acuerdo con un método de ingeniería genética que se conoce usando el vector de expresión de la presente invención.

Puesto que el microorganismo anaeróbico transformado por el vector de expresión de la presente invención se utiliza en un agente para el tratamiento de una enfermedad anaeróbica tal como un tumor sólido, es esencial para este microorganismo anaeróbico ser obligadamente anaeróbico y no patógeno; bacterias patógenas tales como Clostridium o Salmonella se pueden utilizar si se hacen no patógenas, y un anaeróbico facultativo, tal como un Lactobacillus, se puede utilizar si se ha mutado de manera que sea obligadamente anaeróbico.

Los ejemplos preferidos incluyen bacterias anaeróbicas patógenas, siendo las enterobacterias patógenas más preferibles y entre ellas, las bifidobacterias son las más preferibles.

Ejemplos de la bifidobacteria incluyen Bifidobacterium adolescentis, Bifidobacterium animalis, Bifidobacterium infantis, Bifidobacterium thermophilum, Bi-fidobacterium pseudolongum, Bifidobacterium bifidum, Bifidobacterium breve, y Bifidobacterium longum es la más preferible.

Estas bacterias son comercialmente disponibles o fácilmente disponibles a partir de una institución depositaria. A modo de ejemplo, la Bifidobacterium longum ATCC-15707, Bifidobacterium bifidum ATCC-11863, Bifidobacterium infantis ATCC-15697, etc. se puede obtener fácilmente a partir de ATCC (The American Type Culture Collection).

La cepa de cada bacteria no está particularmente limitada, y los ejemplos de la cepa de Bifidobacterium longum incluyen la cepa de Bifidobacterium longum 105-A, la cepa de Bifidobacterium longum aE-194b, la cepa de Bifidobacterium longum bs-601 y la cepa de Bifidobacterium longum M101-2 y entre ellas son preferibles la cepa Bifidobacterium infantis estándar y la cepa de Bifidobacterium longum 105-A.

Ejemplos de la cepa de Bifidobacterium breve incluyen la cepa estándar de Bifidobacterium breve (JCM1192), la cepa de Bifidobacterium breve aS-1 y la cepa de Bifidobacterium breve I-53-8W y entre ellas son preferibles la cepa estándar Bifidobacterium breve y la cepa de Bifidobacterium breve aS-1.

Ejemplos de la cepa de Bifidobacterium infantis incluyen la cepa estándar de Bifidobacterium infantis (JCM1222) y la cepa de Bifidobacterium infantis I-10-5 y entre ellas, son preferibles la cepa estándar de Bifidobacterium infantis y la cepa de Bifidobacterium infantis I-10-5.

Además, ejemplos de la cepa de Bifidobacterium lactentis incluyen la cepa estándar de Bifidobacterium lactentis (JCM1220).

El transportador de genes de la presente invención es un transportador de genes que comprende un microorganismo anaeróbico transformado por el vector de expresión de la presente invención, y no está particularmente limitado siempre que sea capaz de crecer en el tejido que está en un entorno anaeróbico y sea capaz de expresar una proteína que tiene una actividad objetivo, y, además, está teniendo poca o ninguna posibilidad de ser objeto de transferencia horizontal a una bacteria que no sea la transformante, en particular, a un microorganismo patogénico, o aeróbico o anaeróbico facultativo.

Ejemplos preferidos del transportador de genes de la presente invención incluyen un transportador de genes que es capaz de crecer en el tejido tumoral que está en un entorno anaeróbico y es capaz de expresar una proteína que tiene actividad de conversión de un precursor de sustancia antitumoral en una sustancia antitumoral. Ejemplos más preferidos de los mismos incluyen un transportador de genes que comprende Bifidobacterium que es capaz de crecer en el tejido tumoral que está en un entorno anaeróbico y es capaz de expresar una enzima CD que convierte 5-FC en 5-FU. Ejemplos particularmente preferidos incluyen la cepa de Bifidobacterium longum 105-A transformada

por pBifiCD (Bifidobacterium longum 105-A/pBifiCD; NPMD número de referencia NITE ABP-491) depositada con Incorporated Administrative Agency National Institute of Technology y Evaluation Patent Microorganisms Depository (NPMD) (código postal 292-0818, 2-5-8 Kazusakamari, Kisarazu-shi, Chiba-ken, Japón) con número de acceso: NITE BP-491 de fecha 19 de febrero de 2008.

La construcción del transportador de genes de la presente invención puede hacerse de acuerdo con un método descrito en un libro de texto experimental comercial tal como, a modo de ejemplo, Gene Manual (Kodansha), Generación Manipulation Experimental Method, ed. por Yasuyuki Takagi (Kodansha), Clonación molecular, Cold Spring Harbor Laboratory (1982), Clonación molecular 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory (1989), o Methods in Enzymol., 194 (1991).

La composición farmacéutica de la presente invención no está particularmente limitada en tanto que contenga el transportador de genes de la presente invención. Además, el agente terapéutico para una enfermedad anaeróbica de la presente invención no está particularmente limitado en tanto que contenga el transportador de genes de la presente invención.

Además, la composición farmacéutica o el agente terapéutico para una enfermedad anaeróbica de la presente invención pueden contener dos o más del transportador de genes de la presente invención.

Además, la composición farmacéutica o el agente terapéutico para la enfermedad anaeróbica de la presente invención puede utilizarse en combinación con una composición farmacéutica o un agente terapéutico para una enfermedad anaeróbica que contenga distinto al transportador de genes de la presente invención, un compuesto que presente un efecto de tratamiento de enfermedad anaeróbica.

Además, la composición farmacéutica o el agente terapéutico para una enfermedad anaeróbica de la presente invención pueden contener componentes adicionales distintos del transportador de genes de la presente invención en tanto que el efecto de la presente invención no resulte perjudicado. Ejemplos de dichos componentes adicionales incluyen un soporte farmacéuticamente aceptable, un excipiente y un diluyente.

La forma de dosificación de la composición farmacéutica o del gante para el tratamiento de enfermedad anaeróbica de la presente invención no está particularmente limitada, y sus ejemplos incluyen un agente líquido o una preparación sólida que contenga el transportador de genes de la presente invención. El agente líquido puede obtenerse purificando un fluido de cultivo de una bacteria anaeróbica del transportador de genes de la presente invención, añadiéndole, cuando se requiera, una sal fisiológica adecuada, un sustituto de fluido o un aditivo medicinal y rellenando una ampolla, vial, etc. con dicha composición. La preparación sólida puede obtenerse añadiendo un protector adecuado a un agente líquido, rellenado una ampolla, vial, etc., y luego efectuando una liofilización o secado en L, o añadiendo un protector adecuado a un agente líquido, liofilizando o con secado en L y luego rellenando una ampolla, vial, etc. Con respecto a un método para administrar una composición farmacéutica o el agente para el tratamiento de la enfermedad anaeróbica de la presente invención, son posibles tanto la administración oral como la parenteral, pero es preferible la administración parenteral y, a modo de ejemplo, la inyección intravenosa, la inyección subcutánea, la infusión local o la administración intracerebroventricular son posibles, siendo la inyección intravenosa la más preferible.

La dosis del transportador de genes de la composición farmacéutica o del agente de tratamiento de la enfermedad anaeróbica de la presente invención no está particularmente limitada, siempre y cuando sea una cantidad suficiente para el crecimiento en un sitio de enfermedad anaeróbica y creciendo para expresar una dosis terapéutica eficaz de una proteína activa. Sin embargo, desde un punto de vista económico y para la finalidad de minimizar los efectos secundarios, la dosis es preferentemente lo más pequeña posible dentro de un margen que pueda proporcionar un efecto terapéutico requerido.

La dosis del transportador de genes en la composición farmacéutica o el agente terapéutico para una enfermedad anaeróbica de la presente invención se selecciona adecuadamente dependiendo de la gravedad de la enfermedad y del peso, edad o género de un paciente y se puede aumentar o disminuir adecuadamente en función del grado de mejora.

A modo de ejemplo, cuando el agente de tratamiento de la enfermedad anaeróbica de la presente invención se utiliza como un agente de tratamiento de un tumor sólido, la dosis se determina adecuadamente en función de la actividad antitumoral exhibida por el propio microorganismo anaeróbico, el tipo de proteína que tiene actividad antitumoral producida por el microorganismo anaeróbico utilizado, la dosis terapéutica efectiva de la sustancia antitumoral convertida desde el precursor de sustancia antitumoral, la cantidad de proteína activa producida por el microorganismo anaeróbico utilizado, etc.

Más concretamente, en el caso de administración intravenosa, puesto que es particularmente necesario reducir un riesgo tal como una embolización debida a una masa de bacterias, es preferible utilizar una inyección en una concentración tan baja como sea posible, dividir la inyección en una pluralidad de inyecciones o diluir la inyección con una sustitución de fluido adecuada y administrada mediante una infusión continua. A modo de ejemplo, en el

caso de un adulto, 10^6 a 10^{12} ufc por kg de peso corporal por día de las células del microorganismo anaeróbico de la presente invención son administradas divididas en 1 a una pluralidad de veces, y sucesivamente o en intervalos según sea apropiado durante 1 día a una pluralidad de días. Más concretamente, 1 a 1000 mL por adulto de una preparación que contiene 10^4 a 10^{10} ufc/mL de células del microorganismo anaeróbico de la presente invención, se administra, directamente o diluido con un sustituto de fluido adecuado, y dividido en uno a una pluralidad de veces por día para 1 o varios días sucesivos.

Además, en el caso de administración local que implique la administración directa al tejido enfermo, puesto que se requiere que las células bacterianas colonicen y proliferen en el tejido enfermo completo en la mayor medida posible, es deseable administrar una inyección de alta concentración en una pluralidad de posiciones del tejido enfermo. A modo de ejemplo, en el caso de un adulto, 10^6 a 10^{12} ufc por kg de peso de las células del microorganismo anaeróbico de la presente invención se administran una vez o una pluralidad de veces por día y sucesivamente o a intervalos, si fuere adecuado, durante un día a una pluralidad de días según necesidad. Más concretamente, 1 a 1000 mL por adulto de una preparación que contiene 10^4 a 10^{10} ufc/mL de las células del microorganismo anaeróbico de la presente invención se administra de forma directa, preferentemente una vez a una pluralidad de veces por día y sucesivamente para uno a varios días según necesidad.

Cuando se observa que las bacterias en el tejido enfermo han desaparecido durante el período de tratamiento, el tratamiento se suspende en primer lugar y después se administran bacterias de nuevo de la misma manera que anteriormente.

Cuando el transportador de genes o el agente de tratamiento para la enfermedad anaeróbica de la presente invención es una bacteria anaeróbica en la que se inserta un gen que es capaz de expresar una proteína que tiene una actividad de convertir un precursor de sustancia antitumoral en una sustancia antitumoral, la composición farmacéutica o el agente terapéutico para un tumor sólido de la presente invención que contiene el transportador de genes como un componente activo se utiliza en una combinación con una cantidad de un precursor de sustancia antitumoral que puede convertirse en una cantidad efectiva de una sustancia antitumoral mediante la proteína expresada por el transportador de genes. Este precursor de sustancia antitumoral puede contenerse en la composición farmacéutica o el agente terapéutico para un tumor sólido que contiene el transportador de genes de la presente invención como un componente activo, pero se utiliza preferentemente como una composición farmacéutica que contiene el precursor de sustancia antitumoral en combinación con una composición farmacéutica o agente terapéutico para un tumor sólido que contiene el transportador de genes de la presente invención como un componente activo.

El precursor de sustancia antitumoral utilizado en la presente invención no está particularmente limitado en tanto que sea un precursor de sustancia antitumoral que tenga pocos efectos secundarios sobre el tejido normal en el estado de precursor (profármaco) y tenga un alto efecto terapéutico sobre los tumores sólidos como el objetivo para el tratamiento después de convertirse en una sustancia antitumoral. Los ejemplos incluyen 5-FC, que es un profármaco de 5-FU; CB1945, que se convierte en un agente alquilante antitumoral activo; ganciclovir, que se convierte en un metabolito antitumoral activo y una sustancia activa antitumoral glucuronidada.

De este modo, cuando la composición farmacéutica o el agente terapéutico para un tumor sólido de la presente invención se utiliza en combinación con un precursor de sustancia antitumoral, el método para la administración de la composición farmacéutica o el agente terapéutico para un tumor sólido de la presente invención puede ser el mismo o diferente del método para administrar la composición farmacéutica que contiene el precursor de sustancia antitumoral, y estas administraciones pueden realizarse al mismo tiempo o en tiempos separados; la administración de la composición farmacéutica que contiene el precursor de sustancia antitumoral se realiza preferentemente después de permitir que transcurra un tiempo suficiente para que el transportador de genes de la presente invención tenga crecimiento en las células tumorales después de que se administre la composición farmacéutica o el agente de tratamiento de tumor sólido de la presente invención.

Además, cuando la composición farmacéutica o el agente terapéutico para un tumor sólido de la presente invención se utiliza en combinación con un precursor de sustancia antitumoral, puesto que un transportador de genes coloniza y prolifera solamente en tejido de células tumorales que están en un entorno anaeróbico y proporciona localmente una proteína activa, en comparación con un método para el tratamiento de un tumor sólido que utiliza un precursor de sustancia antitumoral normal, se pueden suprimir en gran medida los efectos secundarios, y la dosis del precursor de sustancia antitumoral puede establecerse en un margen amplio.

La forma de la composición farmacéutica que contiene un precursor de sustancia antitumoral no está particularmente limitada y puede ser cualquiera de una preparación oral normal tal como polvo, pastillas o capsulas o una preparación parenteral tal como supositorio o inyección. Dicha composición farmacéutica puede obtenerse en un método farmacéutico normal.

La dosis del precursor de sustancia antitumoral puede seleccionarse adecuadamente en conformidad con la tasa de crecimiento en el tejido tumoral del transportador de genes utilizado en combinación y la eficiencia de la conversión del precursor de sustancia antitumoral en la sustancia antitumoral. Del mismo modo que para la dosis del

transportador de genes, puede seleccionarse como adecuada en función de la gravedad de la enfermedad y del peso, edad o género de un paciente y puede aumentarse o disminuirse según sea adecuado de conformidad con el grado de mejora.

5 A modo de ejemplo, en un tratamiento real, la dosis se establece adecuadamente en función de los tipos de precursor de sustancia antitumoral que se utilizan y de la sustancia antitumoral convertida, la dosis terapéutica efectiva de la sustancia antitumoral convertida a partir del precursor de sustancia antitumoral, el tipo de proteína activa obtenida por un microorganismo anaeróbico que tiene la actividad de conversión del precursor en la sustancia antitumoral en la sustancia antitumoral y la cantidad de proteína activa obtenida por el microorganismo anaeróbico utilizado, etc.

Más concretamente, cuando una composición farmacéutica que contenga como componente activo *Bifidobacterium longum* 105-A/pBifiCD (NITE BP-491) que tenga un gen CD inducido, que sea un transportador de genes de la presente invención, y una composición farmacéutica que contenga como un componente activo el precursor de sustancia antitumoral 5-FC se administran en combinación, después de que se confirme que las bacterias han colonizado y proliferado en el tejido tumoral y las bacterias han desaparecido de la sangre y del tejido normal, se administra 5-FC en la dosis de 1 a 100 mg/día por kg de peso de un adulto una vez o una pluralidad de veces por día sucesivamente durante un período de tratamiento. El método de administración es preferentemente la administración oral, pero puede realizarse una administración parenteral tal como una administración intravenosa o administración anal.

'En una combinación de X e Y' referida a la presente invención se incluye un caso en el que X e Y son configuraciones diferentes y un caso en el que X e Y están en la misma configuración (p.ej., una configuración que contenga X e Y). Cuando X e Y están en configuraciones diferentes, X e Y pueden contener además, cada una de ellas, otro componente.

La composición farmacéutica o el agente terapéutico para una enfermedad anaeróbica de la presente invención puede aplicarse a una enfermedad que esté en un entorno anaeróbico, y preferentemente, para varios tipos de cánceres sólidos. Ejemplos del cáncer sólido incluyen cáncer de intestino grueso, tumor cerebral, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de esófago, cáncer de estómago, cáncer de hígado, cáncer de vesícula biliar, cáncer del conducto biliar, cáncer de páncreas, cáncer de células de los islotes, cáncer coriónico, cáncer de colon, cáncer de células renales, cáncer de la corteza suprarrenal, cáncer de vejiga, cáncer testicular, cáncer de próstata, tumor testicular, cáncer de ovarios, cáncer de útero, cáncer de tiroides, tumor carcinoide maligno, cáncer de piel, melanoma maligno, osteosarcoma, sarcoma de tejido blando, neuroblastoma, tumor de Wilms, retinoblastoma, melanoma y cáncer escamoso.

Además, ejemplos de otras enfermedades que están en un entorno anaeróbico incluyen enfermedades isquémicas tales como infarto cardíaco o arteriosclerosis ocliterante y enfermedades isquémicas de los miembros inferiores, tales como la enfermedad de Buerger.

Ejemplos

La presente invención se explica más concretamente a continuación haciendo referencia a los denominados Ejemplos de referencia y ejemplos, pero el alcance técnico de la presente invención no está limitado a estos ejemplos.

Ejemplo de referencia 1

Preparación de plantilla de ADN

La concentración de ADN plasmídico utilizado como una plantilla en cada ejemplo fue ajustada a 10 pg/microlitro utilizando 0.1x TE y guardada en un frigorífico a 30° centígrados hasta su uso. Cada ADN plasmídico se utiliza como una plantilla según se indica en la tabla 1.

Tabla 1 - Componentes plasmídicos y funciones en el nuevo plásmido

Plásmido		- Función en el nuevo plásmido
Nombre	Componente	
pBLES100	Casete AAD 9	Gen de resistencia a SPCM (que contiene espectinomicina adeniltransferasa CDS, su promotor, región de unión a ribosoma, terminador)
pBLES100	pTB6 (OriV y RepB)	Unidad de replicación en <i>Bifidobacterium longum</i>
pBluescript II SK+	pUC ori	Origen de replicación en <i>Escherichia coli</i>
pAV001-HU-eCD-M968	Desde el promotor de HU al	Gen de CD (que contiene un promotor HU, región de unión

	terminador HU	de ribosoma, HU-eCD-M968 CDS, terminador

Ejemplo de referencia 2

Preparación de cebador

5 Cada cebador utilizado para amplificación de PCR y para comprobación se disolvió utilizando 0.1x TE para proporcionar una solución de reserva 100 micromolar. Dicha solución fue diluida, además, con 0.1x TE para obtener una solución de cebado 20 micromolar. Fue guardada en un frigorífico a -30° centígrados hasta su uso. Los
 10 cebadores utilizados se indican en la tabla 2 siguiente.

Tabla 2 Cebadores para construcción y comprobación de plásmidos

Nombre del cebador	Secuencia (5'→ 3')	Finalidad
pUCori_F1	<u>AGAGAGATCTTGAGCAAAGGCCAG</u> <i>BqI II</i>	
pUCori_R1	GAGACTAGTACTCGAGAAGGATCCGTAGAAAAGATCAAAG <u>G</u> <i>Bcu I Xho I BamH I</i>	Amplificar pUC ori
AAD9_F1	AGAACTAGTAGAAAAGCTTAGAGTCGACTCGATTTTCGTTCG <u>TG</u> <i>Bcu I Hind III Sal I</i>	Amplificar AAD9
AAD9_R1	GAGAGATCTAAAAAATTGAAAAAGTGTTCACC <i>BqI II</i>	
HUeCD_F3	AAGAGATCCGTCTTCCTGCTGGCCTATGC <i>BamHI</i>	
HUeCD_R1	AGAACTAGTCCGGAATAATACGGTTGGAC <i>Bcu I</i>	Amplificar HU-eCD-M96 8
HUeCD interior R1	GCTACGAGCAGAAGGTCAACGTTTGTAAATCGATGG	
HUeCD_interior F1	CGATTACAAACGTTGACCTTCTGCTCGTAGCCGATTACTTCG	
OriV-Rep_exterior_F1	AGAACTAGTCTCCAGGACCTCGTCTACG <i>Bcu I</i>	
OriV-Rep_exterior_R1	AGAGTCGACAAGCCCCGAACAGGTGAAGGC <i>Sal I</i>	Amplificar OriV-Rep
OriV-Rep_interior_F1	CCGTTGAAGCCGGGGAGTGCCGTTTCTGCGCGTTTGAC	*1
OriV-Rep_interior_R1	GAAACGGCACTCCCCGGCTTCAACGGTGCCGTCGAAGTG	*1
Cebador de comprobación F1	TGACTTAGAGGAATTACTACCTG	
Cebador de comprobación R2	AAAGTGGCGGAAAGCGCCAC	

*1: Destruyendo sitio de unión de ribosoma putativo y codón de inicio de traslación putativa de miembro B

Ejemplo de referencia 3

5

Electroforesis de gel de agarosa

Una electroforesis de gel de agarosa en cada ejemplo siguiente se realizó como sigue.

10

Una muestra fue diluida en el orden de 10 veces utilizando 0.1x TE cuando fuere necesario y sometida a electroforesis utilizando 0.8 % o 2 % de gel de agarosa para su análisis y solución tampón de 1x TBE (que contiene 0.5 microgramos/mL de bromuro de etidio). La concentración del gel de agarosa se determinó en función del tamaño de la muestra de ADN. Sometiendo un marcador de peso molecular de ADN a electroforesis al mismo tiempo en un conducto diferente, se comprobó el tamaño de ADN de la muestra.

15

Quando fue necesario medir cuantitativamente una muestra, se utilizó un marcador cuantitativo tal como FastRuler DNA Ladder, gama baja (Fermentas), o FastRuler DNA Ladder, gama media (Fermentas). La cantidad de cada banda del marcador cuantitativo estuvo en el orden de 5 ng a 50 ng. Después de la electroforesis, el gel fue irradiado con rayos UV y la concentración de ADN de la muestra fue estimada comparando la concentración de ADN del marcador cuantitativo y la concentración de la muestra.

20

Ejemplo 1

Construcción del plásmido de marcador de selección (pSPCM-pUCori) (Etapa 1)

25

El plásmido pSPCM-pUCori fue construido en conformidad con el procedimiento siguiente.

(1) Preparación de fragmento de pUC ori (aproximadamente 700 bp)

30

Examen de las condiciones para amplificación de PCR de pUC ori

Utilizando pBluescript II SK+ como plantilla, se preparó una mezcla de PCR sobre hielo añadiendo, a un tubo PCR de 0.2 mL esterilizado (Bio-BIK), 5 microlitros de 10 pg/microlitro pBluescript II SK+, 10 microlitros de 5x PrimeStar™ de solución tampón, 4 microlitros de una mezcla dNTP (2.5 M cada una), 0.5 microlitros de un cebador pUCori-F1 20

ES 2 628 378 T3

micromolar, 0.5 microlitros de un cebador pUCori-R1 20 micromolar, 0.5 microlitros de polimerasa de ADN PrimeSTAR^{HS} y 29.5 microlitros de agua purificada estéril.

- 5 Un ciclador térmico fue establecido bajo las condiciones siguientes, después de que la temperatura del bloque alcanzará 98 grados centígrados, el tubo fue colocado y se realizó PCR.

Fórmula 1

Desnaturalización	98 °C 10 seg.	} x 30 ciclos
Hibridación	45 °C 5 seg.	
Extensión	72 °C 40 seg.	
	72 °C 60 seg.	
	4 °C ∞	

- 10 1 microlitro y 3 microlitros de la mezcla de reacción después de la terminación de PCR se sometieron a la electroforesis de gel de agarosa presentada en el Ejemplo de referencia 3, comprobando así el producto de PCR. A modo de gel se utilizó un gel de agarosa analítica al 2 %.
- 15 A partir del resultado del análisis del gel de agarosa, se confirmó que había una amplificación de una banda única objetivo en aproximadamente 700 bp y el rendimiento fue de 1 microgramo.

PCR adicional

- 20 Se realizó una PCR adicional bajo las condiciones anteriormente establecidos para 5 tubos, y en total, se obtuvo aproximadamente 10 microgramos de producto de PCR.

Purificación (eliminación de proteína y concentración)

- 25 Después de que se combinaron todas las mezclas de reacción de PCR, se purificaron utilizando un kit de purificación de PCR QIAquick (Qiagen), y se eliminaron el cebador y la proteína mediante un método estándar. Para la elución de ADN, se utilizó 50 microlitros de 0.1x TE. El producto de PCR purificado fue diluido con 0.1x TE y cuantificado utilizando la electroforesis del gestión del agarosa. A modo de gel, se utilizó gel de agarosa analítica al 2 %.

- 30 Tratamiento del producto de PCR con enzima de restricción

El producto de PCR purificado fue segmentado como sigue utilizando enzimas de restricción Bcu I y Bgl II.

- 35 10 microlitros de 10x buffer O (solución tampón incluida con enzima) y 55 unidades de Bgl II se añadieron a 5 microgramos del producto de PCR purificado y la cantidad total fue elevada a 100 microlitros utilizando 0.1x TE. Después de la incubación a 37° C durante 2 horas, se eliminó la proteína de conformidad con un método descrito en el Ejemplo de referencia 4. Se añadieron 30 microlitros de 10x Buffer Tango (solución tampón incluida con enzima) y 255 unidades de Bcu I, y la cantidad total fue elevada a 300 microlitros utilizando 0.1x TE. Después de la incubación a 37° C durante 2 horas, la mezcla fue purificada utilizando un kit de purificación de PCR QIAquick (Qiagen) y eluida con 50 microlitros de 0.1x TE.

Fraccionamiento mediante gel de agarosa y excisión

- 45 El producto de PCR segmentado con la enzima de restricción y 1/10 de su cantidad de 10x Loading buffer (Takara Bio Inc.) se mezcló a fondo para obtener una muestra para electroforesis. Un gel de agarosa al 2 % para purificación fue establecido en un vaso de electroforesis (Mupid, Cosmo Bio Co., Ltd.) cargado con una solución tampón 1x TAE buffer (con 0.5 microgramos/mL de bromuro de etilico), se aplicó la muestra de electroforesis y se realizó la electroforesis a 50 V en un recinto a baja temperatura (establecido a 4° C). Un marcador de peso molecular (FastRuler DNA ladder, gama baja, Fermentas) fue utilizado en una vía separada al mismo tiempo.

- 55 La movilidad del ADN fue determinada irradiando el gel de agarosa con radiación UV a 365 nm utilizando un monitor portátil de UV (UVP). 130 minutos después de iniciar la electroforesis, cuando una banda objetivo a aproximadamente 700 bp alcanzó una posición a la mitad aproximada a lo largo del gel, se finalizó la electroforesis y el gel fue extraído del vaso de electroforesis.

Mientras era objeto de irradiación el gel con UV a 365 nm, la banda del ADN objetivo fue objeto de excisión utilizando una cuchilla quirúrgica esterilizada (Sterile Surgical Blades, Ruettgers HmbH & Co. KG). El gestión objeto de excisión fue finamente segmentado y colocado en un microtubo de 2 mL esterilizado, cuyo peso fue medido por

anticipado.

Elución del ADN desde gel de agarosa

5 El peso del microtubo de 2 mL con el gel objeto de excisión fue medido y el peso del gel fue calculado restando el peso premedido del tubo vacío. Se extrajo el ADN a partir del gel utilizando un kit de extracción de gel QIAquick de conformidad con las instrucciones del producto. En la elución del ADN en la etapa final se utilizaron 50 microlitros de 0.1x TE.

10 Parte del producto de PCR purificado fue diluido en 10 veces con 0.1x TE, y el producto de PCR purificado fue analizado de forma cuantitativa utilizando un espectrofotómetro. La electroforesis del gen de agarosa se utilizó realizando un gel de agarosa analítico al 2 %.

15 Con respecto al fragmento del ADN sometido al tratamiento de enzimas de restricción del producto de PCR, la excisión del fragmento del ADN a partir del gel de agarosa y su purificación, fue confirmado que proporcionó una banda única en el análisis del gel de agarosa. Además, a partir del resultado de la medición de la concentración mediante la medida del ADN utilizando un absorciómetro, la concentración fue de 66 ng/microlitros. Además, la relación de A260/280, que indica la pureza, fue de 1.911.

20 (2) Preparación de fragmento de AAD 9 (aproximadamente 1.1 kbp)

Examen de condiciones para la amplificación de PCR de gen AAD 9

25 Utilizando pBLES100 a modo de plantilla, se preparó una mezcla de PCR sobre hielo añadiendo, a un tubo de PCR de 0.2 mL esterilizado (Bio-BIK), 5 microlitros de 10 pg/microlitros pBLES100, 10 microlitros de solución tampón de 5x PrimeStar™, 4 microlitros de una mezcla dNTP (2.5 mM cada una), 0.5 microlitros de cebador AAD9-F1 20 micromolar, 0.5 microlitros de cebador AAD9-R1 20 micromolar, 0.5 microlitros de polimerasa de ADN de PrimeSTAR^{HS} y 29.5 microlitros de 0.1x TE.

30 Un ciclador térmico fue establecido bajo las condiciones siguientes, después de que la temperatura del bloque alcanzó los 98° C con el tubo colocado y se realizó PCR.

Fórmula 2

Desnaturalización	98° C	10 seg.	}	x 30 ciclos
Hibridación	45° C	5 seg.		
Extensión	72° C	60 seg.		
	72° C	60 seg.		
	4° C	∞		

35 1 microlitro y 3 microlitros de la mezcla de reacción, después de la terminación del tratamiento de PCR, se sometieron a la electroforesis del gel de agarosa, con lo que se comprobó el producto de PCR. A modo de gel, se utilizó un gel de agarosa analítico del 2 %.

40 A partir del resultado del análisis del gel de agarosa, se confirmó que hubo una amplificación de una banda única objetivo a aproximadamente 1.1 kbp. El rendimiento fue de aproximadamente 1 microgramo.

PCR adicional

45 En la misma manera anteriormente descrita, se realizó un procedimiento de PCR adicional para 5 tubos y en total, se obtuvieron aproximadamente 10 microgramos de producto de PCR.

Purificación (eliminación de proteínas y concentración)

50 Después de se combinaron todas las mezclas de reacción de PCR, se purificaron utilizando un kit de purificación de PCR QIAquick y se eliminaron el cebador y la proteína mediante un método estándar. Para la elución del ADN, se utilizaron 50 microlitros de 0.1x TE.

55 El producto de PCR purificado fue diluido diez veces con 0.1x TE, y se cuantificó utilizando la electroforesis de gel de agarosa. A modo de gel, se utilizó un gel de agarosa analítico del 2 %.

Tratamiento del producto de PCR con enzima de restricción

El producto de PCR purificado fue segmentado como sigue utilizando enzimas de restricción Bcu I y Bgl II.

10 microlitros de solución tampón 10x Buffer O (solución tampón incluida con enzima) y 36 unidades de Bgl II se añadieron a 5 microgramos de producto de PCR purificado y la cantidad total fue elevada a 100 microlitros utilizando 0.1x TE. Después de la incubación a 37° C durante 2 horas, se eliminó la proteína. Se añadieron 30 microlitros de 10x buffer tango (solución tampón incluida con enzima) y 165 unidades de Bcu I y la cantidad total fue elevada a 300 microlitros utilizando 0.1x TE. Después de la incubación a 37° C durante 2 horas, la mezcla fue purificada utilizando un kit de purificación de PCR QIAquick y fue eluida con 50 microlitros de 0.1x TE.

Fraccionamiento por gel de agarosa y excisión

10 El producto de PCR segmentado por la enzima de restricción fue fraccionado sometiéndolo a una electroforesis durante 130 minutos por el mismo método que el del fraccionamiento antes citado mediante gel de agarosa y excisión y una banda objetivo de aproximadamente 1,1 kbp fue objeto de excisión. A modo de gel, se utilizó un gel de agarosa al 0.8 % para la purificación.

15 Elución del ADN a partir del gel de agarosa

El peso del microtubo de 2 mL con el gel objeto de excisión fue medido y el peso del gel fue calculado restando el peso premedido del tubo vacío. Se extrajo el ADN a partir del gel utilizando un kit de extracción de gel QIAquick de conformidad con las instrucciones del producto. La elución del ADN en la etapa final utilizó 50 microlitros de 0.1x TE.

20 Parte del producto de PCR purificado fue diluido 10 veces con 0.1x TE, y el producto de PCR purificado fue analizado de forma cuantitativa utilizando un espectrofotómetro. La electroforesis se realizó utilizando un gel de agarosa analítico al 2 %.

25 Con respecto al fragmento del ADN sometido al tratamiento de enzimas de restricción del producto de PCR, la escisión del fragmento de ADN a partir del gel de agarosa y su purificación, se confirmó que se obtuvo una banda única en el análisis del gel de agarosa. Además, a partir del resultado de la medida de la concentración mediante la medición del ADN utilizando un absorciómetro, la concentración fue de 40 ng/microlitro. Además, la relación A260/280, que indica la pureza, fue de 1.927.

30 (3) Ligadura del fragmento de pUC ori y del fragmento AAD 9

Una mezcla de reacción de ligadura (mezcla de reacción 1) fue preparada mezclando en hielo, en un tubo PCR de 0.2 mL esterilizado (Bio-BLK), 4 microlitros de solución tampón 5x rapid ligation buffer, 0.75 microlitros (50 ng) de fragmento de pUC ori (66 ng/microlitro), 6.25 microlitros (250 ng) de fragmento de AAD 9 (40 ng/microlitro), 1 microlitro de Ligasa de ADN T4 de 5 u/microlitros T4 y 8 microlitros de 0.1x TE de modo que la relación molar del fragmento pUC ori purificado (aproximadamente 700 bp) al fragmento de AAD9 purificado (aproximadamente 1.1 kbp) fue de 1:3 y la relación en peso fue de 1:5.

40 A modo de control, se preparó una mezcla de reacción (mezcla de reacción 2) con solamente el fragmento de AAD9 purificado. Es decir, 4 microlitros de solución tampón 5x Rapid Ligation Buffer, 6.25 microlitros (250 ng) de fragmento de AAD 9 (40 ng/microlitro), 1 microlitro de Ligase de ADN T4 de 5 u/microlitros y 8.75 microlitros de 0.1x TE se mezclaron en hielo, proporcionando una mezcla de reacción de ligadura (mezcla de reacción 2).

45 Puesto que el fragmento de AAD 9 utiliza el plásmido pBLES100 (publicación de patente 4: JP, A, 2002-97144) como una plantilla, incluso cuando se añade una pequeña cantidad del mismo, forma una colonia como un fondo después del paso posterior de transformar *E.coli*. La mezcla de reacción 2 fue utilizada como un control para comprobar este fondo.

50 Un ciclador térmico se estableció bajo las condiciones siguientes, después de que la temperatura del bloque alcanzara el nivel de 22° C con la colocación del tubo, y se realizó la operación de ligadura.

Fórmula 3

55	22°C	5 min.	(reacción de ligadura)
	65°C	5 min.	(reacción interrumpida)
	4°C	∞	

60 (4) Transformación de *E.coli*

La transformación de *E.coli* JM109 fue realizada mediante un choque térmico utilizando 1 microlitro de una solución después de la reacción de ligadura. El procedimiento operativo para la transformación se realizó de conformidad con un método descrito en las instrucciones del producto de Takara *E.coli* JM109 Células competentes (Takara Bio Inc.). Con respecto a una suspensión de SOC después de la transformación, 100 microlitros del líquido original y 100 microlitros de una dilución de 10 veces por SOC se depositaron sobre DOS soportes de agar LB (que contienen 75

microgramos/mL de SPCM). Las placas inoculadas con *E.coli* transformado utilizando mezcla de reacción de ligadura 1 y 2 se definieron como placas 1 y 2 respectivamente. Estas placas se colocaron en una incubadora ajustada a 37° c y objeto de cultivo durante la noche. Los números de colonias formadas sobre las placas fueron objeto de conteo.

5 Cuando se realizó la transformación utilizando el producto de ligadura del fragmento de pUC ori purificado y del fragmento AAD9 purificado (mezcla de reacción de ligadura 1), se formaron 28 y 37 colonias sobre los soportes selectivos para 100 microlitros de líquido bacteriano de dilución en 10 veces, pero luego la transformación fue realizada utilizando la mezcla de reacción 2 del control, y no se formó ninguna colonia. El fondo fue muy bajo, lo que
10 indicó que se realizaron adecuadamente las operaciones de ligadura y transformación.

(5) Comprobación del plásmido

Cultivo de *E.coli* recombinante

15 6 colonias sobre la placa 1 anterior se seleccionaron de forma aleatoria, y se realizó el cultivo con su uso. Un matriz Erlenmeyer de vidrio de 100 mL esterilizado fue cargado con 20 mL de 2x LB, y 20 microlitros de espectinomicina de 75 mg/mL se añadió y se mezcló adecuadamente. Cada colonia fue extraída utilizando un bucle de platino y suspendida en los soportes anteriormente citados. Se estableció una incubadora de sacudidas ajusta a 37° C y se
20 realizó un cultivo mientras se agitaba a una temperatura de 37° C durante 19.5 horas.

Extracción del ADN plasmídico

25 1.5 mL de cada fluido de cultivo fue colocado en dos microtubos de 2 mL esterilizados. Los fluidos de cultivo remanentes se dejaron en hielo hasta que se terminó la extracción de plásmido. ADN plasmídico fue extraído a partir del fluido de cultivo dispensado utilizando un kit Plasmid Miniprep de GeneElute™ de conformidad con las instrucciones del producto para el kit. Para la elución del ADN plasmídico en la etapa final, se utilizaron 50 microlitros de 0.1x TE.

30 Medición de la concentración del ADN plasmídico

El plásmido anteriormente extraído fue diluido 20 veces con 0.1x TE, la concesión de ADN fue medida mediante un espectrofotómetro y la calidad fue comprobada mediante la relación de A260/280.

35 A partir de los resultados de realizar la extracción del ADN plasmídico a partir del *E.coli* recombinante por DOS veces, la relación de A260/280, que indica la pureza del ADN, fue de 1.944 a 1.972, y la pureza del ADN plasmídico fue adecuada. El rendimiento fue de al menos 5 microgramos cuando se combinan los dos extractos.

40 Segmentación mediante enzima de restricción

La segmentación por Bcu I por sí mismo, la segmentación por Bgl II por sí mismo, y la segmentación por ambos Bcu I y Bgl II se realizaron utilizando 100 ng de ADN plasmídico. Las condiciones de reacción fueron de conformidad con las instrucciones del producto para las enzimas. El volumen de reacción fue de 20 microlitros.

45 Para todas las 6 cepas de colonias, se detectaron dos bandas de aproximadamente 700 bp y aproximadamente 1.1 kbp cuando se realizó la segmentación por los dos tipos de enzimas Bcu I y Bgl II.

Además, una banda de aproximadamente 1.8 kbp fue detectada cuando se realizó la segmentación mediante una enzima única de Bcu I o Bgl II. Lo que antecede indica que para todas las cepas, el tamaño plasmídico y su
50 constitución fueron según su diseño.

Comprobación de la secuencia del ADN plasmídico

55 20 microlitros de la solución de ADN plasmídica se fragmentaron por la enzima de restricción anterior y se mezclaron con 2 microlitros de solución tampón de carga 10x, y esta mezcla fue sometida a electroforesis mediante un método estándar.

Una reacción de secuencia fue realizada utilizando un kit de secuenciación de ciclos v3.1 de terminador BigDye utilizando el plasmídico extraído por la electroforesis anterior. A modo de un cebador de secuencia, se utilizaron los
60 conjuntos de cebadores 1 y 2 indicados en la tabla 3 siguiente. La alineación de la secuencia se realizó utilizando el software de análisis denominado GENETY(R)ATSQ (Genetyx Corporation). La secuencia de nucleótidos plasmídicos después de la alineación fue comparada con la secuencia diseñada (SEQ ID NO:1).

Entre las 6 cepas, la secuencia plasmídica de 4 cepas coincidió con la secuencia diseñada SEQ ID NO:1, pero las 2
65 cepas plasmídicas restantes tenían sustitución y supresión de nucleótidos, respectivamente.

Una cepa fue seleccionada de entre las 4 cepas que coincidían con la secuencia SEQ ID NO: 1, y un plasmídico extraído de esta cepa fue definido como 'pSPCM-pUCori'.

Tabla 3 Cebadores para secuenciación

Nombre del cebador	Secuencia (5' -> 3')	Conjunto
37_R_5181	AAA TAT CTC TTG CCA GTC AC	Conjunto 1
060723-spmsec	CAT GTT TGG ATC AGG AGT TGA G	Conjunto 1
41_F-seq13	AGC AAG AAA TGG TAC CGT GG	Conjunto 1
060219-pAV001-2	TTT GCT TGG TAA AGC ATT ATG G	Conjunto 1
42_F-seq_28down	GAC TTA GAG GAA TTA CTA CC	Conjunto 1
38_F_5980	ATA CCA AAA GAT ATT GCG GG	Conjunto 1
060723-spmsec	AAT GGA GAA GAT TCA GCC ACT G	Conjunto 1
pUC ori-1	AAC GCC AGC AAA AGG C	Conjunto 2
060219-pAV001-3	GAC GAT AGT TAC CGG ATA AGG C	Conjunto 2
060219-pAV001-3	GCC TTA TCC GGT AAC TAT CGT C	Conjunto 2
40_R-seq_16down	ATT AGC AGA GCG AGG TAT GT	Conjunto 2
39_R_6495	GCA AGC AGC AGA TTA CGC GC	Conjunto 2
HU IV (F)	AGT GCC GCA GGG CGT	Conjunto 3
HU IV (R)	ACG CCC TGC GGC ACT	Conjunto 3
060403 HU upstream cloning	TTT GCT TAG TCC ATG TTG TCA	Conjunto 3
pAVeCD1482_atg	ATG GCA TAC AAC AAG TCT GAC CTC	Conjunto 3
CD seq (F)	GCG CAT GGC AAA CGC TGA AAT GGC AGA TTG	Conjunto 3
CD seq (R)	GTG ATG CCG CGA CGT TTT GGA TAC GTA TCG	Conjunto 3
CD892 D314A	CGC GTT AAA GAG ATG CTG GAG T	Conjunto 3
R-pTB6 R7	GTC TGG GGA GTC CTG CGT TC	Conjunto 4
pBLES100 F3	TAT GCT GAG GCC ATG TCC AAT GAG A	Conjunto 4
R-pTB6 R6	GTC AGG TCG TTG AGC AGG AAC	Conjunto 4
pTB6 F5 (pBLES100 F5)	GAA GAT CGA GCG CCA GTA CGT GAA	Conjunto 4
060219-pAV001-1	GTG AAC ACC TCG CCG TAC C	Conjunto 4
36_F_4754	CAA CCG CGA ACA TCA TGC GC	Conjunto 4

Ejemplo 2

Construcción de plásmido de proteína con actividad de marcador de selección (pHU-eCDm-SPCM-pUCori) (Etapa 2)

(1) Preparación del plásmido lineal pSPCM-pUCori

Segmentación de plásmido

El plásmido lineal pSPCM-pUCori fue segmentado según se describe a continuación utilizando las enzimas de restricción Bcu I, Xho I, y Bam HI. La segmentación de Xho I se realizó con el fin de suprimir el fondo durante la transformación mediante el plásmido no segmentado. 25 microlitros de solución tampón 10x buffer tango (solución tampón incluida con enzima) y 100 unidades de Bcu I se añadieron a 5 microgramos de pSPCM-pUCori, y la cantidad total fue elevada hasta 250 microlitros utilizando 0.1x TE. Después de la incubación a 37° C durante 2 horas, se extrajeron 100 ng del mismo y fue confirmado, utilizando un gel de agarosa analítico del 0.8 %, que se terminó la descomposición.

El tubo que contiene la mezcla de reacción de enzima fue guardado en hielo a la espera de la confirmación. Después de que se confirmó la segmentación, se retiró la proteína desde la mezcla de reacción de enzimas.

Se añadieron 20 microlitros de 10x Buffer Bam HI (solución tampón incluida con enzima) y 80 unidades de Bam HI y la cantidad total fue elevada a 200 microlitros utilizando 0.1x TE. Después de la incubación a 37° C durante 2 horas, se extrajeron 100 ng del mismo y se confirmó, utilizando un gel de agarosa analítico de 0.8 %, que el ADN no había sufrido ninguna descomposición interna.

El tubo que contiene la mezcla de reacción de enzimas fue guardado en hielo a la espera de la confirmación. Después de que se confirmó la segmentación, se eliminó la proteína desde la mezcla de reacción de enzimas.

Se añadieron 50 microlitros de 10x Buffer R (solución tampón incluida con enzima) y 400 unidades de Xho I y la cantidad total se elevó 500 microlitros utilizando 0.1x TE. Después de la incubación a 37° C durante 2 horas, se eliminó la proteína desde la mezcla de reacción de enzimas.

5 Fraccionamiento mediante gel de agarosa y excisión

10 El vector segmentado por la enzima de restricción fue fraccionado sometándolo a la electroforesis durante 75 minutos mediante el mismo método que en 'Fraccionamiento por gel de agarosa y excisión' descrito en el ejemplo 1, y una banda objetivo a aproximadamente 1.8 kbp fue objeto de escisión. A modo de gel, se utilizó un gel de agarosa al 0.8 % para la purificación. Como marcador de peso molecular, se utilizó el dispositivo FastRuler DNA Ladder, escala media (Fermentas).

Elución de ADN a partir del gel de agarosa

15 El ADN fue objeto de elución a partir del gel anteriormente objeto de escisión por el mismo método que en el apartado de 'Elución de ADN a partir del gel de agarosa' según se describió en el ejemplo 1.

20 Parte del vector sometido a la purificación de gel de agarosa fue diluido 3 veces utilizando 0.1x TE, y se analizó de forma cuantitativa por un espectrofotómetro. Fue comprobado utilizando un gel de agarosa analítico del 0.8 % en cuanto a si el vector preparado era, o no, una banda única de aproximadamente 1.8 kbp.

25 Con respecto al fragmento del ADN sometido al tratamiento de enzima de restricción de pSPCM-pUCori plasmídico, la excisión del fragmento del ADN a partir del gel de agarosa y su purificación, se confirmó que proporcionó una banda única en el análisis de gestión de agarosa. En la medición del ADN utilizando un absorciómetro, la concentración fue de 21 ng/microlitro. Además, la relación de A260/280 que indica la pureza, fue de 2.049.

(2) Preparación de inserción (segmentación de HU-eCD)

30 Utilizando el plásmido pAV001-HU-eCD-M968 (publicación de patente 5: WO 2007/136107), fueron fusionados un fragmento de ADN que contiene HU-eCD-M968 (una proteína en la que los 9 aminoácidos del terminal N de una proteína HU de Bifidobacterium y E.coli de CD derivado y en donde se introdujo una variante para aumentar la afinidad para el sustrato 5-FC), un promotor de HU y un terminador de HU fue amplificado por PCR.

35 Se realizó un procedimiento de PCR de 2 etapas (PCR primero y PCR segundo) como sigue y se preparó un fragmento de HU-eCD.

Primer procedimiento de PCR

Examen de condiciones para amplificación de PCR

40 Las condiciones de amplificación de PCR se examinaron para dos tipos de fragmentos (fragmento de HU-eCD 1 y fragmento de HU-eCD 2).

45 Utilizando pAV001-HU-eCD-M968 como una plantilla, se preparó una mezcla de PCR (fragmento de HU-eCD 1) en hielo añadiendo a un tubo de PCR de 0.2 mL esterilizado (Bio-BIK) 5 microlitros de 10 pg/mL pAV001-HU-eCD-M968, 10 microlitros de solución tampón 5x PrimeStar™, 4 microlitros de una mezcla dNTP (2.5 mM cada una), 0.5 microlitros de cebador HUeCD F3 20 micromolar, 0.5 microlitros de cebador HUeCD interior R1 20 micromolar, 0.5 microlitros de polimerasa de ADN PrimeSTAR^{HS} y 29.5 microlitros de 0.1x TE. 3 tubos de esta mezcla se prepararon de la misma manera.

50 Un ciclador térmico fue establecido bajo las condiciones siguientes, después de que la temperatura del bloque alcanzara el nivel de 98° C con los tubos colocados, y se realizó un procedimiento de PCR.

Fórmula 4

Desnaturalización	98° C	10 seg.	}	x 30 ciclos
Hibridación	55° C	5 seg.		
Extensión	72° C	100 seg.		
	72° C	60 seg.		
	4° C	∞		

55 En la misma manera, utilizando pAV001-HU-eCD-M968 como una plantilla, se preparó una mezcla de PCR (fragmento de HU-eCD 2) en hielo añadiendo a un tubo de PCR de 0.2 mL esterilizado (Bio-BIK) 5 microlitros de 10 pg/mL pAV001-HU-eCD-M968, 10 microlitros de solución tampón 5x PrimeStar™, 4 microlitros de una mezcla dNTP

82.5 mM cada una) 0.5 microlitros de cebador HUeCD interior F1 20 micromolar, 0.5 microlitros de cebador HUeCD R1 20 micromolar, 0.5 microlitros de polimerasa de ADN PrimeSTAR^{HS} y 29.5 microlitros de 0.1x TE. Se prepararon 8 tubos de esta mezcla en la misma manera.

- 5 Del mismo modo, un ciclador térmico fue establecido bajo las condiciones siguientes, después de que la temperatura del bloque alcanzó 98° C con los tubos colocados y se realizó un procedimiento de PCR.

Fórmula 5

Desnaturalización	98° C	10 seg.	}	x 30 ciclos
Hibridación	55° C	5 seg.		
Extensión	72° C	6 seg.		
	72° C	60 seg.		
	4° C	∞		

- 10 Después de la terminación de PCR, las mezclas de reacción se combinaron en un solo tubo. El producto de PCR fue comprobado utilizando 1 microlitro y 3 microlitros de la mezcla de reacción después de la terminación de PCR. Para comprobar los fragmentos de HU-eCD 1 y 2, se utilizó un gel de agarosa analítico del 0.8 % y un gel de agarosa analítico del 2 %, respectivamente.

- 15 A partir del resultado del análisis del gel de agarosa del producto de PCR de fragmento de HUeCD 1, se confirmó que se produjo una amplificación de una banda única objetivo a aproximadamente 1.7 kbp. El rendimiento fue de al menos 4.5 microgramos.

- 20 Además, en el análisis de gel de agarosa del producto de PCR del fragmento de HUeCD 2, se confirmó que hubo una amplificación de una banda única objetivo a aproximadamente 150 bp. El rendimiento fue de aproximadamente 8 microgramos.

25 Purificación por el kit de purificación de PCR

El producto de PCR fue sometido a purificación de conformidad con el manual de procedimientos para el kit de purificación de PCR QIAquick, eliminando de este modo el cebador. La elución del ADN en la etapa final de la purificación utilizó 50 microlitros de 0.1x TE.

30 Fraccionamiento por gel de agarosa y escisión del producto de PCR

- 35 El producto de PCR purificado fue segmentado por el mismo método como en el fraccionamiento anteriormente citado por el gel de agarosa y excisión. El fragmento de HU-eCD fue sometido a electroforesis durante 65 minutos utilizando gel de agarosa del 0.8 % para la purificación y una banda objetivo de aproximadamente 1.7 kbp fue objeto de escisión. El fragmento de HU-eCD 2 fue sometido a electroforesis durante 65 minutos utilizando el gel de agarosa al 2 % para purificación y una banda objetivo de aproximadamente 150 bp fue objeto de escisión.

Elución de ADN a partir del gel de agarosa

- 40 El ADN fue objeto de elución a partir del gel objeto de excisión anterior por el mismo método que en el apartado de 'Elución del ADN a partir del gel de agarosa' anterior.

Análisis cuantitativo del producto de PCR purificado

- 45 Parte del producto de PCR purificado fue diluido 3 veces utilizando 0.1x TE, y se analizó cuantitativamente por un espectrofotómetro. La concentración del fragmento HU-eCD 1 y la concentración del fragmento HU-eCD 2 fueron de 47 ng/microlitro y el rendimiento fue de aproximadamente 2.3 microgramos.

50 Segundo procedimiento de PCR

Examen de las condiciones para amplificación de PCR

- 55 El fragmento HU-eCD 1 purificado y el fragmento de HU-eCD 2 purificado se utilizaron a modo de plantilla, y se examinaron las condiciones de PCR para su conexión.

Preparación de la plantilla

517 ng de fragmento de HU-eCD 1 purificado (aproximadamente 1.7 kbp) y 47 ng de fragmento de HU-eCD 2 purificado (aproximadamente 150 bp) fueron objeto de mezcla y la concentración fue ajustada a 1 ng/microlitro

utilizando 0.1x TE. La relación molar de los dos fragmentos fue de 1:1.

Preparación de mezcla de cebadores

5 10 microlitros de cebador HUECD F3 20 micromolar y 10 microlitros de cebador HUECD R1 20 micromolar fueron mezclados en cantidades iguales.

Preparación de la mezcla de PCR

10 1 microlitros de la mezcla del fragmento de HU-eCD 1 y 2 de 1 ng/microlitros, 10 microlitros de solución tampón 5x PrimeStar™, 4 microlitros de una mezcla de dNTP (2.5 mM cada uno), 0.5 microlitros de polimerasa de ADN PrimeSTAR^{HS}, y 32.5 microlitros de 0.1x TE se añadieron a un tubo de PCR de 0.2 mL esterilizado (Bio-BIK), y se realizó la mezcla en hielo, proporcionando así una mezcla de reacción de PCR. Tres tubos con esta mezcla de reacción se prepararon de la misma manera.

15 Un ciclador térmico fue establecido bajo las condiciones siguientes, después de que la temperatura del bloque alcanzó 98° C con los tubos colocados, siendo realizado un ciclo de 98° C durante 10 segundos y 72° C durante 100 segundos cada cinco ciclos, 2 microlitros de la mezcla de cebadores anteriormente preparada se añadieron luego y se mezclaron a una temperatura de 72° C y la reacción siguiente se realizó en el ciclador térmico. Después de la terminación de la reacción, las mezclas de reacción en los 3 tubos de PCR se combinaron en un solo tubo.

Fórmula 6

Desnaturalización	98° C	10	seg.	}	x 30 ciclos
Hibridación	60° C	5	seg.		
Extensión	72° C	100	seg.		
	72° C	60	seg.		
	4° C	∞			

25 1 microlitro y 3 microlitros de la mezcla de reacción después de que fue terminado el procedimiento de PCR se sometieron a electroforesis utilizando gel de agarosa analítico al 0.8 % y solución tampón 1x TBE (0.5 microgramos/mL de bromuro de editio).

30 Fue confirmado por el análisis de gel de agarosa del 2° fragmento de PCR que había amplificación de una banda única objetivo de aproximadamente 1.8 kbp. El rendimiento fue de aproximadamente 13 microgramos.

Purificación mediante el kit de purificación de PCR

35 El producto de PCR fue sometido a un proceso de purificación de conformidad con el manual de procedimiento para el kit de purificación de PCR QIAquick, eliminando de este modo el cebador. La elución del ADN en la etapa final de la purificación utilizó 50 microlitros de 0.1x TE.

40 Parte del producto de PCR del que se eliminó el cebador fue diluido 50 veces con 0.1x TE, y se analizó de forma cuantitativa por un espectrofotómetro.

Tratamiento del producto de PCR con enzima de restricción

El producto de PCR purificado fue segmentado utilizando las enzimas de restricción Bcu I y Bam HI.

45 25 microlitros de 10x Buffer Tango (solución tampón incluida con enzima) y 100 unidades de Bcu I se añadieron a 5 microgramos de producto de PCR purificado, y la cantidad total fue elevada hasta 250 microlitros utilizando 0.1x TE. Después de la incubación a 37° C durante 2 horas, se extrajeron 100 ng y fue confirmado, utilizando el gel de agarosa analítico al 0.8 % que el ADN no había sufrido ninguna descomposición interna.

50 El tubo que contiene la mezcla de reacción de enzima fue guardado en hielo a la espera de la confirmación. Después de realizar la confirmación por electroforesis, se eliminó la proteína a partir de la mezcla de reacción de enzimas.

55 20 microlitros de 10x Buffer Bam HI (solución tampón incluida con enzima) y 80 unidades de Bam HI se añadieron y la cantidad total fue elevada hasta 200 microlitros utilizando 0.1x TE. Después de la incubación a 37° C durante 2 horas, se extrajeron 100 ng del mismo y se confirmó, utilizando un gel de agarosa analítico al 0.8 % que el ADN no había sufrido ninguna descomposición interna.

60 El tubo que contiene la mezcla de reacción de enzima fue guardado en hielo a la espera de la confirmación. Después de realizar la configuración por electroforesis, esta mezcla de reacción de enzimas fue purificada utilizando

un kit de purificación de PCR QIAquick.

Fraccionamiento mediante gel de agarosa y escisión

5 El producto de PCR segmentado por la enzima de restricción fue fraccionado por el mismo método que se describió anteriormente en el apartado 'Fraccionamiento mediante gel de agarosa y escisión' y una banda objetivo de aproximadamente 1.8 kbp fue objeto de escisión. En calidad de gel, se utilizó un gel de agarosa al 0.8 % para purificación y 75 minutos después de iniciar la electroforesis, cuando una banda objetivo a aproximadamente 1.8 kbp alcanzó una posición de aproximadamente 1/3 del recorrido a lo largo del gel, con lo que se finalizó la electroforesis.
10 A modo de un marcador de peso molecular del ADN, se utilizó el dispositivo FastRuler DNA ladder, gama media (Fermentas).

Elución del ADN a partir del gel del agarosa

15 El ADN fue objeto de elución a partir del gel anteriormente objeto de escisión con el mismo método que en el apartado de 'Elución de ADN a partir del gel de agarosa' anterior.

Parte del producto de PCR sometido a la purificación del gel de agarosa fue diluido 3 veces utilizando 0.1x TE, y se analizó cuantitativamente mediante un espectrofotómetro. La confirmación por electroforesis fue realizada utilizando un 0.8 % de gel de agarosa analítico. Después de que el producto de PCR fue sometido al tratamiento de enzimas de restricción y la purificación del gel de agarosa, la concentración del ADN fue medida por un absorbímetro y se encontró que era de 41 ng/microlitro. Además, la relación de A260/280 que indica la pureza, era de 1.932. Además en el análisis de electroforesis utilizando gel de agarosa hubo una banda única a aproximadamente 1.8 kbp.

25 (3) Ligadura de pSPCM-pUCori lineal y fragmento de HU-eCD

Una mezcla de reacción de ligadura (mezcla de reacción 1) y mezclas de reacción de control (mezcla de reacción 2 y mezcla de reacción 3) se prepararon como sigue.

30 Mezcla de reacción 1

4 microlitros de solución tampón 5x Rapid Ligation Buffer, 2.4 microlitros (50 ng) de pSPCM-pUCori (21 ng/microlitro), 3.7 microlitros (150 ng) de fragmento de HU-eCD (41 ng/microlitro), 1 microlitro de 5 u/microlitro de T4 DNA ligase y 8.9 microlitros de 0.1x TE se añadieron a un tubo de PCR 0.2 mL (Bio-BIK) de modo que la relación molar del pSPCM-pUCori lineal (aproximadamente 1.8 kbp) para el fragmento de HU-eCD (aproximadamente 1.8 kbp) fue de 1:3 (también 1:3 fue una relación en peso), y se realizó una mezcla en hielo, proporcionando así una mezcla de reacción de ligadura (mezcla de reacción 1).

40 Mezcla de reacción 2

De modo similar, 4 microlitros de solución tampón 5x Rapid Ligation Buffer, 2.4 microlitros (50 ng) de pSPCM-pUCori (21 ng/microlitros), 1 microlitro de 5u/microlitro de T4 DNA Ligase, y 12.6 microlitros de 0.1x TE, se añadieron a un tubo de PCR de 0.2 mL (Bio-BIK) y se realizó una mezcla en hielo, con lo que se obtuvo una mezcla de reacción con solamente pSPCM-pUCori (mezcla de reacción 2).

45 Mezcla de reacción 3

De modo similar, 4 microlitros de solución tampón 5x Rapid Ligation Buffer, 3.7 microlitros (150 ng) de fragmento de HU-eCD (41 ng/microlitro), 1 microlitro de 5u/microlitro de T4 DNA Ligase, y 11.3 microlitros de 0.1x TE, se añadieron a un tubo de PCR de 0.2 mL (Bio-BIK), y se realizó una mezcla en hielo, con lo que se obtuvo una mezcla de reacción con solamente un fragmento de HU-eCD (mezcla de reacción 3).

55 Un ciclador térmico se estableció bajo las condiciones siguientes, después de que la temperatura del bloque alcanzó 22° C con los tubos colocados y se realizó un proceso de ligadura.

Fórmula 7

22°C	5 min.	(reacción de ligadura)
65°C	5 min.	(reacción interrumpida)
4°C	∞	

60 La proporción del fondo debido al plásmido remanente después de la segmentación fue estimada utilizando la mezcla de reacción 2 y la mezcla de reacción 3.

65 (4) Transformación de *E.coli*

La transformación de *E.coli* JM109 se realizó utilizando 1 microlitro de la solución después de la reacción de ligadura mediante el mismo método que en el apartado de 'Transformación de *E.coli*' descrito en el ejemplo 1.

5 En la transformación utilizando el producto de ligadura del vector y la inserción (mezcla de reacción de ligadura 1), 34 a 38 colonias se formaron sobre un soporte selectivo por 100 microlitros de 100 veces el líquido bacteriano en dilución, mientras que en la transformación utilizando la mezcla de reacción de control 2 en la que solamente el vector fue objeto de ligadura y la mezcla de reacción de control 3 en la que solamente la inserción fue objeto de ligadura, se tuvo la presencia de 0 a 1 colonia. El fondo era muy bajo, sugiriendo que se realizaron adecuadamente las funciones de ligadura y transformación.

10 (5) Comprobación de plásmido

Cultivo de *E.coli* recombinante

15 Se realizó con el conformidad con el método descrito en la sección 'Cultivo de *E.coli* recombinante' descrito en el ejemplo 1. El cultivo se realizó durante 20.5 horas.

Extracción del ADN plasmídico

20 Se realizó de conformidad con el método descrito en la sección 'Extracción del ADN plasmídico' descrito en el ejemplo 1.

Medición de la concentración del ADN plasmídico

25 Se realizó de conformidad con el método descrito en la sección 'Medición de la concentración del ADN plasmídico' descrito en el ejemplo 1.

30 Cuando las concentraciones del ADN extraídas del *E.coli* recombinante de las seis cepas de clonación fueron medidas, la relación de A260/280, que indica la pureza del ADN, fue desde 1.904 a 1.916, y la pureza del ADN plasmídico fue adecuada. El rendimiento fue al menos de 5 microgramos.

Segmentación mediante enzima de restricción

35 La segmentación por Bcu I por sí mismo, la segmentación por Bam HI por sí mismo y la segmentación por ambas Bcu I y Bam HI se realizó utilizando 100 ng de ADN plasmídico. Las condiciones de las reacciones fueron de conformidad con las instrucciones del producto para las enzimas. El volumen de reacción fue de 20 microlitros.

Electroforesis de gel de agarosa

40 La electroforesis de gel de agarosa se realizó utilizando un gel de agarosa analítico al 0.8 %. Con respecto a las seis cepas de clonación, una sola banda de aproximadamente 1.8 kbp fue detectada a partir de la segmentación con los dos tipos de enzimas Bcu I y Bam HI. Además, una banda en aproximadamente 3.6 kbp fue detectada a partir de la segmentación con la enzima Bcu I por sí misma o Bam HI por sí misma. Ello indica que para todas las cepas de clonación, la magnitud plasmídica y la constitución eran según diseño.

45 Comprobación de la secuencia del ADN plasmídico

50 Se realizó un secuenciación utilizando el plásmido extraído anteriormente por el mismo método que en la sección 'Comprobación de la secuencia del ADN plásmido' descrita en el ejemplo 1. En calidad de cebador, se utilizaron los conjuntos de cebadores 1, 2, y 3 indicados en la tabla 3 descrita en el ejemplo 1. La secuencia de nucleótidos plasmídicos después de la alineación fue comparada con la secuencia de diseño (SEQ ID NO:2).

55 Las secuencias de plasmídicos de las seis cepas de clonación coincidieron con SEQ ID NO:2, y se confirmó que las cepas objetivo se obtuvieron en todos los casos. Una sola cepa fue seleccionada de entre todas las cepas de clonación y se extrajo un plásmido desde esta cepa que fue definido como 'pHU-eCDm-SPCM-pUCori'.

Ejemplo 3

60 Construcción de plásmido lanzadera (pCDshuttle) (Etapa 3)

(1) Preparación de plásmido lineal pHU-eCDm-SPCM-pUCori

Segmentación de plásmido

65 pHU-eCDm-SPCM-pUCori fue segmentado como sigue utilizando las enzimas de restricción Bcu I, Hind III y Sal I. La segmentación por Hind III se realizó con el fin de suprimir el fondo cuando se realiza la transformación en una etapa

posterior.

5 10 microlitros de 10x Buffer O (solución tampón incluida con enzima) y 34 unidades de Sal I se añadieron a 5 microgramos de pHU-eCDm-SPCM-pUCori, y la cantidad total fue elevada hasta 100 microlitros utilizando 0.1x TE. Después de la incubación a 37° C durante 6 horas, se extrajeron 50 ng del mismo y fue confirmado utilizando un gel de agarosa analítico al 0.8 % que la descomposición fue completa.

10 El tubo que contiene la mezcla de reacción de enzimas se guardó en hielo a la espera de la confirmación. Después de que fue confirmada la segmentación por Sal I esta mezcla de reacción de enzimas fue purificada utilizando un kit de purificación de QIAquick.

15 20 microlitros de 10x Buffer Tango (solución tampón incluida con enzima) y 50 unidades de Bcu I se añadieron y la cantidad total fue elevada a 200 microlitros utilizando 0.1x TE. Después de la incubación a 37° C durante 2 horas, se eliminó la proteína.

10 microlitros de 10x Buffer R (solución tampón incluida con enzima) y 29 unidades de Hind III se añadieron y la cantidad total fue elevada a 100 microlitros utilizando 0.1x TE. Después de la incubación a 37° C durante 2 horas, la solución del ADN fue purificada y concentrada utilizando un kit de purificación de PCR QIAquick.

20 Fraccionamiento mediante gel de agarosa y excisión

25 El vector segmentado por la enzima de restricción fue fraccionado por el mismo método que en el apartado de 'Fraccionamiento por gel de agarosa y excisión' descrito en el ejemplo 1 un banda objetivo a aproximadamente 3.6 kbp fue objeto de excisión. Una electroforesis fue realizada en 50 V durante 90 minutos utilizando un gel de agarosa al 0.8 % para la purificación. En calidad de marcador del peso molecular, se utilizó un dispositivo Quick-Load 1 kbp DNA Lader (NEB)

Elución del ADN a partir del gel de agarosa

30 El ADN fue objeto de elución a partir del gel anteriormente objeto de excisión con el mismo método que el del apartado 'Elución del ADN a partir del gel de agarosa' descrito en el ejemplo 1.

35 Parte del vector sometido a la purificación del gel de agarosa fue diluido 3 veces con 0.1x TE y analizado cuantitativamente por un espectrofotómetro.

Cuando la absorbancia del fragmento de ADN después del tratamiento del plásmido pHU-eCDm-SPCM-pUCori con la enzima de restricción y la purificación por el gel de agarosa fue medida, la concentración era de 13 ng/microlitro. Además, la relación de A260/280, que indica la pureza, fue de 1.961.

40 (2) Preparación del gen de OriV-RepB (inserción)

45 En pBLES100 utilizado como una plantilla de PCR, la región del terminal C del ORF de gen RepB y la región del terminal N de ORF del gen membB asumido fueron duplicadas. Con el fin de impedir que se traslade el valor de ORF de membB, el sitio de unión de ribosoma asumido y el codón de iniciación de traslación ATG de membB se cambiaron a otros nucleótidos. En este caso, el diseño fue tal que los aminoácidos de RepB no fueron cambiados. Un procedimiento de PCR de dos etapas (PCR 1º y PCR 2º se realizó como sigue) con lo que se obtuvo un gen OriV-RepB.

Primer procedimiento de PCR

Examen de condiciones para la amplificación de PCR

55 Las condiciones de amplificación de PCR se examinaron para dos tipos de fragmentos (gen OriV-RepB 1 y gen OriV-RepB 2).

Gen OriV-RepB 1

60 Utilizando pBLES100 a modo de plantilla, se preparó una mezcla de PCR en hielo añadiendo 5 microlitros de 10 pg/mL pBLES100, 10 microlitros de solución tampón 5x PrimeStar™ buffer, 4 microlitros de un mezcla dNTP (2.5 mM cada una), 0.5 microlitros de cebador OriV-rep exterior F1 20 micromolar, 0.5 microlitros de cebador OriV-rep interior R1 20 micromolar, 0.5 microlitros de polimerasa de ADN Prime-STAR^{HS} y 29.5 microlitros de 0.1x TE a un tubo de PCR de 0.2 mL esterilizado (Bio-BIK). Tres tubos de esta mezcla fueron preparados en la misma manera.

65 Un ciclador térmico fue establecido bajo las condiciones siguientes, después de que la temperatura del bloque alcanzó 98° C con los tubos colocados, y se realizó un procedimiento de PCR.

Fórmula 8

Desnaturalización	98°C	10 seg.	} x 30 ciclos
Hibridación	55°C	5 seg.	
Extensión	72°C	60 seg.	
	72°C	60 seg.	
	4°C	∞	

Gen OriV-repB 2

5 De la misma manera, utilizando pBLES100 como una plantilla, se preparó una mezcla de PCR en hielo añadiendo 5 microlitros de 10 pg/mL pBLES100, 10 microlitros de solución tampón 5x PrimeStar™ buffer, 4 microlitros de una mezcla dNTP (2.5 mM cada una), 0.5 microlitros de cebador OriV-rep interior F1 20 micromolar, 0.5 microlitros de cebador OriV-rep exterior R1 20 micromolar, 0.5 microlitros de polimerasa de ADN PrimeSTAR^{HS} y 29.5 microlitros de 0.1x TE a un tubo de PCR de 0.2 mL esterilizado (Bio-BIK). Tres tubos de esta mezcla fueron preparados de la misma manera.

10 Un ciclador térmico fue establecido bajo las condiciones siguientes, después de que la temperatura del bloque alcanzara 98° C con los tubos colocados, y se realizó un procedimiento de PCR.

Fórmula 9

Desnaturalización	98°C	10 seg.	} x 30 ciclos
Hibridación	60°C	5 seg.	
Extensión	72°C	25 seg.	
	72°C	60 seg.	
	4°C	∞	

20 Los productos de PCR se comprobaron y sus rendimientos se estimaron utilizando 1 microlitro de cada una de las mezclas de reacción después de que fue terminado el procedimiento de PCR. A modo de gel, se utilizó un gel de agarosa analítico al 2 %.

25 A partir del resultado del análisis del gel de agarosa del producto de PCR del gen OriV-RepB 1, fue confirmado que se produjo una amplificación de una banda única objetivo a aproximadamente 1.3 kbp. El rendimiento fue de aproximadamente 4.5 microgramos.

30 Además, en el análisis del gel de agarosa del producto de PCR del gen OriV-RepB 2 se confirmó que se produjo una amplificación de una banda única objetivo a aproximadamente 400 bp y el rendimiento fue de aproximadamente 4.5 microgramos.

Purificación mediante el kit de purificación de PCR

35 Los productos de PCR se purificaron y concentraron de conformidad con un método estándar (el procedimiento operativo de un kit de purificación de PCR QIAquick).

Fraccionamiento mediante gel de agarosa y excisión del producto de PCR

40 El producto de PCR purificado y concentrado anteriormente fue fraccionado por el mismo método que en la sección 'Fraccionamiento mediante gel de agarosa y excisión' descrito en el ejemplo 1. Con respecto al gen OriV-RepB 1, se realizó una electroforesis durante 80 minutos utilizando un gel de agarosa al 0.8 % para su purificación. Cuando una banda objetivo a aproximadamente 1.3 kbp alcanzó una posición aproximadamente a 1/2 del recorrido a lo largo del gel, se finalizó la electroforesis. A modo del marcador del peso molecular, se utilizó un dispositivo denominado FastRuler DNA ladder, de margen medio. Por otro lado, con respecto al gen OriV-RepB 2, se realizó una electroforesis durante 80 minutos utilizando el gel de agarosa al 2 % para su purificación. Cuando una banda objetivo a aproximadamente 400 bp alcanzó una posición a aproximadamente a mitad del recorrido a lo largo del gel se finalizó la electroforesis. A modo de marcador de peso molecular, se utilizó un dispositivo FastRuler DNA ladder, de gama media.

Elución de ADN a partir del gel de agarosa

50 El ADN fue objeto de elución a partir del gel anteriormente objeto de excisión por el mismo método que en la sección 'Elución del ADN a partir de un gel de agarosa' descrito en el ejemplo 1.

Análisis cuantitativo del producto de PCR purificado

Parte del producto de PCR purificado fue diluido 4 veces con 0.1x TE, y fue objeto de análisis cuantitativo utilizando un espectrofotómetro.

- 5 Cuando el producto de PCR después de la purificación del gel de agarosa fue sometido a medición utilizando un absorciómetro, las concentraciones de gen OriV-RepB 1 y del gen OriV-RepB 2 fueron 37 ng/microlitro y 67 ng/microlitro, respectivamente.

Segundo procedimiento de PCR

- 10 Examen de las condiciones para la amplificación de PCR

El fragmento de OriV-RepB 1 purificado y el fragmento de OriV-RepB 2 purificado se utilizaron como una plantilla, y se examinaron las condiciones de PCR para su conexión.

- 15 Preparación de la plantilla

325 ng del fragmento OriV-RepB purificado 1 (aproximadamente 1.3 kbp) y 100 ng del fragmento OriV-RepB purificado 2 (aproximadamente 400 bp) fueron mezclados y la concentración fue ajustada a 1 ng/microlitro utilizando 0.1x TE. La relación de mezcla del fragmento de OriV-RepB purificado 1 al fragmento de OriV-RepB purificado 2 fue de 1:1 como una relación molar.

Preparación de mezcla de cebadores

- 25 Un cebador F1 exterior de OriV-rep 20 micromolar y un cebador R1 exterior de OriV-rep 20 micromolar se mezclaron en cantidades iguales.

Preparación de la mezcla de PCR

- 30 Una mezcla de reacción fue preparada añadiendo 1 microlitro de la mezcla de 1 ng/microlitro OriV-RepB 1 y 2, 10 microlitros de la solución tampón 5x PrimeStar™ buffer, 4 microlitros de una mezcla de dNTP (2.5 mM cada una), 0.5 microlitros de polimerasa de ADN PrimeSTAR^{HS}, y 32.5 microlitros de 0.1x TE a un tubo de PCR 0.2 mL esterilizado (Bio-BIK), y se realizó la mezcla en hielo. Tres tubos de esta mezcla se prepararon de la misma manera.

- 35 Un ciclador térmico fue establecido bajo las condiciones siguientes, después de que la temperatura del bloque alcanzara 98° C con los tubos colocados.

- 40 Un ciclo de 98° C durante 10 segundos y 72° C durante 70 segundos se realizó durante cinco ciclos, 2 microlitros de la mezcla de cebadores anteriormente preparada fue añadida luego y mezclada a una temperatura de 72° C y la reacción siguiente fue realizada en el ciclador térmico.

Fórmula 10

Desnaturalización	98° C	10 seg.	}	x 30 ciclos
Hibridación	60° C	5 seg.		
Extensión	72° C	90 seg.		
	72° C	60 seg.		
	4° C	∞		

- 45 0.5 microlitros y 1 microlitro de la mezcla de reacción después de que se completara el procedimiento de PCR fueron sometidos a electroforesis utilizando un gel de agarosa analítico al 0.8 % y una solución tampón de 1x TBE buffer (0.5 microgramos/mL de bromuro de etidio).

- 50 En el análisis del gel de agarosa del 2º fragmento de PCR, fue confirmado que se produjo una amplificación de una banda única objetivo a aproximadamente 1.6 kbp. El rendimiento fue de al menos de 6 microgramos.

Purificación mediante el kit de purificación de PCR

- 55 El producto de PCR fue sometido a purificación de conformidad con el manual de procedimiento para el kit de purificación de PCR QIAquick, eliminando de este modo el cebador. La elución del ADN en la etapa final de la purificación utilizó 50 microlitros de 0.1x TE.

Parte del producto de PCR a partir del cual se eliminó el cebador fue diluido 20 veces con 0.1x TE, y se analizó de forma cuantitativa por un espectrofotómetro.

Tratamiento del producto de PCR con enzima de restricción

5 El producto de PCR purificado fue segmentado utilizando las enzimas de restricción Bcu I y Sal I. 10 microlitros de 10x Buffer O (solución tampón incluida con enzima) y 25 unidades de Sal I se añadieron a 5 microgramos del producto de PCR purificado y la cantidad total fue elevada a 100 microlitros utilizando 0.1x TE. Después de la incubación a 37° C durante 6 horas, se extrajeron 50 ng del mismo y se confirmó utilizando un gel de agarosa al 0.8 % que el ADN no había sufrido ninguna descomposición interna.

10 El tubo que contiene la mezcla de reacción de enzimas fue guardado en hielo a la espera de la confirmación. Después de que fue realizada la confirmación mediante electroforesis, el ADN fue purificado utilizando un kit de purificación de PCR QIAquick.

15 20 microlitros de 10x Buffer Tango (solución tampón incluida con enzima) y 110 unidades de Bcu I fueron añadidas y la cantidad total fue elevada a 200 microlitros utilizando 0.1x TE. Después de la incubación a 37° C durante 2 horas, se eliminó la proteína.

Fraccionamiento mediante gel de agarosa y excisión del producto de PCR

20 El producto de PCR segmentado por la enzima de restricción fue fraccionado por el mismo método que en la sección 'Fraccionamiento mediante gel de agarosa y excisión' descrito en el ejemplo 1 y una banda objetivo a aproximadamente 1.6 kbp fue objeto de excisión. A modo de gel, se utilizó un gel de agarosa al 0.8 % para la purificación, y 90 minutos después del inicio de la electroforesis, cuando una banda objetivo a aproximadamente 1.6 kbp alcanzó una posición a aproximadamente 1/3 del recorrido a lo largo del gel, se finalizó la electroforesis.

25 A modo de marcador de peso molecular, se utilizó un dispositivo Quick-Load 1 kb (NEB).

Elución del ADN a partir de gel de agarosa

30 El ADN fue objeto de elución a partir del gel objeto de excisión anterior con el mismo método que en la sección de 'Elución del ADN a partir del gala' descrito en el ejemplo 1.

35 Parte del producto de PCR purificado fue diluido 3 veces utilizando 0.1x TE, y se analizó de forma cuantitativa utilizando un espectrofotómetro.

40 Cuando el producto de PCR después del tratamiento de enzimas de restricción y de la purificación del gel de agarosa se sometió a medición utilizando un absorciómetro, la concentración de ADN fue de 16 ng/microlitro. Además, la relación de A260/280, que indica la pureza, fue de 2.041.

(3) Ligadura de pHU-eCDm-SPCM-pUCori lineal y el gen OriV-RepB

Una mezcla de reacción de ligadura (mezcla de reacción 1) y mezcla de reacción de control (mezcla de reacción 2 y mezcla de reacción 3) se prepararon como sigue.

45 Mezcla de reacción 1

50 4 microlitros de solución tampón 5x Rapid Ligation Buffer, 3.8 microlitros (50 ng) de pHU-eCDm-SPCM-pUCori (13 ng/microlitro), 3.9 microlitros (65 ng) de fragmento de OriV-RepB (16.5 ng/microlitro), 1 microlitro de 5 u/microlitro de T4 DNA ligase y 7.3 microlitros de 0.1x TE se añadieron a un tubo de PCR 0.2 mL (Bio-BIK) de modo que la relación molar del pHU-eCDm-SPCM-pUCori lineal (aproximadamente 3.6 kbp) para el gen de OriV-RepB (aproximadamente 1.6 kbp) fue de 1:3 (también 1:1:3 fue una relación en peso), lo que proporciona una mezcla de reacción de ligadura (mezcla de reacción 1).

55 Mezcla de reacción 2

De la misma manera, 4 microlitros de solución tampón 5x Rapid Ligation Buffer, 3.8 microlitros (50 ng) de pHU-eCDm-SPCM-pUCori (13 ng/microlitros), 1 microlitro de 5u/microlitro de T4 DNA Ligase, y 11.2 microlitros de 0.1x TE, se añadieron a un tubo de PCR de 0.2 mL esterilizado (Bio-BIK) y se realizó una mezcla en hielo, con lo que se obtuvo una mezcla de reacción con solamente pHU-eCDm-SPCM-pUCori (mezcla de reacción 2).

60 Mezcla de reacción 3

65 De la misma manera, 4 microlitros de solución tampón 5x Rapid Ligation Buffer, 3.9 microlitros (65 ng) de fragmento de OriV-RepB (16.5 ng/microlitro), 1 microlitro de 5u/microlitro de T4 DNA Ligase, y 11.1 microlitros de 0.1x TE, se añadieron a un tubo de PCR de 0.2 mL (Bio-BIK), y se realizó una mezcla en hielo, con lo que se obtuvo una mezcla de reacción con solamente un gen de OriV-RepB (mezcla de reacción 3).

Un ciclador térmico se estableció bajo las condiciones siguientes, después de que la temperatura del bloque alcanzó 22° C con los tubos colocados y se realizó un proceso de ligadura.

Fórmula 11

5	22°C	5 min.	(reacción de ligadura)
	65°C	5 min.	(reacción interrumpida)
	4°C	∞	

10 La proporción del fondo debido a plásmido no segmentado se estimó a partir de la mezcla de reacción 2 y la proporción del fondo debido a la presencia del ADN plasmídico utilizando como una plantilla se estimó a partir de la mezcla de reacción 3.

(4) Transformación de *E.coli*

15 La transformación de *E.coli* JM109 1 se realizó utilizando 1 microlitro después de la reacción de ligadura por el mismo método que en la sección de 'Transformación de *E.coli*' descrito en el ejemplo 1.

20 En la transformación utilizando el producto de ligadura del vector y la inserción (mezcla de reacción de ligadura 1), se formaron 238 y 216 colonias en un soporte selectivo por 100 microlitros de la suspensión bacteriana original después de la transformación, mientras que la mezcla de reacción de control 2 en la que solamente el vector fue ligado no se detectó ninguna colonia y en la transformación utilizando la mezcla de reacción de control 3 en la que solamente la inserción fue ligada, se detectaron 8 y 6 colonias. El fondo era muy bajo, lo que indica que se realizaron adecuadamente las funciones de ligadura y transformación.

25 (5) Comprobación de plásmido

Cultivo de *E.coli* recombinante

30 Realizado de conformidad con el método descrito en la sección 'Cultivo de *E.coli* recombinante' descrito en el ejemplo 1. El cultivo se realizó durante 22.5 horas.

Extracción del ADN plasmídico

35 Realizado por el método descrito en la sección 'Extracción de ADN plasmídico' descrito en el ejemplo 1.

Medición de la concentración del ADN plasmídico

40 Realizado por el método descrito en la sección de 'Medición de la concentración del ADN plasmídico' descrito en el ejemplo 1.

La relación A260/280, que indica la pureza del ADN, fue desde 1.951 a 1.958, y la pureza del ADN plasmídico fue adecuada. El rendimiento fue de al menos 10 microgramos.

Segmentación mediante enzima de restricción

45 La segmentación por Bcu I por sí misma, la segmentación por Sal I por sí misma y la segmentación por ambas Bcu I y Sal I se realizaron utilizando 100 ng de ADN plasmídico. Las condiciones de las reacciones estuvieron de conformidad con las instrucciones del producto para la enzima. El volumen de reacción fue de 20 microlitros.

50 Electroforesis de gel de agarosa

Realizado por el método descrito en la sección de 'Electroforesis de gel de agarosa' descrito en el ejemplo 1. Se utilizó un gel de agarosa analítico al 0.8 %.

55 Con respecto a las seis cepas candidatos, dos bandas de aproximadamente 3.6 kbp y 1.6 kbp fueron detectadas para la segmentación con los dos tipos de enzimas Bcu I y Sal I. Además, una banda a aproximadamente 5.2 kbp fue detectada a partir de la segmentación con la enzima Bcu I por sí misma o Sal I por sí misma. Ello indica que para todas las cepas candidatos, la magnitud del plásmido y su constitución fueron según diseño.

60 Comprobación de la secuencia de ADN plasmídico

65 Se realizó una operación de secuenciación utilizando el plasmídico anteriormente extraído con el mismo método que en la sección 'Comprobación de secuencia de ADN plasmídico' descrita en el ejemplo 1. A modo de cebador, se utilizaron conjuntos de cebadores 1, 2, 3, y 4 en la tabla 3 descrita en el ejemplo 1. La secuencia de nucleótidos plasmídico después de la alineación fue comparada con la secuencia de diseño (SEQ ID NO:3).

Las secuencias plasmídicas de cuatro cepas entre las seis cepas de clonación coincidieron con SEQ ID NO:3, y fue confirmado que se obtuvieron las cepas objetivo. Para las dos restantes cepas, se produjo una supresión de nucleótido único dentro de la unidad de pTB 6 rep. Una sola cepa fue seleccionada a partir de las cuatro cepas que coinciden con SEQ ID NO:3, y un plásmido extraído desde esta cepa fue definido como 'pCDshuttle'.

5

(6) Transformación de Bifidobacterium

Preparación de células competentes

10 Un stock de Bifidobacterium longum Re-105A en glicerol fue mantenido a la temperatura ambiente y agitado a fondo. Un tubo de ensayo de cristal esterilizado fue cargado con 10 mL de soporte acondicionado IMR y 100 microlitros del líquido bacteriano correspondiente fue añadido y mezclado a fondo. Todo ello fue colocado en un recipiente precintado junto con un agente generador de dióxido de carbono/desoxigenante y se realizó un cultivo permitiéndole un soporte a 37° C durante 24 horas (1° fluido de cultivo).

15

Después de ser agitado a fondo el primer fluido de cultivo, 100 microlitros del mismo fueron medidos y utilizados para inocular un tubo de ensayo cargado con 10 mL de soporte acondicionado IMR, que fue colocado en un recipiente precintado junto con un agente generador de dióxido de carbono/desoxigenante y el cultivo fue realizado permitiendo un soporte a 37° C durante 18 horas (2° fluido de cultivo).

20

30 mL de soporte acondicionado IMR fue dispensado en cada uno de cuatro tubos de ensayo de plástico esterilizado de 50 mL de volumen (tubos BD Falcon™, Becton, Dickinson and Company, Japón). Estos tubos fueron previamente calentados en una incubadora a 37° C y 1.5 mL del 2° fluido de cultivo fue añadido a cada tubo agitado. Los tapones fueron cerrados herméticamente, los tubos se colocaron en un recipiente precintado junto con un agente generador de dióxido de carbono/desoxigenante y se realizó el cultivo a una temperatura de 37° C. El cultivo fue finalizado cuando la turbidez (longitud de onda de 600 nm) llegó a ser de 0.213 después de transcurrir 1 hora y 35 minutos, y los tubos conteniendo el fluido de cultivo fueron transferidos en hielo. Se centrifugaron a 8000 rpm durante 5 minutos en 4° C. El sobrenadante fue desechado en un banco de trabajo limpio, 5 mL de una solución tampón PBS pre-enfriada en hielo fue añadido a cada tubo que contenía las células bacterianas, y las células bacterianas fueron dejadas suavemente en suspensión. Los cuatro tubos contenedores de la suspensión bacteriana fueron combinados en un solo tubo y este último fue centrifugado a 8000 rpm durante 4 minutos a 4° C. El sobrenadante fue desechado en un banco de trabajo limpio y 360 microlitros de solución tampón KMR pre-enfriada en hielo fue añadido a las células bacterianas de modo que volvieran a quedar en suspensión. La suspensión bacteriana era de aproximadamente 720 microlitros. Lo que antecede permaneció en hielo durante la noche, con lo que se obtuvieron células competentes. Una suspensión bacteriana fue preparada diluyendo parte de la misma dos veces con una cantidad igual de solución tampón KMR, y se definió como células competentes doblemente diluidas.

35

Transformación

40 80 microlitros de las células competentes se colocaron en un microtubo esterilizado de volumen de 1.5 mL. Enfriado con hielo por anticipado. 578 ng (1 microlitro) de pCDshuttle fue añadido al mismo, mezclado suavemente mediante una pipeta y luego dejado sobre hielo durante 5 minutos. Como un control positivo, 498 ng (2 microlitros) de pAV001-HU-eCD-M968, que había sido contrastado para replicación en un cultivo de bifidobacteria B. longum Re-105A, fue mezclado con las células competentes con el mismo procedimiento anterior. De la misma manera, las células competentes doblemente diluidas y 578 ng (1 microlitro) de pCDshuttle fueron objeto de mezcla. Cada una de las mezclas anteriores se transfirió a una cubeta (cubetas BM, BM Equipment Co., Ltd.) con enfriamiento en hielo por anticipado. En este proceso, células competentes sin ningún ADN añadido se añadieron también a otra cubeta (control negativo).

45

50 Una transformación (electroporación) fue realizada utilizando un sistema de electroporación (Gene Pulser II, Bio-Rad Laboratories, Inc.). El electroporador fue ajustado a una tensión de 2.0 kV, con un condensador de 25 micro F, y una resistencia de 200 omega, y accionado de conformidad con el manual de instrucciones para el sistema.

50

Después del choque eléctrico, una mezcla de 800 microlitros de soporte líquido IMR y 50 microlitros de un líquido con vitamina C añadido fue añadido inmediatamente a la cubeta, y esta última fue recubierta con un microtubo de 2 mL esterilizado. Cada tubo fue sometido a las mismas operaciones, y estos tubos de 2 mL fueron desprovistos de los tapones y colocados en un desecador. El aire dentro del desecador fue extraído utilizando una bomba de vacío y fue relleno con dióxido de carbono. Esta operación se repitió 3 veces con el fin de sustituir el aire dentro del desecador con dióxido de carbono y luego se colocó el desecador en una incubadora ajustada a 37° C y se sometió a incubación durante 3 horas.

55

60

Después de la incubación, cada suspensión bacteriana fue agitada convenientemente, se midieron 100 microlitros de la misma y se depositó en 2 láminas de soporte de agar IMR (conteniendo 75 microgramos/mL SPCM). Estas placas se colocaron en un recipiente precintado junto con un agente generador de dióxido de carbono/desoxigenante (AnaeroPack(R)-Anaero, Mitsubishi Gas Chemical Company), y se realizó un cultivo en una incubadora ajustada a 37° C durante 3 días.

65

Cultivo de colonias

6 colonias transformadas por pCDshuttle fueron seleccionadas de modo aleatorio, y utilizadas para inocular tubos de ensayo cargados con 10 mL de soporte acondicionado APS-2S-2.5R. Como un control, un stock de glicerol de banco de células maestro APS001C (fabricado el 22.3.2007, con n° de serie: 004-0127) fue depositado a la temperatura ambiente y 100 microlitros del mismo se utilizaron para inocular un tubo de ensayo cargado con 10 mL del soporte acondicionado de APS-2S-2.5R. Estos tubos de ensayo inoculados se colocaron en un recipiente precintado junto con un agente generador de dióxido de carbono/desoxigenante y se realizó un cultivo dejándole permanecer a 37° C durante 24 horas (1° fluido de cultivo).

Después de que se agitara adecuadamente el primer fluido de cultivo, 100 microlitros del mismo se midieron y utilizaron para inocular tubos de ensayo cargados con 10 mL del soporte acondicionado APS-2S-2.5R. Se colocaron en un recipiente precintado junto con un agente generador de dióxido de carbono/desoxigenante y se realizó un cultivo permitiendo permanecer a 37° C durante 24 horas (2° fluido de cultivo).

Extracción de plásmido

La extracción del plásmido y su purificación se realizaron utilizando 2 mL del primer fluido de cultivo separado de APS001C por medio de un kit de QIAprep Spin Miniprep. Los detalles estuvieron de conformidad con las instrucciones del producto para el kit.

Comprobación de plásmido (PCR)

Una comprobación de PCR fue realizada utilizando el ADN plasmídico así extraído a modo de plantilla y la presencia/ausencia del plásmido fue comprobada. Una mezcla de PCR fue preparada en hielo añadiendo 5 microlitros de ADN plasmídico, 10 microlitros de solución tampón 5x PrimeStar™ buffer, 4 microlitros de una mezcla de dNTP (2.5 mM cada una), 0.5 microlitros de cebador F1 de control 20 micromolar, 0.5 microlitros de cebador R2 de control 20 micromolar, 0.5 microlitros de polimerasa de ADN PrimeSTAR^{HS}, y 29.5 microlitros de 0.1x TE a un tubo de PCR de 0.2 mL esterilizado (Bio-BIK).

De la misma manera, una mezcla de PCR fue preparada como un control positivo utilizando como plantilla una solución preparada ajustando la concentración del plásmido pCDshuttle extraído desde *E. coli* a 10 pg/mL.

Un ciclador térmico fue establecido bajo las condiciones siguientes y después de que la temperatura del bloque alcanzó 98° C con los tubos colocados.

Fórmula 12

Desnaturalización	98° C	10 seg.	}	x 30 ciclos
Hibridación	58° C	5 seg.		
Extensión	72° C	60 seg.		
	72° C	60 seg.		
	4° C	∞		

La comprobación del producto de PCR fue realizada utilizando 1 microlitro de la mezcla de reacción después de que se terminara el proceso de PCR. Como un gel, se utilizó un gel de agarosa analítico al 0.8 %.

Ejemplo 4

Construcción de plásmido 'pBifiCD' (Etapa 4)

(1) Preparación de fragmento libre de pUC ori

Segmentación de plásmido mediante enzima de restricción

pCDshuttle fue segmentado por las enzimas de restricción Bgl II y Bam HI como sigue. 20 microlitros de 10x Buffer Bam HI (solución tampón incluida con enzima) y 69 unidades de Bam HI fueron añadidas a 10 microgramos de pCDshuttle, siendo la cantidad total elevada hasta 200 microlitros utilizando 0.1x TE, y se realizó la mezcla de forma adecuada. Después de la incubación a 37° C durante 3 horas y 10 minutos, se extrajeron 50 ng del mismo y se confirmó utilizando un gel de agarosa analítico al 0.8 % que la descomposición fue completa.

El tubo conteniendo la mezcla de reacción de enzimas fue guardado en hielo a la espera de la confirmación. Después de que fuera confirmada la segmentación por Bam HI se eliminó la proteína desde la solución de reacción de enzimas.

10 microlitros de 10x Buffer O (solución tampón incluida con enzima) y 45 unidades de Bgl II se añadieron, la cantidad total fue elevada a 100 microlitros utilizando 0.1x TE, y se realizó adecuadamente su mezcla. Después de una incubación a 37° C durante 2 horas, se extrajeron 100 ng y se confirmó, utilizando gel de agarosa analítico al 0.8 %, que la descomposición fue completa.

5 El tubo conteniendo la mezcla de reacción de enzimas fue guardado en hielo a la espera de confirmación.

10 0.1x TE fue añadido a 100 ng de la solución de ADN plasmídico segmentada por la enzima de restricción con el fin de elevar la cantidad total a 10 microlitros, 1 microlitro de solución tampón de carga 10x Loading fue añadido y se realizó la mezcla adecuadamente.

Lo que antecede fue utilizado como una muestra de electroforesis. Como un gel, se utilizó gel de agarosa analítico al 0.8 %.

15 Fraccionamiento mediante gel de agarosa y excisión

20 El vector segmentado por la enzima de restricción fue sometido a electroforesis durante 120 minutos por el mismo método que en la sección de 'Fraccionamiento mediante gel de agarosa y excisión' descrito en el ejemplo 1, y banda de ADN de aproximadamente 4.5 kbp fue objeto de excisión mientras la confirmación de que la banda objetivo a aproximadamente 4.5 kbp se había separado suficientemente de una banda indeseada a aproximadamente 650 bp. Como un marcador de peso molecular, se utilizó Quick-Load 1 kbp DNA Ladder.

Elución de ADN a partir de gel de agarosa

25 El ADN fue diluido a partir del gel objeto de excisión anterior por el mismo método que en la sección de 'Elución de ADN a partir del gel de agarosa' descrito en el ejemplo 1.

30 Parte del vector purificado por gel de agarosa fue diluido 15 veces utilizando 0.1x TE, y se analizó cuantitativamente utilizando un espectrofotómetro.

35 Cuando el pCDshuttle segmentado por la enzima de restricción y purificado por gel de agarosa fue sometido a medición utilizando un absorciómetro, la concentración de ADN fue de 47 ng/microlitro, y la relación de A260/280, que indica la pureza, fue de 1.937.

(2) Autoligadura de fragmento libre de pUC ori purificado

Reacción de ligadura

40 El fragmento libre de pUC ori purificado (aproximadamente 4.5 kbp) fue sometido a una autoligadura. 4 microlitros de solución tampón 5x Rapid Ligation Buffer, 1 microlitro (47 ng) de fragmento libre de pUC ori (47 ng/microlitro), 1 microlitro de 5 u/microlitros T4 DNA Ligase, y 14 microlitros de 0.1x TE se añadieron a un tubo de PCR de 0.2 mL esterilizado (Bio-BIK) y mezclado en hielo, con lo que proporcionó una mezcla de reacción de ligadura. Se prepararon 20 tubos de la mezcla de reacción.

45 Un ciclador térmico fue establecido bajo las condiciones siguientes y después de que la temperatura del bloque alcanzara 20° C se colocaron los tubos.

Fórmula 13

50	22°C	5 min.	(reacción de ligadura)
	65°C	5 min.	(reacción interrumpida)
	4°C	∞	

Purificación (eliminación de proteína y concentración)

55 Los 20 tubos de la mezcla de reacción de ligadura se combinaron en un solo microtubo esterilizado y se eliminó entonces la proteína. Una disolución de ADN fue realizada utilizando 10 microlitros de 0.1x TE.

(3) Transformación de Bifidobacterium

60 Transformación

65 La transformación (electroporación) de células competentes de Bifidobacterium longum Re-105A se realizó utilizando 500 ng (5 microlitros) de producto de reacción de ligadura purificado. Como un control de fondo, 500 ng (10 microlitros) de fragmento libre de pUC ori que no había sido sometido a una reacción de ligadura, fue mezclado con células competentes de la misma manera en un tubo separado. La operación de electroporación fue realizada

por el mismo método que en la sección de 'Transformación' descrita en el ejemplo 3.

Cultivo de colonias

- 5 8 colonias transformadas por el producto de reacción de ligadura purificado fueron seleccionadas de forma aleatoria y objeto de cultivo por el mismo método que en la sección de 'Cultivo de colonias' descrito en el ejemplo 3.

Extracción de plásmido

- 10 La extracción y purificación de plásmido se realizaron con el mismo método que en la sección de 'Extracción de ADN de plásmido' descrito en el ejemplo 1 utilizando 1.5 mL del primer fluido de cultivo.

Comprobación de plásmido (PCR)

- 15 El proceso de PCR fue realizado por el mismo método que la sección de 'Comprobación de plásmido' descrito en el ejemplo 3 utilizando el ADN plasmídico extraído anteriormente como una plantilla.

El producto de PCR fue comprobado utilizando 1 microlitro de la mezcla de reacción después de que se completara el proceso de PCR. Como gel, se utilizaron DOS tipos, es decir, geles de agarosa analíticos al 0.8% y al 2 %.

- 20 (4) Confirmación de secuencia de plásmidos

Cultivo

- 25 Un stock de glicerol de cepas de clonación de B. longum Re-105A/pBifiCD se agitó de forma adecuada y 100 microlitros del mismo se utilizó para inocular un tubo de ensayo cargado con un soporte acondicionado en la cantidad de 10 mL de APS-2S-2.5R. Este tubo de ensayo fue colocado en un recipiente precintado junto con un agente generador de dióxido de carbono/desoxigenante, y se realizó el cultivo permitiendo que permanezca a una temperatura de 37° C durante 24 horas (1° fluido de cultivo). Después de que se agitara adecuadamente el 1° fluido de cultivo, 100 microlitros del mismo fueron medidos y utilizados para inocular cada uno de dos tubos de ensayo cargados con 10 mL de soporte acondicionado de APS-2S-2.5R. Estos tubos de ensayo se colocaron en un recipiente precintado junto con un agente generador de dióxido de carbono/desoxigenante y se realizó un cultivo permitiendo que permanecieran a una temperatura de 37° C durante 24 horas (2° fluido de cultivo).

Extracción del plásmido

La extracción y purificación del plásmido se realizaron como sigue utilizando una cantidad adecuada del 2° fluido de cultivo por medio de un kit QIAprep Spin Miniprep.

- 40 Cuatro tubos de plástico esterilizados de volumen de 15 mL (BD Falcon™, Becton, Dickinson y Company, Japón) se cargaron cada uno con 2.5 mL del segundo fluido de cultivo y 7.5 mL de solución tampón 30 mM GTA se añadió a cada tubo. Este contenido fue agitado y luego centrifugado a 12000 rpm durante 15 minutos a 25° C y el sobrenadante fue desechado mediante pipeta. Después de que fuera añadido 10 mL de solución tampón 30 mM GTA a las células bacterianas, contenidas en los tubos, se centrifugaron a 12000 rpm durante 15 minutos a 25° C y el sobrenadante fue desechado mediante pipeta. Después de combinar dos tubos conteniendo las células bacterianas en uno solo, 1 mL de una solución de N-acetilmuramidasa (preparada en 3000 unidades/mL añadiendo solución tampón 30 mM GTA a un producto de N-acetilmuramidasa liofilizado, fabricado por Seikagaku Corporation) fue añadido a cada uno y mezclado de forma adecuada. Después de la incubación de estos tubos en un baño de agua establecido a 50° C durante 3 horas, se añadió al mismo 250 microlitros de 20 mg/mL proteinasa K (QIAGEN), se mezcló adecuadamente y se realizó una incubación en un baño de agua establecido a 60° C durante 30 minutos. Los dos tubos fueron combinados en uno solo.

- Una cantidad igual de solución tampón Buffer P1 (incluida con el kit) se añadió al mismo y fue objeto de mezcla (A). Esta mezcla fue dividida en cuatro tubos de plástico de volumen de 15 mL, en una cantidad igual a la de A de una solución Lysis (0.2 M NaOH/2% SDS) fue añadido al mismo y mezclado, siendo luego añadido un volumen de 1.4 veces el de A de Buffer N3 (incluido con el kit) y objeto de mezcla, y las células bacterianas fueron sometidas a bacteriolisis y neutralización. Después de centrifugar a 12000 rpm durante 15 minutos a 25° C, el sobrenadante fue recogido en un tubo de plástico de volumen de 15 mL. El líquido así recogido fue purificado utilizando 8 columnas de QIAquick Spin Column (incluidas con el kit). El método de purificación estuvo de conformidad con el manual del procedimiento para el kit. La elución de ADN de la etapa final fue realizada utilizando 50 microlitros de 0.1x TE, con lo que se obtuvo aproximadamente 400 microlitros de una solución plasmídica.

Comprobación de la secuencia de ADN plasmídica

- 65 Se realizó una operación de secuenciación utilizando el plásmido extraído anteriormente por el mismo método que en la sección de 'Comprobación de secuencia de ADN plasmídica' descrita en el ejemplo 1. Como cebadores, se

utilizaron conjuntos de cebadores 1,3, y 4 según la tabla 3 descrita en el ejemplo 1. La secuencia de nucleótidos plasmídicos después de la alineación fue objeto de comparación con la secuencia de diseño (SEQ ID NO:4).

5 El resultado de la determinación de la secuencia completa del plásmido extraído a partir de la cepa de clonación fue que la secuencia plasmídica de *B. longum* Re-105A/pBifiCD coincidía con SEQ ID NO:4.

El plasmídico extraído de esta cepa de clonación fue definido como 'pBifiCD'.

Ejemplo de ensayo 1

10

Comprobación de la tasa de compresión y propiedades básicas de Bifidobacterium

(1) Comprobación de la transformación de *B. longum* Re-105A

15 Un producto de autoligadura formado eliminando el sitio de pUC ori desde pCDshuttle y el cierre anular se comprobó el resultado de la transformación de *B. longum* Re-105A utilizando pCDshuttle.

Las mismas células competentes se utilizaron para las placas 1 a 5. Para un control negativo (placa nº 1) al que no se añadió ningún plásmido, el número de colonias fue 1 y 0.

20

Sin embargo, incluso para un control positivo (placa 5) transformada utilizando un plásmido lanzadera pAV001-HU-eCD-M968 (publicación de patente 5; WO 2007-136107) que había sido ya objeto de comprobación para la replicación en *Bifidobacterium*, el número de colonias fue 5 y 2, y la diferencia en el número con respecto al del control negativo fue pequeña. Ello indica que la eficiencia de la transformación de las células competentes en las placas 1 a 5 fue baja.

25

Por el contrario, para la placa 6, la concentración de las células competentes utilizadas fue diluida dos veces y cuando se realizó la transformación utilizando pCDshuttle, al menos 500 colonias se formaron por placa. Un control negativo para la placa 6 no fue realizado, pero se detectó que las colonias en la placa 6 eran muy similares a las que habían sido transformadas por el plásmido pCDshuttle. Además, se encontró que la concentración de las células competentes contribuyó en gran medida a la eficiencia de la transformación. Además, la comparación de un caso en el que la ligadura del fragmento en que había sido eliminado pUC ori desde pCDshuttle fue realizado y un caso en el que no fue realizado, como resultado de la transformación (placas 3 y 4, respectivamente), el número de colonias fue 3 y 8 para la placa 3 y 1 y 2 para la placa 4, y el número de colonias fue pequeño en ambos casos.

35

Los resultados se proporcionan en la Tabla 4.

Tabla 4 Transformación de *B. longum* Re-105A

Placa nº	Célula competente	ADN	(ufc/placa) Depósito en placa (100 mL)
1	<i>B.longum</i> Re-105A (x1)	-	1 0
2	<i>B.longum</i> Re-105A (x1)	pCDshuttle	2 6
3	<i>B.longum</i> Re-105A (x1)	pCDshuttle sin ligadura pUC ori +	3 8
4	<i>B.longum</i> Re-105A (x1)	pCDshuttle sin ligadura pUC ori -	1 2
5	<i>B.longum</i> Re-105A (x1)	pAV001-HU-eCD-M968	5 2
6	<i>B.longum</i> Re-105A (dilución x2)	pCDshuttle	>500 >500

40

(2) Comprobación de plásmido de *B. longum* Re-105A transformado

45 Cuando se realizó un proceso de PCR con cebador de control utilizando una plantilla de plásmido extraída de ocho cepas de clonación de *B. longum* Re-105A/pBifiCD y seis cepas de clonación de *B. longum* Re-105A/pCDshuttle, se detectó un producto de amplificación de aproximadamente 500 bp para las cepas de clonación de *B. longum* Re-105A/pBifiCD. Para las cepas de clonación de *B. longum* Re-105A/pCDshuttle, un producto de amplificación a 1.1 kbp fue detectado. Asimismo, fue confirmado que la totalidad de las cepas de clonación tenían un plásmido.

También fue demostrado que pBifiCD no contenía un fragmento de pUC ori.

Ejemplo de ensayo 2

5 Comprobación de la actividad de citosina desminasa

10 La actividad de citosina desminasa (CD) fue comprobada utilizando ocho cepas de clonación de *B. longum* Re-105A/pBifiCD y seis cepas de clonación de *B. longum* Re-105A/pCDshuttle. 1 mL de cada segundo fluido de cultivo en un soporte acondicionado PS-2S-2.5R fue lavado con solución tampón Tris buffer (pH 8.4) tres veces y luego sometido a ultrasonidos con la extracción de la proteína total. La cantidad de proteína total fue cuantitativamente medida con un método de Lowry modificado, y una reacción de enzimas empleando 5-fluorocitosina (5-FC) como un sustrato fue realizada utilizando 5 microgramos de proteína total. 5-Fluorouracilo (5-FU) formado por la reacción de enzimas es la cantidad de 5-FC restante fueron objeto de medida cuantitativa mediante cromatografía de líquidos y se calculó la actividad de la enzima CD.

15 A partir del resultado de la medición de la actividad de CD de las cepas de clonación de *B. longum* Re-105A/pBifiCD y las cepas de clonación de *B. longum* Re-105A/pCDshuttle, la actividad de CD de las ocho cepas de clonación de *B. longum* Re-105A/pBifiCD fue de 8.07 - 10.29 (valor medio: 8.74) unidades/microgramo de proteína total y fue difícil establecer cualquier diferencia entre las cepas bacterianas.

20 Además, la actividad de CD de las seis cepas de clonación de *B. longum* Re-105A/pCDshuttle fue de 8.13 - 9.66 (valor medio: 8.69) unidades/microgramo de proteína total, y fue similarmente difícil establecer cualquier diferencia entre las cepas bacterianas.

25 Las actividades de CD de las dos cepas de clonación fueron ligeramente más intensas, no existiendo ninguna reducción en la actividad de CD debida a la eliminación del fragmento de pUC ori, sino que más bien indicaban que se actuó de forma adecuada.

30 Fue demostrado por este ensayo que pCDshuttle y pBifiCD objeto de replicación en *Bifidobacterium* y que tenían una actividad de CD apropiada. Los resultados de la medición se indican en la Tabla 5.

Tabla 5 Actividades de CD utilizando proteínas totales

Cepas	Zona máxima		Tasa de conversión (%)	Conc. Proteínas (mg/mL)	Actividad CD (unidades/mg de proteína total)	
	5-FU	5-FC				
<i>B. longum</i> Re-105A /pCDshuttle	Nº 1	83317	874312	9.40	0.2556	9.4
	Nº 2	85159	867227	9.66	0.2985	9.66
	Nº 3	71781	843867	8.47	0.3572	8.47
	Nº 4	68331	840645	8.13	0.3662	8.13
	Nº 5	69681	837294	8.31	0.3798	8.31
	Nº 6	68460	841469	8.14	0.3775	8.14
<i>B. longum</i> Re-105A /pBifiCD	Nº 1	75600 72268	829106	9.03	0.2805	9.03
	Nº 2	72268	838034	8.58	0.303	8.58
	Nº 3	67964	843275	8.07	0.3188	8.07
	Nº 4	68377	837315	8.16	0.3324	8.16
	Nº 5	71344	835183	8.51	0.3753	8.51
	Nº 6	77285	870090	8.82	0.2805	8.82
	Nº 7	85810	814454	10.29	0.3053	10.29
	Nº 8	70636	832980	8.45	0.373	8.45

35 Ejemplo de ensayo 3

Comprobación de la estabilidad de retención de plásmidos

40 La estabilidad de retención de plásmidos cuando un fluido de cultivo suficientemente activado mediante cultivo en un soporte conteniendo espectinomicina fue objeto de cultivo en un soporte sin ninguna espectinomicina añadida que se comprobó como sigue:

Cultivo selectivo en un soporte con SPCM añadido

Después de que materiales de glicerol de DOS cepas de clonación de *B. longum* Re-105A/pBifiCD y un stock de glicerol de una cepa de clonación de *B. longum* Re-105A/pCDshuttle fueron objeto de agitación adecuada, 100 microlitros del mismo fueron medidos y utilizados para inocular tubos de ensayo cargados con 10 mL de soporte acondicionado APS-2S-2.5R. Una inoculación con APS001C MCB (nº de serie 004-0116) fue realizada también por el mismo procedimiento. Estos tubos de ensayo se colocaron en un recipientemente precintado junto con un agente generador de dióxido de carbono/desoxigenante y se realizó un cultivo permitiendo permanecer a 37° C durante 24 horas (1º fluido de cultivo).

Después de una agitación adecuada del primer fluido de cultivo, 10 microlitros del mismo se midieron y utilizaron para inocular 2 tubos de ensayo cargados con 10 mL de soporte acondicionado APS-2S-2.5R. Estos tubos de ensayo fueron colocados en un recipiente precintado junto con un agente generador de dióxido de carbono/desoxigenante y se realizó un cultivo permitiéndole permanecer a 37° C durante 24 horas (2º fluido de cultivo).

Cultivo no selectivo en soporte sin ningún SPCM añadido

Tubos de ensayo de 10 mL cargados con un soporte acondicionado de APS-2S-2.5R no selectivo se calentaron por anticipado en un baño de agua a 37° C y este soporte fue inoculado con 10 microlitros de cada uno de los segundos fluidos de cultivo en el soporte añadido de SPCM dentro de un banco de trabajo limpio (inoculación bacteriana al 0.1 %). Después de la inoculación, cada tubo de ensayo fue colocado en un recipiente precintado junto con un agente generador de dióxido de carbono / desoxigenante y colocado en una incubadora ajustada a la temperatura de 37° C. Una serie de estas operaciones fue realizada con rapidez de modo que fuera minimizado el cambio en la temperatura del soporte. Después de que estos dos tubos de ensayo fueran objeto de cultivo durante 24 horas, utilizando cada fluido de cultivo como un inóculo, un subcultivo en el soporte acondicionado APS-2S-2.5R no selectivo fue repetido por el mismo método.

Después de que el tercer paso del fluido de cultivo en el soporte acondicionado APS-2S-2.5R no selectivo fuera agitado por medios adecuados, 100 microlitros del mismo fueron medidos y añadidos a 9.9 mL de un diluyente anaeróbico (líquido de dilución de 10² veces) y mezclado de forma adecuada. El líquido de dilución de 10² veces fue diluido con el mismo método para obtener un líquido de dilución 10⁴ veces, y luego para proporcionar un líquido de dilución de 10⁶ veces. 100 microlitros de líquido de dilución 10⁶ veces fue depositado en placas sobre cada una de cinco láminas de soporte de agar BL. Estas placas fueron colocadas en un recipiente precintado junto con un agente generador de dióxido de carbono / desoxigenante y se realizó un cultivo anaeróbico en una incubadora ajustada a la temperatura de 37° C durante 2 días.

Replicación para el soporte de agar BL-bS

300 colonias separadas fueron seleccionadas de forma aleatoria, a partir del soporte de agar BL y utilizadas al respecto. Las colonias fueron recogidas utilizando un dispositivo de recogida dentado esterilizado y utilizado para inocular soportes de agar BLbS y soportes de agar BL en secuencia. Una inoculación fue realizada en un total de seis láminas de soporte de agar a 50 por lámina. Los soportes de agar, después de la inoculación, fueron colocados en un recipiente precintado junto con un agente generador de dióxido de carbono / desoxigenante en función del volumen del recipiente con el fin de mantener un estado anaeróbico y se realizó un cultivo a una temperatura de 37° C durante 1 día.

Un conteo después de la terminación del cultivo fue realizado marcando trazas de punzonado a partir del dispositivo de recogida dentado en donde no existía una proliferación aparente de bacterias y el conteo de trazas de punzonado distintas en donde se pudieron observar una proliferación de bacterias. Puesto que el plasmídico de retención de bacterias era resistente a SPCM, el porcentaje de bacterias de retención del plásmido fue proporcionado como el porcentaje de bacterias resistentes a SPCM. El porcentaje de bacterias de retención de plásmidos fue determinado a partir de la ecuación siguiente:

Ecuación 1

Porcentaje de bacterias de retención de plásmido =

$$\frac{\text{Número de marcas de punzonado de proliferación bacteriana sobre soporte de agar BL-bS}}{\text{Número de marcas de punzonado de proliferación bacteriana sobre soporte de agar BL}} \times 100$$

A partir del resultado de la medición de la estabilidad de retención del plásmido, el porcentaje de bacterias resistentes a espectinomicina en cepas de clonación número 1 y número 5 de *N. longum* Re-105A/pBifiCD, es decir, el porcentaje de bacterias de retención de plásmido, fue el valor muy alto de 87.7 % para ambas cepas.

Además, el porcentaje de bacterias de retención de plásmidos en *B. longum* Re-105A/pCDshuttle fue del 80.3 %.

Por el contrario, el porcentaje de bacterias de retención de plásmidos en *B. longum* Re-105A/pAV001-HU-eCD-M968 transformada por plásmido lanzadera pAV001-HU-eCD-M968 (APS001C: publicación de patente 6; WO 2007-136107) fue del 71.7 %, que es muy inferior al porcentaje de bacterias de retención de plásmidos en *B. longum* Re-105A/pBifiCD de la presente invención.

Fue confirmado que el plásmido pBifiCD de la presente invención fue retenido de forma estable dentro de la bifidobacteria *B. longum* Re-105A, y *B. longum* Re-105A/pBifiCD transformada por el plásmido pBifiCD de la presente invención que mostraron una muy alta estabilidad de retención plasmídica.

Además, en comparación con *B. longum* Re-105A/pAV001-HU-eCD-M968, las dos cepas de clonación presentaron un porcentaje muy bueno de bacterias de retención de plásmidos y, además, la cepa de clonación *B. longum* Re-105A/pBifiCD proporcionó un más alto porcentaje de bacterias de retención plasmídica que la cepa de clonación de *B. longum* Re-105A/pCDshuttle, lo que confirmó que la eliminación del fragmento de pUC ori mejoró el porcentaje de bacterias de retención plasmídica.

Los resultados de la medición se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6 Estabilidad de segregación plasmídica

Cepas	Crecimiento en BL-bS	Crecimiento en BL	Resistente en SPCM (%)
<i>B. longum</i> Re-105A/pBifi CD #1	263	300	87.7
<i>B. longum</i> Re-105A/pBifi CD #5	263	300	87.7
<i>B. longum</i> Re-105A/pCDshuttle #1	240	299	80.3
APS001C MCB	215	300	71.7

Ejemplo de ensayo 4

Comprobación de capacidad del plásmido 'pBifiCD' para la transformación de *E. coli*

La comprobación de que *E. coli* no fue transformada por el plásmido 'pBifiCD' de la presente invención, utilizando el plásmido lanzadera 'pCDshuttle' como un control, se realizó como sigue:

(1) Preparación de plásmido

El plásmido 'pBifiCD' de la presente invención y el plásmido de control 'pCDshuttle' se prepararon como sigue:

Cultivo

Un soporte acondicionado de APS-2S-2.5R fue inoculado al 1 % con la bifidobacteria transformada por el plásmido 'pBifiCD' (*B. longum* Re-105A/pBifiCD) preparado en el ejemplo 4, con colocación en un recipiente precintado con un agente generador de dióxido de carbono / desoxigenante, y cultivado a una temperatura de 37° C durante 24 horas, después de una agitación adecuada, el soporte acondicionado APS-2S-2.5R fue inoculado con 1 % del mismo y se realizó un cultivo durante 24 horas de la misma manera.

De modo similar, el soporte acondicionado APS-2S-2.5R fue inoculado al 1 % con la bifidobacteria transformada con el plásmido lanzadera 'pCDshuttle' (*B. longum* Re-105A/pCDshuttle) preparado en el ejemplo 3, colocado en un recipiente precintado con un agente generador de dióxido de carbono / desoxigenante y cultivado a una temperatura de 37° C durante 24 horas. Después de una agitación adecuada, el soporte acondicionado APS-2S-2.5R fue inoculado con 1 % del mismo y se realizó un cultivo durante 24 horas de la misma manera.

Extracción de plásmido

2 mL de cada uno de los fluidos de cultivo anteriores fue lavado dos veces con una solución tampón de 30 mM GTA buffer (pH 5.5), y sometido a un tratamiento de N-acetilmuramidasa, y luego a un tratamiento de proteinasa K. Se realizó una purificación por medio de un kit de QIAprep Spin MiniPrep para extraer de este modo el plásmido ADN y aproximadamente 9 microgramos de plásmido ADN se obtuvieron en cada caso.

(2) Transformación de *E. coli*

La transformación de células competentes de *E. coli* JM109 (Takara Bio Inc.) (100 microlitros) se realizó mediante un choque térmico utilizando 50 ng (1 microlitro) de cada uno de los plásmidos 'pCDshuttle' y 'pBifiCD' preparados con anterioridad. El método de transformación estaba de acuerdo con las instrucciones del producto suministrado por las

células competentes.

100 microlitros de cada una de las suspensiones bacterianas después del choque térmico y de la incubación con el soporte de SOC añadido se depositaron sobre dos placas de soporte de agar LB (conteniendo 75 microgramos/mL de espectinomicina), y fueron objeto de cultivo a una temperatura de 37° C durante la noche.

A partir del resultado de la comprobación de la presencia o ausencia de colonias en cada una de las placas después del cultivo, se detectaron colonias solamente en *E.coli* transformada utilizando el plásmido de control 'pCDshuttle'.

Por el contrario, no se detectaron colonias después de la transformación mediante un control negativo en el que se añadió 0.1 x TE en lugar de plásmido, o por el plásmido 'pBifiCD' de la presente invención.

Fue confirmado que incluso cuando el plásmido 'pBifiCD' de la presente invención fue forzosamente introducido en *E.coli*, no pudo ser replicado dentro de *E.coli*.

Los resultados se proporcionan en la Tabla 7.

Tabla 7 Transformación de *E.coli* JM109 con pCDshuttle o pBifiCD

Nombre de la muestra	Número de colonias por placa
pCDshuttle	35, 53
pBifiCD	0, 0
0.1xTE (control negativo)	0, 0

Ejemplo de ensayo 5

Comprobación del efecto antitumoral de la cepa de clonación de B. longum Re-105A/pBifiCD

(1) Preparación de células viables cultivadas de la cepa de clonación B. longum Re-105A/pBifiCD (fármaco de ensayo)

Se realizó un cultivo activado mediante la agitación de un stock de glicerol de la cepa de clonación B. longum Re-105A/pBifiCD a la temperatura normal, inoculando con una cantidad adecuada del mismo un tubo de ensayo cargado con un soporte líquido con carbonato cálcico añadido, colocándolo en un recipiente precintado junto con un agente generador de dióxido de carbono/desoxigenante y se realizó un cultivo anaeróbico en una incubadora a una temperatura de 37° C durante 24 horas. Posteriormente un tubo de ensayo cargado con un soporte líquido sin carbonato cálcico añadido fue inoculado con una cantidad adecuada de este cultivo líquido y fue objeto de cultivo bajo las mismas condiciones anaeróbicas durante 18 horas (cultivo principal).

El cultivo líquido fue transferido a un tubo cónico de polipropileno de volumen de 50 mL (Becton, Dickinson y Company, Japón), y 5 mL de este cultivo líquido mezclado fue objeto de mezcla adecuada con una cantidad (20 mL) de compuesto salino fisiológico empleado (5° C), con tres tubos así preparados. Se realizó un lavado sometiendo cada tubo a centrifugación a 8,000 rpm durante 10 minutos mientras se enfriaba (4° C) y después de que fuera desechado el sobrenadante, se añadió, además, 20 mL de compuesto salino fisiológico enfriado para de este modo poner en suspensión la bacteria (operación de lavado 1). Esta operación de lavado fue realizada dos veces más y después de que los líquidos bacterianos hubieran sido lavados un total de tres veces se combinaron en un solo tubo, siendo ajustado el volumen de la suspensión bacteriana a 6.5 mL. La suspensión bacteriana, así lavada, fue filtrada utilizando un filtro de membrana de 8 micrómetros (policarbonato, Toyo Roshi Kaisha, Ltd., K800A025A), y las bacterias viables en un filtrado así recogido (líquido bacteriano viable objeto de cultivo) se utilizaron como un fármaco de ensayo.

(2) Cultivo de células tumorales trasplantadas

Células de la línea de células de cáncer de mama humano KPL-1 se cultivaron a una temperatura de 37° C bajo condiciones de 5 % de CO₂ en un soporte DMEM con la adición de 1 v/v % penicilina (50000 U/ mL)/estreptomycin (50 mg/mL) y FBS (10 v/v %) inmovilizado a una temperatura de 56° C durante 30 minutos.

Cuando se añadió confluyente, después del lavado con 1 x PBS(-), 1 x trypsin-EDTA fue añadido con el fin de distribución en las células, y las células recogidas por centrifugación (1000 rpm/5 minutos) fueron diluidas como adecuadas con un soporte DMEM y fue objeto de subcultivo.

En un experimento de trasplante, se utilizaron células de quinto paso. El número de células viables que no habían sido tratadas por azul de Trypan fueron contabilizadas por un hemocitómetro Thoma (Thoma 0.1 mm deep ERMA, Tokio), y el número de células fue ajustado a 2.5 x 10⁶ célula/mL mediante su suspensión en una solución de Hanks

(3) Preparación de ratones desnudos portadores de tumores y medición del volumen del tumor

0.2 mL de la suspensión de células KPL-1 anteriormente preparada fue objeto de trasplante bajo la piel del lado posterior de la extremidad derecha de un ratón desnudo (5×10^5 células/ratón).

El volumen de un tumor después del trasplante fue determinado a partir de la ecuación siguiente midiendo las dimensiones del tumor (diámetro mayor, diámetro menor, espesor) utilizando calibres adecuados.

$$\text{Volumen del tumor (mm}^3\text{)} = \text{diámetro mayor (mm)} \times \text{diámetro menor (mm)} \times \text{espesor (mm)}/2$$

(4) Agrupamiento y administración de bacterias viables cultivadas (fármaco de ensayo) fuente de azúcar (lactulosa) y profármaco (5-FC)

Agrupamiento y administración de bacterias viables cultivadas (fármaco de ensayo)

16 ratones portadores de tumores KPL-1 teniendo un volumen tumoral del orden de magnitud de 60 a 95 mm³ fueron seleccionados y uniformemente divididos en dos grupos (8 ratones por grupo), se utilizó un solo grupo como un grupo de control (grupo no tratado) y el otro grupo se utilizó como un grupo tratado.

0.3 mL por ratón de bacterias viables cultivada (fármaco de ensayo) fueron objeto de administración intravenosa al grupo tratado tres veces (AM/PM) por día durante dos días (día 1 y día 2).

El volumen total de bacterias viables cultivadas administradas fue de 1.8 mL, y el número total de células administradas fue de 5.9×10^9 ufc/ratón.

El número de bacterias viables administradas fue medido como sigue.

Medición del número de bacterias viables

Un líquido bacteriano cultivado fue diluido 10^6 veces con un diluyente anaeróbico y 100 microlitros del mismo fue depositado en tres placas BLFS y cultivado de forma anaeróbica en un recipiente precintado (frasco rectangular Aneropack, Mitsubishi Gas Chemical Co., Ltd.) junto con un agente generador de dióxido de carbono / desoxigenante en una incubadora a una temperatura de 37° C durante 3 días. El número de bacterias administradas fue calculado a partir de la ecuación siguiente desde una placa en donde el número de colonias detectadas fue del orden de magnitud de 30 a 300.

$$\text{Número de bacterias administradas (ufc)} = \text{Número de colonias (a)} \times \text{tasa de dilución en depósito en placa (b)} \times \text{factor de conversión (c) por 1 mL de preparación} \times \text{dosis (mL)}$$

(a): $(P1+P2+P3)/3$ (número medio de colonias de 3 placas (P1, P2, P3))

(b): $\times 10^6$ (10^6 veces)

(c): $\times 10$ (100 microlitros fue depositado por placa)

Administración de lactulosa

Una solución de lactulosa fue administrada, además, como sigue, al grupo tratado como una fuente de azúcar para las bacterias.

1 mL de una solución de lactulosa que había sido disuelta en agua purificada al 20 % (w/v) y sometida a autoclave a una temperatura de 121° C durante 30 minutos fue administrada en la cavidad abdominal de un ratón una vez por día.

El período de administración fue de 21 días (día 3 a día 23) a partir del día después de que se terminara la administración de las bacterias viables cultivadas.

Administración de flucitosina (5-FC)

0.4 mL de solución 5-FC fue administrada por vía oral a un ratón tres veces por día (a aproximadamente 9:00, 14:00, y 18:00) (cantidad de administración total 1.2 mL).

El período de administración fue de 21 días (día 3 a día 23) después de que se completara la administración de bacterias viables cultivadas APS001F.

(5) Comprobación de defectos de supresión del crecimiento tumoral

El diámetro del tumor fue medido para la totalidad de los ratones antes de iniciar el tratamiento (en el momento del

agrupamiento) y 24 días después del tratamiento que había sido iniciado a una frecuencia de una vez en 3 a 4 días y se comprobó el efecto sobre el crecimiento tumoral.

5 Un valor medio más/menos SD del volumen tumoral de ratón de cada grupo fue capturado y el efecto antitumoral fue determinado utilizando como un índice la relación de volumen tumoral relativa (T/C(%)) con respecto al grupo de control.

Los volúmenes tumorales (valor medio +/- SD) del grupo de control y del grupo tratado se indican en la tabla 8.

10 Además, el cambio en el volumen tumoral durante días se indica en la Figura 5.

La tasa de volumen tumoral relativa (T/C(%)) del grupo tratado en el día final del ensayo (día 24) fue del 23.0 % y se observó una notable actividad de supresión del crecimiento tumoral.

15 Tabla 8 Efecto antitumoral de la cepa de clonación de *B.longum* Re-105A/pBifiCD

Tratamiento	Nº de ratones	Tamaño tumoral (mm ³) ± SD								T/C(%) en el día 24	Dos ensayos finales (valor p)
		Día 0	3	7	10	14	17	21	24		
A) Control no tratado	8	74.5	122.3	205.3	370.1	560.8	912.0	1612.1	2115.7	-	-
		12.5	44.2	78.7	212.5	285.4	564.8	765.4	1009.9		
B) APS001F(intacto) +5-FC+Lactulosa	8	74.7	924	132.3	154.5	270.1	365.6	484.4	486.5	23.0	0.002
		10.7	15.4	54.7	41.8	120.0	180.4	211.8	265.0		

Aplicabilidad industrial

20 El objeto de la presente invención es proporcionar un vector de expresión que es objeto de replicación solamente en una bacteria transformante y no se replica en una bacteria distinta de la bacteria transformante y en particular, no en una bacteria anaeróbica patogénica o aeróbica o facultativa tal como *E.coli* y un proceso para su construcción. Además, el proceso de la presente invención es dar a conocer un transportador de genes formado a partir de un microorganismo anaeróbico transformado por el vector de expresión, una composición farmacéutica que contiene el transportador de genes y un agente de tratamiento de tumores sólidos que contiene la bacteria.

25 El vector de la presente invención es un vector muy seguro que no contiene un origen de replicación que funciona en una bacteria, particularmente en *E.coli*, distinta de la bacteria transformante y no tiene ninguna posibilidad de ser replicado una bacteria distinta de la bacteria transformante y en particular, no en una bacteria patógena, o aeróbica o anaeróbica facultativa, tal como *E.coli*. Un transportador de genes transformado utilizando el vector de la presente invención tiene una alta estabilidad de retención de plásmidos y no existe ninguna posibilidad aun cuando sea objeto de transformación horizontal a una bacteria distinta de la bacteria transformante, y en particular, a una bacteria patógena, o aeróbica o anaeróbica facultativa, tal como *E.coli*, siendo objeto de replicación en la bacteria y es prometedora de un transportador de genes de alta calidad y seguridad.

35 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Shimatani-Shibata, Yuko Shimizu, Hitomi Yonekura, Hiromi

40 <120> Vector de expresión

<130> Solicitud provisional de patente de Estados Unidos número 61/124,528

<160> 4

45 <170> Versión de patente 3.1

<210> 1

<211> 1793

50 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> plásmido pSPCM-pUCori

55 <400> 1

ES 2 628 378 T3

actagtagaa agcttagagt cgactcgatt ttcgttcgtg aatacatggt ataataacta	60
taactaataa cgtaacgtga ctggcaagag atatttttaa aacaatgaat aggtttacac	120
ttactttagt tttatggaaa tgaaagatca tatcatatat aatctagaat aaaattaact	180
aaaataatta ttatctagat aaaaaattta gaagccaatg aatctataa ataaactaaa	240
ttaagtttat ttaattaaca actatggata taaaataggt actaatcaaa atagtgagga	300
ggatatattt gaatacatac gaacaaatta ataaagtga aaaaatactt cggaaacatt	360
taaaaaataa ccttattggt acttacatgt ttggatcagg agttgagagt ggactaaaac	420
caaatagtga tcttgacttt ttagtcgtcg tatctgaacc attgacagat caaagtaaag	480
aaatacttat acaaaaaatt agacctattt caaaaaaat aggagataaa agcaacttac	540
gatatattga attaacaatt attattcagc aagaaatggt accgtggaat catcctccca	600
aacaagaatt tatttatgga gaatggttac aagagcttta tgaacaagga tacattcctc	660
agaaggaatt aaattcagat ttaaccataa tgctttacca agcaaaacga aaaaataaaa	720
gaatatacgg aaattatgac ttagaggaat tactacctga tattccattt tctgatgtga	780
gaagagccat tatggattcg tcagaggaat taatagataa ttatcaggat gatgaaacca	840
actctatatt aactttatgc cgtatgattt taactatgga cacgggtaaa atcataccea	900
aagatattgc gggaaatgca gtggctgaat cttctccatt agaacatagg gagagaattt	960
tgttagcagt tcgtagttat cttggagaga atattgaatg gactaatgaa aatgtaaatt	1020
taactataaa ctatttaa ataacagattaa aaaaattata aaaaattga aaaaatggtg	1080
gaaacacttt tttcaatttt ttagatctt gagcaaaagg ccagcaaaag gccaggaacc	1140

ES 2 628 378 T3

```

gtaaaaaggc cgcgttgctg gcgtttttcc ataggctccg cccccctgac gagcatcaca 1200
aaaatcgacg ctcaagtcag aggtggcgaa acccgacagg actataaaga taccaggcgt 1260
ttccccctgg aagctccctc gtgcgctctc ctgttccgac cctgccgctt accggatacc 1320
tgtccgcctt tctcccttcg ggaagcgtgg cgctttctca tagctcacgc tgtaggtatc 1380
tcagttcggg gtaggtcgtt cgctccaagc tgggctgtgt gcacgaacc cccgttcagc 1440
ccgaccgctg cgccttatcc ggtaactatc gtcttgagtc caaccggta agacacgact 1500
tatcgccact ggcagcagcc actggtaaca ggattagcag agcgaggat gtaggcggtg 1560
ctacagagtt cttgaagtgg tggcctaact acggctacac tagaagaaca gtatttggtg 1620
tctgcgctct gctgaagcca gttaccttcg gaaaaagagt tggtagctct tgatccggca 1680
aacaaccac cgctggtagc ggtggttttt ttgtttgcaa gcagcagatt acgcgcagaa 1740
aaaaaggatc tcaagaagat cctttgatct tttctacgga tccttctcga gtc 1793

```

<210> 2
 <211> 3566
 <212> ADN
 <213> Artificial

5

<220>

10 <223> pHU-eCDm-SPCM-pUCori

<400> 2

ES 2 628 378 T3

ggatccgtct	tctgctggc	ctatgcattg	ggttccgcag	tgcccactcc	aggcggctctg	60
ggcgggtgtgg	aagcggcgct	gacattcgcg	ttcgtggcgg	tccgagtgcc	gcagggcgctg	120
gcgctttccg	ccactttgct	gcaccgcgtg	gtgttctact	ggctgcgcac	tccgctgggc	180
gcggcgcca	tgaagtggct	tgacaagcat	aatcttgtct	gattcgtcta	ttttcatacc	240
cccttcgggg	aaatagatgt	gaaaaccctt	ataaaacgcg	ggttttcgca	gaaacatgcg	300
ctagtatcat	tgatgacaac	atggactaag	caaaagtgtc	tgtcccctga	ccaagaagg	360
atgctttatg	gcatacaaca	agtctgacct	cgtttcgaat	aacgctttac	aaacaattat	420
taacgcccgg	ttaccaggcg	aagaggggct	gtggcagatt	catctgcagg	acggaaaaat	480
cagcgccatt	gatgcgcaat	ccggcgtgat	gcccataact	gaaaacagcc	tggatgccga	540
acaaggttta	gttataccgc	cgtttgtgga	gccacatatt	cacctggaca	ccacgcaaac	600
cgccggacaa	cogaactgga	atcagtcggg	cacgctgttt	gaaggcattg	aacgctgggc	660
cgagcgcaaa	gcgttattaa	cccatgacga	tgtgaaacaa	cgcgcatggc	aaacgctgaa	720
atggcagatt	gccaacggca	ttcagcatgt	gcgtacccat	gtcgatgttt	cggatgcaac	780
gctaactgcg	ctgaaagcaa	tgctggaagt	gaagcaggaa	gtcgcgccgt	ggattgatct	840
gcaaatcgtc	gccttcctc	aggaagggat	tttgtcgtat	cccaacggtg	aagcgttgct	900

ES 2 628 378 T3

ggaagaggcg ttacgcttag gggcagatgt agtgggggagc attccgcatt ttgaatttac 960
 ccgtgaatac ggcgtggagt cgctgcataa aaccttcgcc ctggcgcaaa aatacgaccg 1020
 tctcatcgac gttcactgtg atgagatcga tgacgagcag tcgcgctttg tcgaaaccgt 1080
 tgctgccttg gcgcaccatg aaggcatggg cgcgcgagtc accgccagcc acaccacggc 1140
 aatgcactcc tataacgggg cgtatacctc acgcctgttc cgcttgctga aatgtccgg 1200
 tattaacttt gtcgccaacc cgctgggtcaa tattcatctg caaggacggt tcgatacgta 1260
 tccaaaacgt cgcgcatca cgcggttaa agagatgctg gagtccggca ttaacgtctg 1320
 ctttggtcac gatgctgtct tcgatccgtg gtatccgctg ggaacggcga atatgctgca 1380
 agtgctgcat atggggctgc atgtttgcca gttgatgggc tacgggcaga ttaacgatgg 1440
 cctgaattta atcaccacc acagcgcaag gacgttgaat ttgcaggatt acggcattgc 1500
 cgccggaac agcgccaacc tgattatcct gccggctgaa aatgggtttg atgcgctgcg 1560
 ccgtcagggt ccggtacggt attcgggtacg tggcggcaag gtgattgcca gcacacaacc 1620
 ggcacaaacc accgtatatac tggagcagcc agaagccatc gattacaaac gttgacctc 1680
 tgctcgtagc gattacttcg agcattactg acgacaaaga ccccgaccga gatggtcggg 1740
 gtctttttgt tgtgggtgctg tgacgtggtg tccaaccgta ttattccgga ctagtagaaa 1800
 gcttagagtc gactcgattt tcgttcgtga atacatgta taataactat aactaataac 1860
 gtaacgtgac tggcaagaga tatttttaaa acaatgaata ggtttacact tactttagtt 1920
 ttatggaaat gaaagatcat atcatatata atctagaata aaattaacta aaataattat 1980
 tatctagata aaaaatttag aagccaatga aatctataaa taaactaaat taagtttatt 2040
 taattaacaa ctatggatat aaaataggta ctaatcaaaa tagtgaggag gatatatattg 2100
 aatacatagc aacaaattaa taaagtgaaa aaaatacttc ggaaacattt aaaaaataac 2160
 cttattggta cttacatggt tggatcagga gttgagagtg gactaaaacc aatagtgat 2220
 cttgactttt tagtcgtcgt atctgaacca ttgacagatc aaagtaaaga aatacttata 2280
 caaaaaatta gacctatttc aaaaaaata ggagataaaa gcaacttacg atatattgaa 2340
 ttaacaatta ttattcagca agaaatggta ccgtggaatc atcctcccaa acaagaattt 2400
 atttatggag aatggttaca agagctttat gaacaaggat acattcctca gaaggaatta 2460
 aattcagatt taaccataat gctttacca gcaaaacgaa aaaataaaag aatatacgga 2520
 aattatgact tagaggaatt actacctgat attccatttt ctgatgtgag aagagccatt 2580
 atggattcgt cagaggaatt aatagataat tatcaggatg atgaaaccaa ctctatatta 2640
 actttatgcc gtatgatattt aactatggac acgggtaaaa tcataccaaa agatattgcg 2700

ES 2 628 378 T3

ggaaatgcag tggctgaatc ttctccatta gaacataggg agagaatddd gttagcagtt 2760
 cgtagttatc ttggagagaa tattgaatgg actaatgaaa atgtaaattt aactataaac 2820
 tatttaaata acagattaaa aaaattataa aaaaattgaa aaaatgggtg aaacactddd 2880
 ttcaatddd tttagatcttg agcaaaaggc cagcaaaagg ccaggaaccg taaaaaggcc 2940
 gcgttgctgg cgtdtttcca taggctccgc ccccctgacg agcatcacia aaatcgacgc 3000
 tcaagtcaga ggtggcgaaa cccgacagga ctataaagat accaggcgtt tccccctgga 3060
 agctccctcg tgcgctctcc tgttccgacc ctgccgctta cgggatacct gtccgccttt 3120
 ctcccttcgg gaagcgtggc gctttctcat agctcacgct gtaggtatct cagttcgggtg 3180
 taggtcgttc gctccaagct gggctgtgtg cacgaacccc cgttcagcc cgaccgctgc 3240
 gccttatccg gtaactatcg tcttgagtc aaccggtaa gacacgactt atcgccactg 3300
 gcagcagcca ctggtaacag gattagcaga gcgaggtatg taggcgggtgc tacagagttc 3360
 ttgaagtggg ggcctaacta cggctacact agaagaacag tatttgggat ctgcgctctg 3420
 ctgaagccag ttaccttcgg aaaaagagtt ggtagctctt gatccggcaa acaaaccacc 3480
 gctggtagcg gtggtdtttt tgtdtgcaag cagcagatta cgcgcagaaa aaaaggatct 3540
 caagaagatc ctttgatctt ttctac 3566

- <210> 3
- <211> 5150
- 5 <212> ADN
- <213> Artificial

- <220>
- <223> pCDshuttle
- 10 <400> 3

ES 2 628 378 T3

ggatccgtct tctgctggc ctatgcattg ggttccgcag tgcccactcc aggcggctctg 60
ggcgggtgtg aagcggcgct gacattcgcg ttcgtggcgg tcggagtgcc gcagggcgtg 120
gcgctttccg ccactttgct gcaccgcgtg gtgttctact ggctgcgcat tccgctgggc 180
gcggcggcca tgaagtggct tgacaagcat aatcttgtct gattcgtcta tttcatacc 240
cccttcgggg aaatagatgt gaaaaccctt ataaaacgcg ggttttcgca gaaacatgcg 300
ctagtatcat tgatgacaac atggactaag caaaagtgct tgtcccctga cccaagaagg 360
atgctttatg gcatacaaca agtctgacct cgtttcgaat aacgctttac aaacaattat 420
taacgcccgg ttaccaggcg aagaggggct gtggcagatt catctgcagg acggaaaaat 480
cagcgccatt gatgcgcaat ccggcgtgat gcccataact gaaaacagcc tggatgccga 540
acaaggttta gttataccgc cgtttgtgga gccacatatt cacctggaca ccacgcaaac 600
cgccggacaa ccgaactgga atcagtcggg cacgctgttt gaaggcattg aacgctgggc 660

ES 2 628 378 T3

cgagcgcaaa	gcgttattaa	cccatgacga	tgtgaaacaa	cgcgcatggc	aaacgctgaa	720
atggcagatt	gccaacggca	ttcagcatgt	gcgtacccat	gtcgatgttt	cggatgcaac	780
gctaactgcg	ctgaaagcaa	tgctggaagt	gaagcaggaa	gtcgcgccgt	ggattgatct	840
gcaaatcgtc	gccttcctc	aggaagggat	tttgtcgtat	cccaacggtg	aagcgttgct	900
ggaagaggcg	ttacgcttag	gggcagatgt	agtggggcg	attccgcatt	ttgaatttac	960
ccgtgaatac	ggcgtggagt	cgctgcataa	aaccttcgcc	ctggcgcaaa	aatacgaccg	1020
tctcatcgac	gttcaactgtg	atgagatcga	tgacgagcag	tcgcgctttg	tcgaaaccgt	1080
tgctgccctg	gcgcaccatg	aaggcatggg	cgcgcgagtc	accgccagcc	acaccacggc	1140
aatgcactcc	tataacgggg	cgatacctc	acgcctgttc	cgcttgctga	aaatgtccgg	1200
tattaacttt	gtcgccaacc	cgctggtcaa	tattcatctg	caaggacggt	tcgatacgta	1260
tccaaaacgt	cgcgcatca	cgcgcgtaa	agagatgctg	gagtcggca	ttaacgtctg	1320
ctttggtcac	gatgctgtct	tcgatccgtg	gtatccgctg	ggaacggcga	atatgctgca	1380
agtgctgcat	atggggctgc	atgtttgcca	gttgatgggc	tacgggcaga	ttaacgatgg	1440
cctgaattta	atcaccacc	acagcgcaag	gacgttgaat	ttgcaggatt	acggcattgc	1500
cgccggaaac	agcgccaacc	tgattatcct	gccggctgaa	aatgggtttg	atgcgctgcg	1560
ccgtcagggt	ccggtacgtt	attcggtagc	tggcggcaag	gtgattgcca	gcacacaacc	1620
ggcacaaacc	accgtatatac	tggagcagcc	agaagccatc	gattacaaac	gttgaccttc	1680
tgctcgtagc	gattacttcg	agcattactg	acgacaaaga	ccccgaccga	gatggtcggg	1740
gtctttttgt	tgtggtgctg	tgacgtggtg	tccaaccgta	ttattccgga	ctagtcctcc	1800
aggacctcgt	ctacgaggcg	ctgagcgagg	aatggcgcaa	aaggacggc	gagatcagcg	1860
acccatgggc	caacgacgag	gcggacggat	accagccgcc	ctcatagcag	ccggtcaacc	1920
ccgaacgcag	gactccccag	acgccctccg	atggcctgat	ctgacgtccg	aaaaaaggcg	1980
ctgtgcgccc	tttttaaatac	ttttataaat	ctttttacat	tcttttagcc	cctccgcagc	2040
cttactctcc	caacggggttt	cagccgaaac	ctacaccaa	aggggagcga	acctacacca	2100
aaaggggagc	gaacctacac	caaaagggga	gcgaacctac	accaaagg	gagctatata	2160
caccttttgt	tatttaaggt	gcaagttgtg	ctatgctgag	gcatgtcca	atgagatcgt	2220
gaagttcagc	aaccagttca	acaacgtcgc	gctgaagaag	ttcgacgccg	tgcacctgga	2280
cgtgctcatg	gcgatcgctt	caaggggtgag	ggagaagggc	acggccacgg	tggagttctc	2340
gttcgaggag	ctgcgcggcc	tcatgcgatt	gaggaagaac	ctgaccaaca	agcagctggc	2400
cgacaagatc	gtgcagacga	acgcgcgctt	gctggcgctg	aactacatgt	tcgaggattc	2460

ES 2 628 378 T3

gggcaagatc atccagttcg cgctgttcac gaagttcgtc accgaccgcg aggaggcgac 2520
 tctcgcgggtt ggggtcaacg aggagttcgc gttcctgctc aacgacctga ccagccagtt 2580
 cacgcgcttc gagctggccg agttcgccga cctcaagagc aagtacgcca aggagttcta 2640
 ccgcagggcc aagcagtacc gcagctccgg aatctggaag atcggccgcg acgagttctg 2700
 ccgactgctt ggcgttccac cgtcggcaat aaccagaca cgatatctga atcagaaggt 2760
 tcttcagcca attcaggagg agtgtgggccc tctccttggc ctgaagatcg agcgccagta 2820
 cgtgaaacgc aggctgtcgg gcttcgtgtt cacattcggc cgcgagacct ctccggtgat 2880
 cgacgccagg cccgtggagg cgaggaagac ggacggcgac ggcaagggcc attggacgag 2940
 cgttgccggg tacggcgagg tgttcacgac cacggcgttg ttcgacgtga cggccgcccg 3000
 ggctcacttc gacggcaccg ttgaagccgg ggagtgcctt ttctgcgcgt ttgacgcgcg 3060
 caaccgcgaa catcatgcgc ggaacgccgg aaggctgttc tagcggcctt gtccgcgcct 3120
 ctggggcggt tgcgcctgcc atgggtcgat ctgcgcctgt tcggcctcac gctggtctgt 3180
 gcgctgcctg atctccctga gcaggtcggc cttggctctg ggggcgcttc gctcctcgaa 3240
 cgggcccgtc tccccaggt cctcgggctc gctcaggtcc aacggctcgt caccggacgg 3300
 ctcgggccgg ttctctccct gtgccgggtt ctccgcctgt gcgcgttgtt cggccatgcg 3360
 cagtgcgagg gccttcacct gttcggggct tgtcgactcg attttcgttc gtgaatacat 3420
 gttataataa ctataactaa taacgtaacg tgactggcaa gagatatttt taaaacaatg 3480
 aataggttta cacttacttt agttttatgg aatgaaaga tcatatcata tataatctag 3540
 aataaaatta actaaaataa ttattatcta gataaaaaat ttagaagcca atgaaatcta 3600
 taaataaact aaattaagtt tatttaatta acaactatgg atataaaata ggtactaatc 3660
 aaaatagtga ggaggatata tttgaataca tacgaacaaa ttaataaagt gaaaaaata 3720
 cttcggaaac atttaaaaaa taaccttatt ggtacttaca tgtttggatc aggagttgag 3780
 agtggactaa aaccaaatag tgatcttgac tttttagtcg tcgtatctga accattgaca 3840
 gatcaaagta aagaaatact tatacaaaaa attagacctt tttcaaaaaa aataggagat 3900
 aaaagcaact tacgatatat tgaattaaca attattattc agcaagaaat ggtaccgtgg 3960
 aatcatcctc ccaacaaga atttatttat ggagaatggg tacaagagct ttatgaacaa 4020
 ggatacattc ctcagaagga attaaattca gatttaacca taatgcttta ccaagcaaaa 4080
 cgaaaaaata aaagaatata cggaaattat gacttagagg aattactacc tgatattcca 4140
 ttttctgatg tgagaagagc cattatggat tcgtcagagg aattaataga taattatcag 4200
 gatgatgaaa ccaactctat attaacttta tgccgtatga ttttaactat ggacacgggt 4260
 aaaatcatac caaaagatat tgccgggaaat gcagtggtctg aatcttctcc attagaacat 4320

ES 2 628 378 T3

agggagagaa ttttgtagc agttcgtagt tatcttgag agaattattga atggactaat 4380
 gaaaatgtaa atttaactat aaactattta aataacagat taaaaaaatt ataaaaaaat 4440
 tgaaaaaatg gtggaaacac ttttttcaat ttttttagat cttgagcaaa aggccagcaa 4500
 aaggccagga accgtaaaaa ggccgcggtg ctggcgtttt tccataggct ccgccccct 4560
 gacgagcatc acaaaaatcg acgctcaagt cagaggtggc gaaacccgac aggactataa 4620
 agataccagg cgtttcccc tggaagctcc ctctgtcgcct ctctgttcc gaccctgccc 4680
 cttaccggat acctgtccgc ctttctccct tcgggaagcg tggcgctttc tcatagctca 4740
 cgctgtaggt atctcagttc ggtgtaggtc gttcgcctca agctgggctg tgtgcacgaa 4800
 cccccgttc agcccgaccg ctgcgcctta tccggttaact atcgtcttga gtccaaccg 4860
 gtaagacacg acttatcgcc actggcagca gccactggta acaggattag cagagcgagg 4920
 tatgtaggcg gtgctacaga gttcttgaag tgggtggccta actacggcta cactagaaga 4980
 acagtatttg gtatctgccc tctgctgaag ccagttacct tcggaaaaag agttggtagc 5040
 tcttgatccg gcaaacaaac caccgctggt agcggtggtt tttttgtttg caagcagcag 5100
 attacgcgca gaaaaaagg atctcaagaa gatcctttga tcttttctac 5150

<210> 4
 <211> 4476
 <212> ADN
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> pBifiCD

10

<400> 4

agatccgtct tctgctggc ctatgcattg ggttccgcag tgcccactcc aggcggtctg 60
 ggcggtgtgg aagcggcgct gacattcgcg ttcgtggcgg tcggagtgcc gcagggcgty 120
 gcgctttccg ccactttgct gcaccgctg gtgttctact ggctgcgcat tccgctgggc 180
 gcggcggcca tgaagtggct tgacaagcat aatcttgtct gattcgtcta tttcatacc 240
 cccttcgggg aatagatgt gaaaaccctt ataaaacgcg ggttttcgca gaaacatgcy 300
 ctagtatcat tgatgacaac atggactaag caaaagtgct tgtcccctga cccaagaagg 360
 atgctttatg gcatacaaca agtctgacct cgtttcgaat aacgctttac aaacaattat 420
 taacgcccgg ttaccaggcg aagaggggct gtggcagatt catctgcagg acggaaaaat 480
 cagcgccatt gatgcgcaat ccggcgtgat gcccataact gaaaacagcc tggatgccga 540
 acaaggttta gttataccgc cgtttgtgga gccacatatt cacctggaca ccacgcaaac 600
 cgccggacaa ccgaactgga atcagtcggy cacgctggtt gaaggcattg aacgctgggc 660

ES 2 628 378 T3

cgagcgcaaa gcgttattaa cccatgacga tgtgaaacaa cgcgcatggc aaacgctgaa 720
 atggcagatt gccaacggca ttcagcatgt gcgtacccat gtcgatgttt cggatgcaac 780
 gctaactgcy ctgaaagcaa tgctggaagt gaagcaggaa gtcgcyccgt ggattgatct 840
 gcaaatcgtc gccttcctc aggaagggat tttgtcgat cccaacggtg aagcgttgct 900
 ggaagaggcg ttacgcttag gggcagatgt agtggggcg attccgcatt ttgaatttac 960
 ccgtgaatac ggcytgagc cgctgcataa aaccttcgcc ctggcgcaaa aatacgaccg 1020
 tctcatcgac gttcactgtg atgagatcga tgacgagcag tcgcycttg tcgaaaccgt 1080
 tgctgccctg gcgcaccatg aaggcatggg cgcgcgagtc accgccagcc acaccacggc 1140
 aatgcactcc tataacgggg cgtatacctc acgcctgttc cgcttgctga aatgtccgg 1200
 tattaacttt gtcgccaacc cgctggtaaa tattcatctg caaggacgtt tcgatacgta 1260
 tccaaaacgt cgcggcatca cgcgcgttaa agagatgctg gagtccggca ttaacgtctg 1320
 ctttggtcac gatgctgtct tcgatccgtg gtatccgctg ggaacggcga atatgctgca 1380
 agtgctgcat atggggctgc atgtttgcca gttgatgggc tacgggcaga ttaacgatgg 1440
 cctgaattta atcaccacc acagcgcaag gacgttgaat ttgcaggatt acggcattgc 1500
 cgccgaaac agcgccaacc tgattatcct gccggctgaa aatgggtttg atgcctgcy 1560
 ccgtcaggtt ccggtacgtt attcggtaag tggcggcaag gtgattgcca gcacacaacc 1620
 ggcacaaacc accgtatata tggagcagcc agaagccatc gattacaaac gttgacctc 1680
 tgctcgtagc gattacttcg agcattactg acgacaaaga ccccgaccga gatggcggg 1740
 gtctttttgt tgtggtgctg tgacgtgttg tccaaccgta ttattccgga ctagtctcc 1800
 aggacctcgt ctacgaggcg ctgagcaggg aatggcgcaa aagggacggc gagatcagcy 1860
 acccatgggc caacgacgag gcggacggat accagccgcc ctcatagag ccggtcaacc 1920
 ccgaacgcag gactccccag acgccctccg atggcctgat ctgacgtccg aaaaaggcg 1980
 ctgtgcyccc ttttaaatc ttttataaat ctttttacat tcttttagcc cctccgcagc 2040
 ctactctcc caacgggttt cagccgaaac ctacaccaa aggggagcga acctacacca 2100
 aaaggggagc gaacctacac caaaagggga gcgaacctac accaaaagg gagctatata 2160
 cacctttgt tatttaaggt gcaagttgtg ctatgctgag gccatgtcca atgagatcgt 2220
 gaagttcagc aaccagttca acaacgtcgc gctgaagaag ttcgacgccg tgcacctgga 2280
 cgtgetcatg gcgatgcct caagggtgag ggagaagggc acggccacgg tggagttctc 2340
 gttcgaggag ctgcyggcc tcatgcyatt gaggaagaac ctgaccaaca agcagctggc 2400
 cgacaagatc gtgcagacga acgcgcgct gctggcgctg aactacatgt tcgaggattc 2460
 gggcaagatc atccagttcg cgctgttcac gaagttcgtc accgaccgc aggaggcgc 2520

ES 2 628 378 T3

tctcgcggtt	ggggtcaacg	aggagttcgc	gttcctgctc	aacgacctga	ccagccagtt	2580
cacgcgcttc	gagctggccg	agttcgccga	cctcaagagc	aagtacgcca	aggagttcta	2640
ccgcagggcc	aagcagtacc	gcagctccgg	aatctggaag	atcggccgcg	acgagttctg	2700
ccgactgctt	ggcgttccac	cgtcggcaat	aaccagaca	cgatatctga	atcagaaggt	2760
tcttcagcca	attcaggagg	agtgtgggcc	tctccttggc	ctgaagatcg	agcgcagta	2820
cgtgaaacgc	aggctgtcgg	gcttcgtggt	cacattcgcc	cgcgagacc	ctccggtgat	2880
cgacgccagg	cccgtggagg	cgaggaagac	ggacggcgac	ggcaagggcc	attggacgag	2940
cgttgccggg	tacggcgagg	tgttcacgac	cacggcgttg	ttcgacgtga	cggccgcccg	3000
ggctcacttc	gacggcaccg	ttgaagccgg	ggagtgccgt	ttctgcgctg	ttgacgcgcg	3060
caaccgcgaa	catcatgcgc	ggaacgccgg	aaggctgttc	tagcggccgt	gtccgcgcct	3120
ctggggcggt	tgcgccctgc	atgggtcgat	ctgccgctgt	tcggcctcac	gctggtctgt	3180
gcgctgcctg	atctccctga	gcaggtcggc	cttggctctg	ggggcgcttc	gctcctcgaa	3240
cgggcccgtc	tccccaggt	cctcgggctc	gctcaggtcc	aacggctcgt	caccggacgg	3300
ctcgggccgg	ttctctccct	gtgccggggt	ctccgcctgt	gcgcgttggt	cggccatgcg	3360
cagtgcgagg	gccttcacct	gttcggggct	tgtcgactcg	atcttcgttc	gtgaatacat	3420
gttataataa	ctataactaa	taacgtaacg	tgactggcaa	gagatatttt	taaaacaatg	3480
aataggttta	cacttacttt	agttttatgg	aatgaaaga	tcatatcata	tataatctag	3540
aataaaaatta	actaaaataa	ttattatcta	gataaaaaat	ttagaagcca	atgaaatcta	3600
taaataaact	aaattaagtt	tatttaatta	acaactatgg	atataaaata	ggtactaatc	3660
aaaatagtga	ggaggatata	tttgaataca	tacgaacaaa	ttaataaagt	gaaaaaaata	3720
cttcggaaac	atthaaaaaa	taaccttatt	ggtacttaca	tgtttgatc	aggagttgag	3780
agtggactaa	aaccaaatag	tgatcttgac	tttttagtgc	tcgtatctga	accattgaca	3840
gatcaaagta	aagaaatact	tatacaaaaa	attagaccta	tttcaaaaaa	aataggagat	3900
aaaagcaact	tacgatatat	tgaattaaca	attattatc	agcaagaat	ggtaccgtgg	3960
aatcatcctc	ccaacaaga	atthatttat	ggagaatggt	tacaagagct	ttatgaacaa	4020
ggatacattc	ctcagaagga	attaaattca	gatttaacca	taatgcttta	ccaagcaaaa	4080
cgaaaaaata	aaagaatata	cggaaattat	gacttagagg	aattactacc	tgatattcca	4140
ttttctgatg	tgagaagagc	cattatggat	tcgtcagagg	aattaataga	taattatcag	4200
gatgatgaaa	ccaactctat	attaacttta	tgccgtatga	ttttaactat	ggacacgggt	4260
aaaatcatac	caaaagatat	tgccggaaat	gcagtggctg	aatcttctcc	attagaacat	4320

ES 2 628 378 T3

agggagagaa ttttgtagc agttcgtagt tatcttggag agaattattga atggactaat 4380
gaaaatgtaa atttaactat aaactattta aataacagat taaaaaatt ataaaaaat 4440
tgaaaaaatg gtggaacac ttttttcaat tttttt 4476

5

10

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** El vector plasmídico que comprende una secuencia de ADN representada por la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:4 (pBifiCD).
- 2.** Un transportador de genes que comprende una *Bifidobacterium* transformada con el vector plasmídico según la reivindicación 1.
- 10 **3.** El transportador de genes según la reivindicación 2, en donde la *Bifidobacterium* se selecciona de entre el grupo constituido por *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium thermophilum*, *Bi-fidobacterium pseudolongum*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, y *Bifidobacterium longum*.
- 15 **4.** El transportador de genes según la reivindicación 3, en donde la *Bifidobacterium* es la *Bifidobacterium longum*.
- 5.** El transportador de genes según la reivindicación 2, en donde es capaz de multiplicarse en un tejido tumoral que está en un entorno anaeróbico y es capaz de expresar la citosina desaminasa.
- 20 **6.** El transportador de genes según la reivindicación 5, en donde el transportador de genes es la *Bifidobacterium longum* 105-A/pBifiCD (el Instituto Nacional de Tecnología y de Evaluación y el Depósito de Microorganismos Patentados le aceptan con el nº NITE BP-491).
- 25 **7.** Una composición farmacéutica o un agente terapéutico para su utilización en un tratamiento de tumor sólido que comprende el transportador de genes según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6.

[Fig. 1]

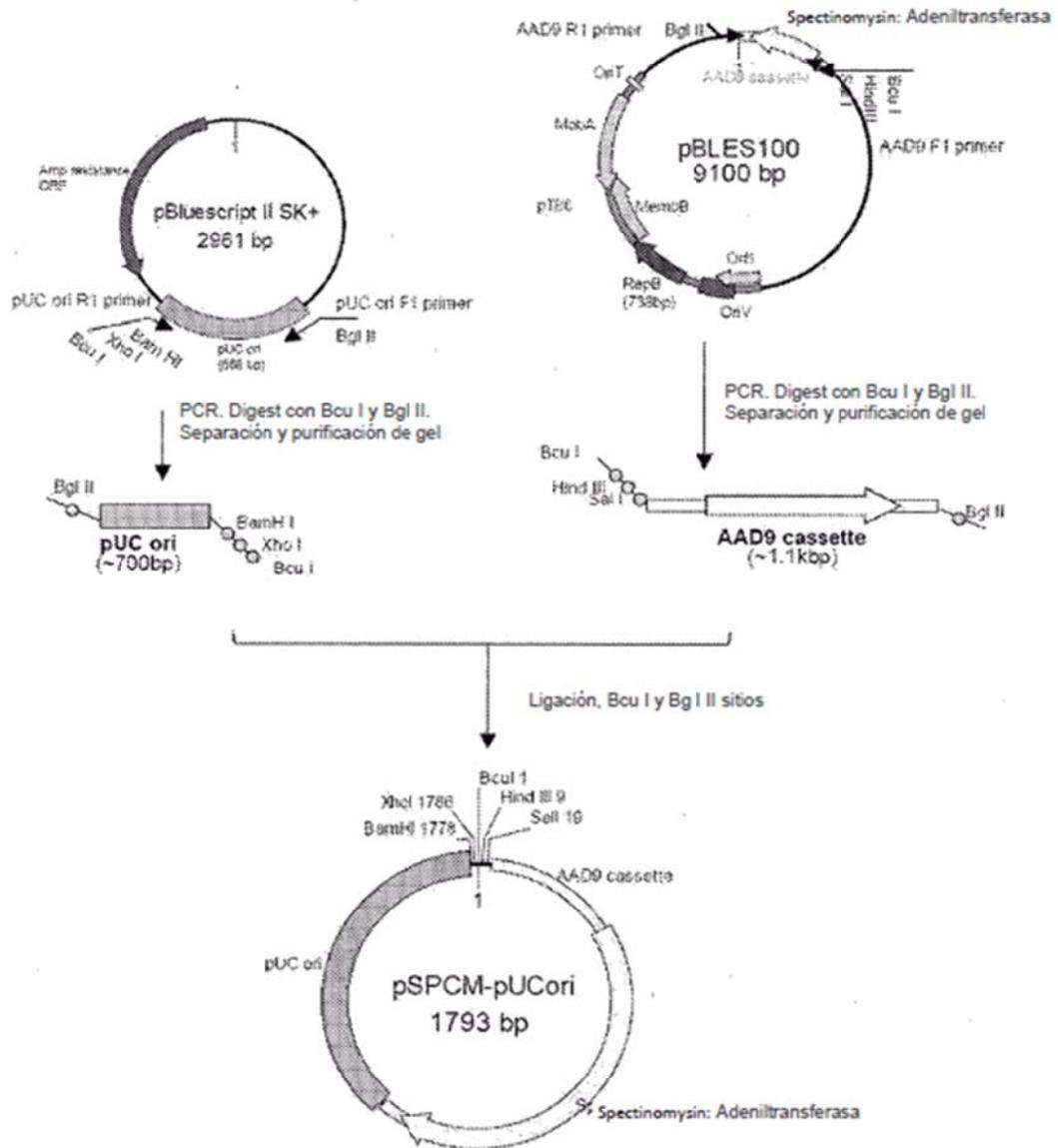


Fig. 1- Proceso de construcción del plásmido marcador selectivo (pSPCL-pUKare). Paso 1

[Fig. 2]

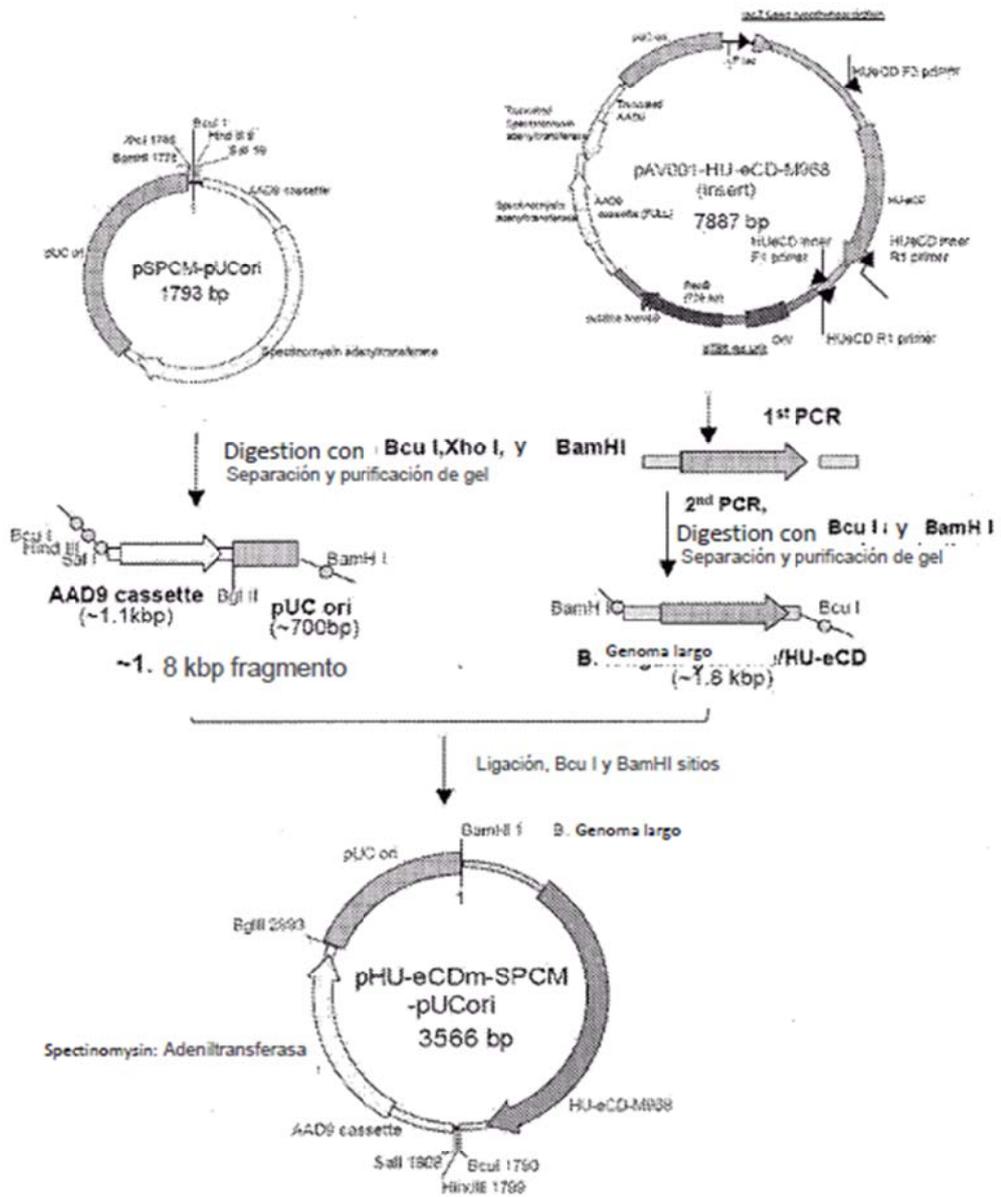


Fig. 2 Proceso de construcción del marcador selectivo / plásmido de proteína activa. (pHU-eCDm-SPCM-pUCori) Paso 2.

[Fig. 3]

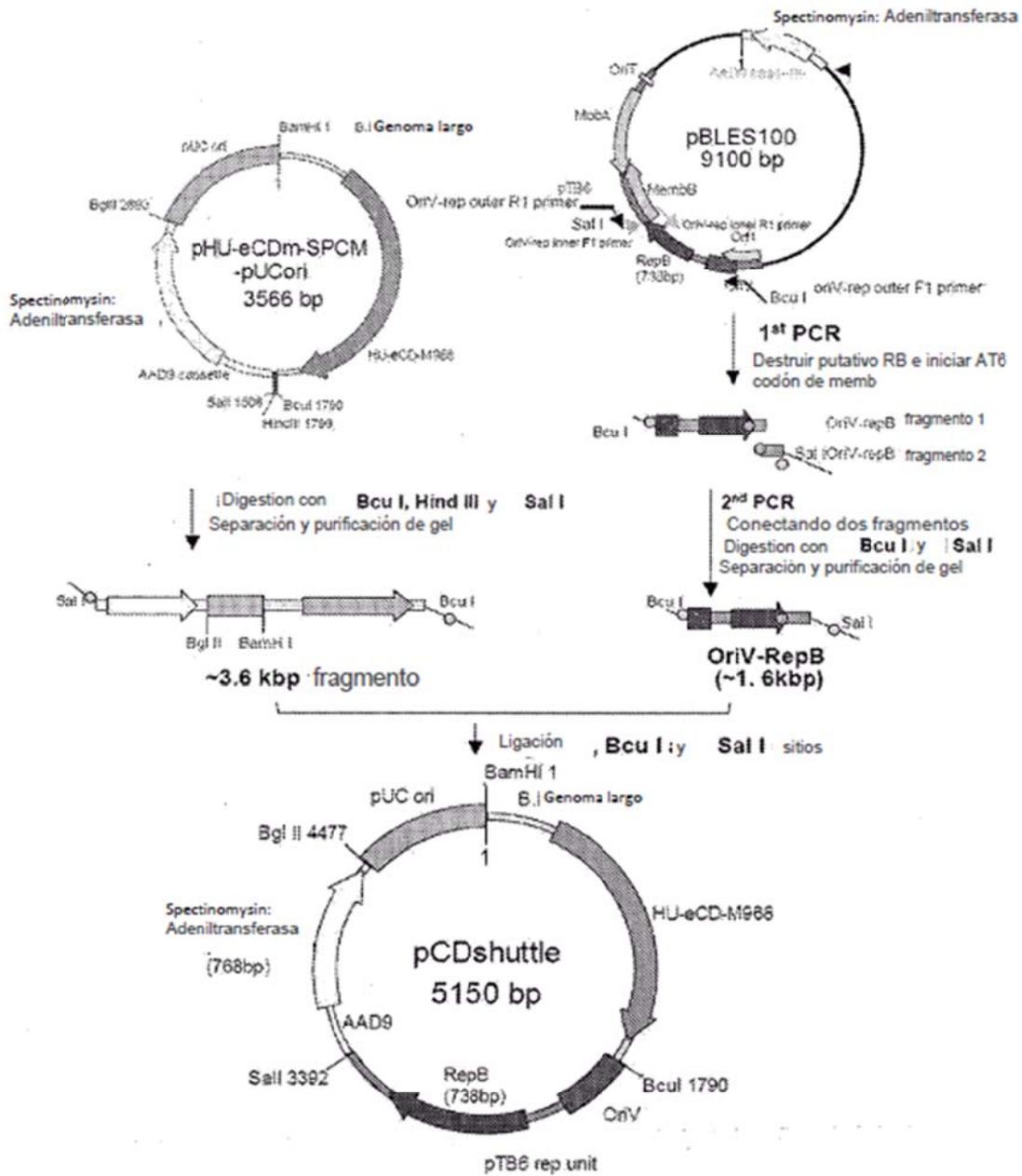


Fig. 3 Proceso de construcción del plásmido lanzadera (pCDshuttle) Paso 3

[Fig. 4]

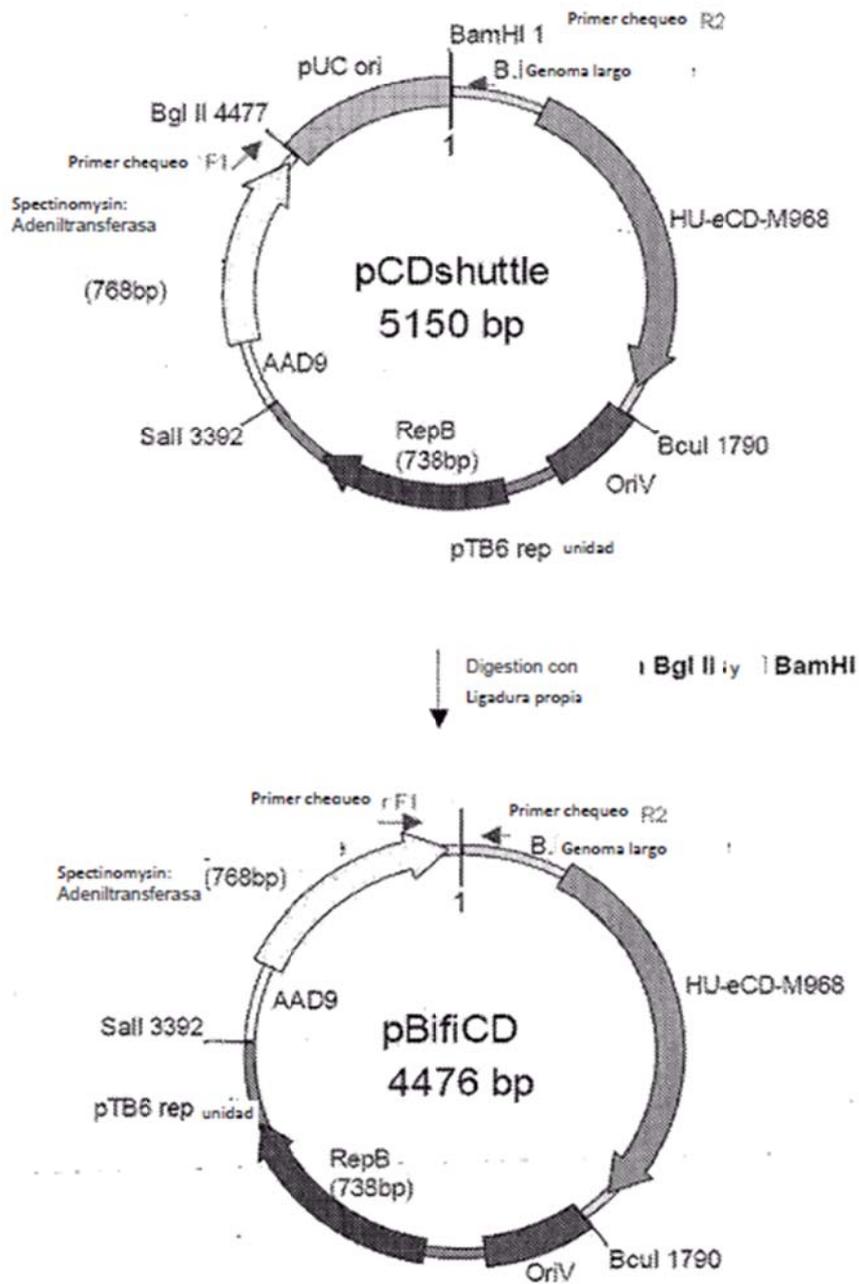
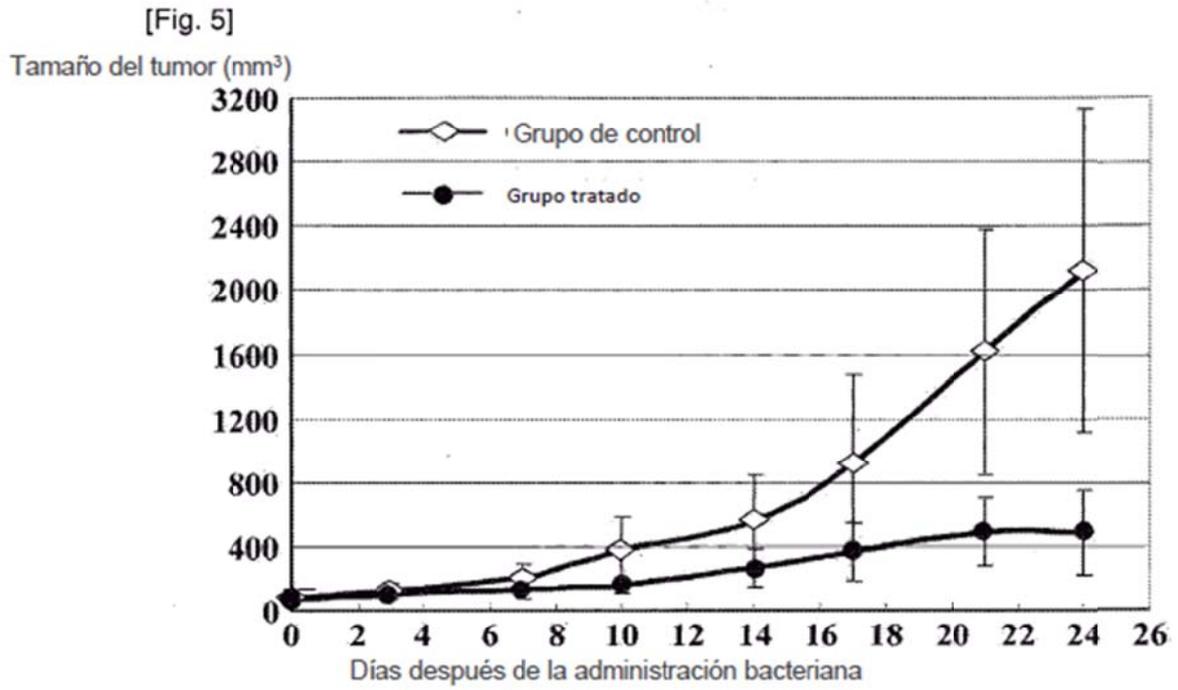


Fig. 4 Proceso de construcción de pBifiCD. Paso 4



[Fig. 5 Efecto antitumoral de *B longum*. Re-105A/pBifiCD Cepa de clonación