

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 686 080**

51 Int. Cl.:

A61K 35/74 (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.04.2009 PCT/JP2009/001776**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.10.2009 WO09128275**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.04.2009 E 09733604 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.05.2018 EP 2280717**

54 Título: **Agente terapéutico para enfermedades anaerobias**

30 Prioridad:

17.04.2008 US 124528 P

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

16.10.2018

73 Titular/es:

**ANAEROPHARMA SCIENCE, INC. (100.0%)
Tokyo Park Tower 201 1-103 Kanda Jinbocho
Chiyoda-ku
Tokyo 101-0051, JP**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

LAHIDALGA DE CAREAGA, José Luis

ES 2 686 080 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

Agente terapéutico para enfermedades anaerobias

5 La presente invención se refiere a un agente terapéutico para enfermedades anaerobias que comprende un nuevo microorganismo anaerobio transformado, conteniendo el agente terapéutico, en combinación con una composición farmacéutica para el tratamiento de una enfermedad anaerobia, que contiene el microorganismo anaerobio transformado como un componente activo y una composición farmacéutica que contiene como componente activo una colonización de microorganismos anaerobios y potenciador del crecimiento para mejorar la colonización y proliferación del microorganismo anaerobio en la localización de la enfermedad anaerobia. Además, la presente invención se refiere a una colonización de microorganismos anaerobios y potenciadores del crecimiento para mejorar la colonización y el crecimiento del microorganismo anaerobio transformado en la localización de la enfermedad que se encuentra en un entorno anaerobio.

15 En los últimos años, como un método para tratar una enfermedad que se encuentra en un entorno anaerobio (en lo sucesivo, denominada "enfermedad anaerobia"), como un tumor maligno o una enfermedad isquémica, por ejemplo, como un método para tratar un tumor sólido, un método que utiliza un microorganismo anaerobio transformado como un transportador de genes ha estado atrayendo la atención. Por ejemplo, se ha propuesto un método para transportar un gen a la localización tumoral utilizando Clostridium transformado (véase, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N° 6416754 y 6652849, y la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos 2003/0103952). Además, se ha propuesto la aplicación de Bifidobacterium (B) longum transformada al tratamiento de tumores sólidos (véase, por ejemplo, JP A 2002-97144, Yazawa et al., Terapia de los Genes Cancerígenos, 7, 269-274 (2000), Yazawa et al., Tratamiento de Recursos para Cáncer de Tórax, 66, 165 - 170 (2001)).

25 Estos microorganismos transformados se generan utilizando vectores de expresión tales como los plásmidos lanzadera pNTR500F, pCD540FT, etc., que son objeto de replicación tanto en E. coli como en Clostridium (Patentes de Estados Unidos N° 6416754 y 6652849, y Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos 2003/0103952) o el plásmido lanzadera pBLES100-S-eCD, que se replica tanto en E. coli como en Bifidobacterium (JP A 2002-97144). Puesto que todos estos vectores plasmídicos son vectores lanzadera que son objeto de replicación tanto en E. coli como en Clostridium o Bifidobacterium transformados, las bacterias que se han transformado con estos vectores plasmídicos tienen el riesgo de que el gen introducido se pueda transferir horizontalmente a otros microorganismos distintos de la bacteria transformada, al menos E. coli, que es facultativamente anaerobia, y riesgos ambientales y problemas en el tratamiento real.

35 Además, el documento JP A 2002-97144 describe que B. longum puede hacerse proliferar selectivamente en el tejido tumoral administrando por vía intraperitoneal lactulosa al ratón al que se ha administrado B. longum. Sin embargo, el transformante allí descrito se transforma utilizando un vector plasmídico que puede transferirse horizontalmente a E. coli anaerobia, etc., y todavía quedan problemas para su uso seguro y eficaz en el tratamiento de una enfermedad anaerobia.

40 Además, el documento EP 1 867 714 A da a conocer una composición farmacéutica que comprende microorganismos como, por ejemplo, Bifidobacterium longum, Bifidobacterium breve, Bifidobacterium infantis, que expresan citosina desaminasa y se combina con lactulosa, porque el uso de azúcar favorece la proliferación de los microorganismos. El vector utilizado es el plásmido pAV001-HU-eCD y pBLES100-S-eCD como un vector lanzadera para Bifidobacterium longum y para E. coli.

45 En un método para tratar una enfermedad anaerobia utilizando un microorganismo anaerobio transformado, es necesario que el microorganismo anaerobio transformado, a utilizarse, sea no patogénico y no tóxico, colonice y desarrolle solo en el tejido enfermo que está en un estado anaerobio, pero no colonice ni se desarrolle en un tejido normal que no está en un estado anaerobio, así como que el gen introducido en el microorganismo anaerobio transformado no se transfiera horizontalmente a bacterias patógenas o bacterias aeróbicas o anaerobias facultativas distintas del microorganismo anaerobio transformado.

55 Además, para que un método para tratar una enfermedad anaerobia utilizando un microorganismo anaerobio transformado, muestre completamente su efecto terapéutico, el microorganismo anaerobio transformado que se utilizará no solo es necesario colonizar concretamente en la localización de la enfermedad anaerobia, sino también la proliferación a una cantidad efectiva desde el punto de vista terapéutico, y para estar continuamente presente durante el período de tratamiento hasta su finalización. Por otro lado, puesto que las células viables se administran por vía intravenosa o en tejido enfermo, la dosis del microorganismo anaerobio transformado es preferiblemente lo más pequeña posible con el fin de minimizar la influencia dentro de los vasos sanguíneos y la carga sobre un paciente, y por lo tanto, es deseable que el microorganismo anaerobio transformado proliferare concretamente en la localización de la enfermedad anaerobia y en la cantidad terapéuticamente efectiva con la dosis mínima necesaria.

65 El objeto de la presente invención es, por lo tanto, proporcionar un agente terapéutico para enfermedades anaerobias que, en un método para tratar una enfermedad anaerobia utilizando un microorganismo anaerobio transformado, sea seguro y práctico, y pueda mostrar un efecto con una pequeña dosis.

Los presentes inventores han llevado a cabo una investigación intensiva con el fin de resolver los problemas anteriores, y han mejorado el plásmido lanzadera pBLES100-S-eCD para construir el plásmido pAV001-HU-eCD-M968 (véase, WO 2007-136107). Los inventores han mejorado adicionalmente este plásmido al eliminar del mismo el pUC ori, que es un fragmento que contiene un origen de replicación para *E. coli*, para construir el plásmido pBifiCD (véase la solicitud provisional de los Estados Unidos N° 61/124.528). Puesto que este plásmido no contiene el origen de replicación de *E. coli*, una bacteria transformada con este plásmido no tiene el riesgo de ser replicada en *E. coli*, incluso si se produce la transferencia horizontal a *E. coli*. Por lo tanto, es un microorganismo anaerobio transformado extremadamente seguro, y puede usarse como un agente terapéutico práctico para una enfermedad anaerobia. Una bacteria transformada por este plásmido, por ejemplo, *B. longum* 105-A/pBifiCD (Instituto Nacional de Tecnología y Depósito de Microorganismos de Patente de Evaluación (en lo sucesivo denominado NPMD) Número de Acceso NITE BP-491) presenta una buena actividad de expresión de citosina deaminasa (CD), y al usarlo en combinación con el profármaco 5-FC, que se convierte mediante dicha CD en la sustancia antitumoral 5-FU, se presenta un efecto de supresión del crecimiento tumoral muy marcado, y es prometedor como un excelente agente de tratamiento tumoral. Sin embargo, los presentes inventores han encontrado otro problema, ya que tales bacterias transformadas no tienen suficiente capacidad de colonización y crecimiento en el tejido del organismo, y con el fin de transportar una cantidad de gen objetivo suficiente para el tratamiento de una enfermedad anaerobia al tejido objetivo tal como un tumor sólido, es necesario administrar una cantidad relativamente grande de bacterias transformadas. Por lo tanto, desde el punto de vista de la seguridad y del coste, también es necesario un método para hacer que las bacterias realicen una colonización y proliferación eficientes.

Como resultado de una investigación intensiva por los presentes inventores con el fin de mejorar la utilidad como un agente terapéutico de la enfermedad anaerobia de una composición farmacéutica que contiene, por ejemplo, el *B. longum* 105-A/pBifiCD (Número de Acceso NPMD: NITE BP- 491) como un componente activo, se ha encontrado que el uso de dicho microorganismo anaerobio transformado en combinación con una composición farmacéutica que contiene un cierto tipo de sacárido como componente activo, favorece notablemente la colonización y proliferación específicas del microorganismo en una localización de enfermedad anaerobia, y además, la proliferación del microorganismo en la localización de la enfermedad anaerobia se puede mantener y el efecto terapéutico se puede mejorar en gran medida. Los presentes inventores también han descubierto que, al usar dicho sacárido en combinación, incluso una dosis reducida del microorganismo anaerobio transformado para el tratamiento de una enfermedad anaerobia puede producir los mismos efectos terapéuticos que una dosis alta, mejorando así la seguridad como un agente terapéutico de enfermedad anaerobia. Además, puesto que estos sacáridos favorecen la colonización en la localización de la enfermedad anaerobia y el crecimiento del microorganismo anaerobio transformado para el tratamiento de una enfermedad anaerobia de la presente invención, pueden convertirse en una excelente colonización de microorganismos anaerobios y potenciadores del crecimiento. Como resultado de una investigación adicional de los presentes inventores basada en los hallazgos anteriores, se ha logrado la presente invención.

Es decir, la presente invención se refiere a:

(1) un agente terapéutico de enfermedad anaerobia que contiene en combinación una composición farmacéutica que comprende como componente activo un microorganismo anaerobio transformado que se transforma mediante un vector de expresión que actúa en el microorganismo anaerobio, el vector de expresión que no contiene una unidad de replicación de plásmido que actúa en *E. coli*, y

una composición farmacéutica que comprende como un componente activo un potenciador de colonización y proliferación para el microorganismo anaerobio transformado en una localización de enfermedad anaerobia,

(2) el agente terapéutico de conformidad con (1), en el que el vector de expresión comprende:

1) una unidad de replicación de plásmido que actúa en un microorganismo anaerobio distinto de *E. coli*, y

2) una unidad de expresión de proteína 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 actúan en el microorganismo anaerobio,

(3) el agente terapéutico de conformidad con (2), en el que la proteína que tiene actividad objetivo es una proteína que tiene actividad terapéutica para una enfermedad que está en un entorno anaerobio,

(4) el agente terapéutico según (3), en el que la proteína que tiene actividad terapéutica para una enfermedad que está en un entorno anaerobio es (a) una proteína que tiene una actividad antitumoral o (b) una proteína que tiene una actividad de conversión de un precursor de sustancia antitumoral en una sustancia antitumoral,

(5) el agente terapéutico de conformidad con (4), en el que la proteína que tiene actividad terapéutica para una enfermedad que está en un entorno anaerobio es (b) una proteína que tiene actividad para convertir un precursor de sustancia antitumoral en una sustancia antitumoral,

- (6) el agente terapéutico según (1), en el que el microorganismo anaerobio se selecciona del grupo constituido por Bifidobacterium, Lactobacillus, Enterococcus, Streptococcus y Clostridium,
- 5 (7) el agente terapéutico según (6), en el que el microorganismo anaerobio es Bifidobacterium,
- (8) el agente terapéutico según (7), en el que la Bifidobacterium se selecciona de entre el grupo constituido por B. adolescentis, B. animalis, B. infantis, B. thermophilum, B. pseudolongum, B. bifidum, B. breve, y B. longum,
- 10 (9) el agente terapéutico de conformidad con (8), en el que Bifidobacterium es B. longum,
- (10) el agente terapéutico de conformidad con (9), en el que Bifidobacterium es B. longum 105-A/pBifiCD (número de acceso NPMD NITE BP-491),
- 15 (11) el agente terapéutico según (5), en el que la proteína que tiene una actividad de conversión de un precursor de sustancia antitumoral en una sustancia antitumoral se selecciona del grupo constituido por citosina desaminasa, nitrorreductasa y b-glucuronidasa,
- (12) el agente terapéutico de conformidad con (11), en el que la proteína que tiene una actividad de convertir un precursor de sustancia antitumoral en una sustancia antitumoral es la citosina desaminasa,
- 20 (13) el agente terapéutico de conformidad con (1), en el que el potenciador de colonización y proliferación para el microorganismo anaerobio es al menos uno seleccionado del grupo constituido por arabinosa, xilosa, galactosa, glucosa, maltosa, lactosa, melibiosa, melecitosa, rafinosa, y lactulosa,
- 25 (14) el agente terapéutico de conformidad con (13), en el que el potenciador de colonización y proliferación para el microorganismo anaerobio es glucosa o maltosa,
- (15) el agente terapéutico de conformidad con (14), en el que el potenciador de colonización y proliferación para el microorganismo anaerobio es maltosa,
- 30 (16) un potenciador de colonización y proliferación para un microorganismo anaerobio para el tratamiento de una enfermedad anaerobia, que comprende como componente activo al menos uno seleccionado del grupo constituido por arabinosa, xilosa, galactosa, glucosa, maltosa, lactosa, melibiosa, melecitosa, rafinosa y lactulosa,
- 35 (17) el potenciador de colonización y proliferación para el microorganismo anaerobio para el tratamiento de una enfermedad anaerobia de conformidad con (16), en el que el componente activo es glucosa o maltosa,
- (18) el potenciador de colonización y proliferación para el microorganismo anaerobio para el tratamiento de una enfermedad anaerobia de conformidad con (17), en el que el componente activo es maltosa,
- 40 (19) el agente terapéutico de conformidad con (1), en el que la composición farmacéutica que comprende como componente activo un potenciador de colonización y proliferación para el microorganismo anaerobio es una preparación para administración intravenosa,
- 45 (20) el agente terapéutico según (19), en el que el componente activo es glucosa o maltosa,
- (21) el agente terapéutico según (5), que comprende además una composición farmacéutica que comprende como componente activo un precursor de sustancia antitumoral que se convierte en una sustancia antitumoral por (b) una proteína que tiene una actividad de convertir un precursor de sustancia antitumoral en una sustancia antitumoral, y
- 50 (22) el agente terapéutico de conformidad con (21), en el que el precursor de sustancia antitumoral es 5-fluorocitosina.
- 55 El agente terapéutico para una enfermedad anaerobia de la presente invención no presenta riesgo de que un gen recombinante se replique en E. coli, y es extremadamente seguro desde el punto de vista ambiental y en el tratamiento real. Además, el potenciador de colonización y proliferación para un microorganismo anaerobio transformado de la presente invención mejora el efecto terapéutico favoreciendo la colonización y la proliferación específicas de un microorganismo anaerobio transformado para el tratamiento de una enfermedad anaerobia en una localización de la enfermedad, y permite que se reduzca la dosis del microorganismo. Un agente terapéutico de enfermedad anaerobia en el que una composición farmacéutica que contiene el microorganismo anaerobio transformado para el tratamiento de una enfermedad anaerobia de la presente invención como un componente activo y una composición farmacéutica que contiene el promotor de colonización y proliferación del microorganismo anaerobio de la presente invención como un componente activo se combinan, de forma prometedoras, como un agente terapéutico seguro y excelente que puede mejorar notablemente el efecto terapéutico del microorganismo anaerobio transformado y permitir que se reduzca la dosis del microorganismo anaerobio transformado.
- 60
- 65

La Figura 1 es un diagrama que muestra un mapa de representación del plásmido 'pBifiCD'.

5 La Figura 2 es un diagrama que muestra el efecto de supresión de la proliferación tumoral del uso combinado de B. longum Re-105A/pBifiCD y maltosa.

La presente invención da a conocer un agente terapéutico para una enfermedad anaerobia que, en una realización, comprende en combinación

10 una composición farmacéutica que comprende como componente activo un microorganismo anaerobio transformado con un vector de expresión que actúa en el microorganismo anaerobio y no comprende una unidad de replicación de plásmido que actúa en E. coli, y

15 una composición farmacéutica que comprende como un componente activo un potenciador de colonización y proliferación para el microorganismo anaerobio transformado en una localización de la enfermedad anaerobia.

20 La expresión de "agente terapéutico que comprende en combinación composiciones farmacéuticas" referida en la presente memoria descriptiva significa un agente terapéutico que es una nueva composición farmacéutica producida mezclando al menos dos tipos de composiciones farmacéuticas o un agente terapéutico de enfermedad que comprende al menos dos tipos de composiciones farmacéuticas que se usan en combinación en el tratamiento. Cuando se usan al menos dos tipos de composiciones farmacéuticas en combinación, las composiciones farmacéuticas pueden usarse al mismo tiempo o pueden usarse por separado en un intervalo determinado.

25 El microorganismo anaerobio transformado para el tratamiento de una enfermedad anaerobia de la presente invención es un microorganismo anaerobio transformado con un vector de expresión, que es un vector plasmídico que actúa en una bacteria anaerobia, en particular, una enterobacteria distinta de E. coli, tal como Bifidobacterium, Lactobacillus, Enterococcus, Streptococcus o Clostridium. El vector de expresión de la presente invención no contiene una unidad de replicación de plásmido que actúe en una bacteria, en particular E. coli, que no sea la bacteria transformada.

30 Los microorganismos anaerobios transformados para el tratamiento de una enfermedad anaerobia que se han comunicado hasta ahora se transforman mediante vectores lanzadera que actúan tanto en E. coli como en una bacteria transformada, y ninguno de ellos se transformó con un vector de expresión que actúa solamente en un microorganismo transformante que no sea E. coli. Por lo tanto, el gen introducido puede transferirse horizontalmente a una bacteria patógena o una bacteria aerobia o anaerobia facultativa distinta de la bacteria anaerobia transformada, y se refieren a los riesgos y riesgos ambientales en el tratamiento real.

35 Por otro lado, el microorganismo anaerobio transformado de la presente invención se ha transformado con un vector de expresión que no contiene una unidad de replicación de plásmido que actúa en una bacteria distinta del microorganismo transformante, en particular E. coli, e incluso si se produce una transferencia horizontal a E. coli, no existe posibilidad de replicación en E. coli, y es muy seguro en términos del entorno y en el tratamiento real.

40 Más concretamente, el vector de expresión utilizado en la transformación del microorganismo anaerobio para el tratamiento de una enfermedad anaerobia de la presente invención se caracteriza porque, por ejemplo, el vector de expresión consiste esencialmente en (1) una unidad de replicación de plásmido que actúa en un microorganismo anaerobio distinto de E. coli, y (2) una unidad de expresión de proteínas que consiste esencialmente en un ADN que codifica una proteína que tiene una actividad objetivo y un fragmento de ADN que contiene un promotor y un terminador que actúan en el microorganismo anaerobio y que el vector de expresión no comprende una unidad de replicación de plásmido que actúa en una bacteria distinta del microorganismo transformante, en particular E. coli.

45 Como la unidad de replicación del plásmido, que actúa en un microorganismo anaerobio distinto de E. coli, poseída por el vector de expresión, cualquier unidad de replicación del plásmido puede usarse siempre que actúe en un microorganismo anaerobio distinto de E. coli, por ejemplo, en una enterobacteria tal como Bifidobacterium, Lactobacillus, Enterococcus, Streptococcus o Clostridium, y no actúa en un microorganismo anaerobio que no sea la bacteria transformada; ejemplos de los mismos incluyen una unidad de replicación de plásmido que actúa en un microorganismo anaerobio diferente de E. coli, por ejemplo, en Bifidobacterium, y sus ejemplos específicos incluyen una unidad de replicación pTB6 formada a partir de una región OriV y un gen RepB que actúan en Bifidobacterium, y su polimorfismo de un solo nucleótido.

50 Además, como el promotor y el terminador de la unidad de expresión de proteína del vector de expresión, cualquier promotor y terminador se puede usar siempre que actúen en un microorganismo anaerobio, por ejemplo, en una enterobacteria tal como Bifidobacterium, Lactobacillus, Enterococcus, Streptococcus o Clostridium; ejemplos de los mismos incluyen un promotor y un terminador de un gen que codifica una proteína de enlace a ADN similar a la histona que actúa en un microorganismo anaerobio, por ejemplo, un promotor y ADN terminador de un gen que codifica para una proteína de enlace de ADN similar a la histona, derivada de Bifidobacterium o su polimorfismo de un solo nucleótido.

El vector de expresión de la presente invención puede comprender además una unidad de gen de actividad marcadora de selección. La actividad del marcador de selección no está en particular limitada siempre que sea capaz de seleccionar un microorganismo anaerobio transformado por el vector plasmídico de la presente invención; ejemplos de los mismos incluyen un marcador de resistencia a fármacos tal como resistencia a espectinomina, resistencia a ampicilina, resistencia a tetraciclina, resistencia a neomicina o resistencia a kanamicina, y es preferible la resistencia a la espectinomina y la auxotrofia.

Los ejemplos de la unidad de gen de actividad de marcador de selección incluyen un ADN que comprende un ADN que codifica una proteína que presenta actividad de resistencia a la espectinomina o una variante de nucleótido simple de la misma y una secuencia de promotor correspondiente, a modo de ejemplo, ADN que codifica espectinomina adeniltransferasa derivada de *enterococcus faecalis* (de aquí en adelante denominado casete AAD9) y su polimorfismo de un solo nucleótido.

La "variante de nucleótido único" a la que se hace referencia en la presente invención significa un polimorfismo de nucleótido único en el que se ha alterado un nucleótido de al menos una localización (en lo sucesivo denominado un SNP) e incluye no solo un SNP en una sola localización sino también SNPs en una pluralidad de localizaciones.

Como un gen insertado en una unidad de expresión de proteína del vector de expresión, se puede usar cualquier gen siempre que exprese una proteína que tenga actividad terapéutica para una enfermedad que está en un entorno anaerobio; por ejemplo, cuando el agente terapéutico de la enfermedad anaerobia de la presente invención se usa como un agente terapéutico de tumor maligno, una proteína que tiene una actividad antitumoral o una proteína que tiene una actividad de convertir un precursor de la sustancia antitumoral en una sustancia antitumoral, y siempre que el gen no sea un ADN que inhiba la transformación, como el ADN de gran magnitud (al menos aproximadamente 10 kb) o el ADN que es tóxico para las células receptoras.

La proteína que tiene actividad antitumoral expresada por el gen incluye, por ejemplo, una citocina, y ejemplos específicos de la citocina incluyen interferones (IFN) -alfa, beta y gamma, factor estimulante de colonias de granulocitos macrófagos (GM-CSF), interleuquinas (IL) -1 alfa, 1 beta, 2, 3, 4, 6, 7, 10, 12, 13, 15 y 18, factor de necrosis tumoral (TNF) - alfa, linfotóxina (LT) - beta, factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), factor de inhibición de migración de macrófagos (MIF), factor inhibidor de leucemia (LIF), factores coestimuladores de activación de células T B7 (CD80) y B7-2 (CD86), ligante de 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 varios organismos, y mediante la utilización de una técnica conocida tal como un método de PCR basado en la información de la secuencia, es posible obtener un ADN que codifica una proteína que tiene actividad antitumoral usada en la presente invención.

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

Como un ADN que codifica dicho CD, por ejemplo, que se aisló del plásmido pAdex 1 CSCD (Riken Gene Bank RDB N° 1591), que contiene un ADN que codifica CD derivado de *E. coli*, o el plásmido pMK116, que contiene de manera similar un ADN que codifica CD derivado de *E. coli* (DA Mead et al., *Protein Engineering* 1: 67-74 (1986)).

Además, cuando el agente terapéutico para una enfermedad anaerobia de la presente invención se usa como un agente terapéutico para una enfermedad isquémica, un gen insertado en una unidad de expresión de proteína del vector de expresión de la presente invención puede incluir una proteína que tiene actividad promotora angiogénica, que es de utilidad para el tratamiento de una enfermedad isquémica. Los ejemplos específicos incluyen el factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF2), factor de crecimiento de células endoteliales (ECGF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y factor de crecimiento de hepatocitos (HGF).

De forma similar, las secuencias de estas proteínas son conocidas para diversos organismos, y utilizando una técnica conocida tal como un método de PCR basado en la información de secuencia, es posible obtener un ADN que codifica una proteína que tiene actividad promotora angiogénica usada en la presente invención.

El vector de expresión utilizado para la transformación del microorganismo anaerobio para el tratamiento de una enfermedad anaerobia de la presente invención incluye cualquier plásmido siempre que el plásmido comprenda, por

ejemplo, una unidad de replicación de plásmido que actúe en un microorganismo anaerobio distinto de *E. coli*, y una unidad de expresión de proteína que comprenda un ADN que codifique una proteína que tiene actividad objetivo y un fragmento de ADN que comprenda un promotor y un terminador que actúen en el microorganismo anaerobio, y cuando transforma un microorganismo anaerobio, el plásmido actúa dentro de este microorganismo anaerobio, pero el plásmido no contiene una unidad de replicación de plásmido que actúe en una bacteria distinta de la bacteria transformada, en particular *E. coli*.

Los ejemplos de los mismos incluyen los construidos mediante la introducción, en los plásmidos lanzadera pBLES100 (Matsumura et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 61, 1211-1212 (1997)), pAV001 (WO 2006-57289), pBRASTA101 (Tanaka et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 69 (2): 422-425 (2005)), pDG7, pEBM3, pECM2, pLP825, etc. (Alessandra Argnani et al., *Microbiology*, 142: 109-114 (1996)), que han sido informados en las publicaciones, una unidad de expresión de proteína que comprende un ADN que codifica una proteína dada que tiene actividad objetivo y un fragmento de ADN que comprende un promotor y un terminador que actúan en el microorganismo anaerobio y la extracción de una unidad de replicación de plásmido que actúa en *E. coli*.

Otros ejemplos de los mismos incluyen el plásmido lanzadera construido recombinando una unidad de expresión de proteína insertada en el plásmido tal como pNTR500F, pCD540FT, etc. (Patentes de Estados Unidos N° 6416754 y 6652849, y Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos 2003/0103952), pBLES100-S-eCD (JP A 2002-97144), pAV001-HU-eCD-M968 (WO 2007-136107), con otra unidad de expresión de proteína dada, y además eliminando de la misma una unidad de replicación de plásmido que actúa en *E. coli*.

Los ejemplos específicos del vector de expresión de la presente invención incluyen un vector que comprende una unidad de replicación pTB6 que comprende un gen RepB y una región OriV que actúan en *Bifidobacterium* como la unidad de replicación del plásmido que actúa en un microorganismo anaerobio diferente de *E. coli*, y que comprende un promotor y un terminador de un gen que codifica la proteína de enlace a ADN similar a histona derivada de *Bifidobacterium* como el fragmento de ADN que comprende el promotor y el terminador que actúan en el microorganismo anaerobio y que comprende un ADN que codifica la enzima CD que convierte 5-FC en 5-FU como el ADN que codifica la proteína que tiene actividad objetivo, y que comprende un ADN (casete AAD9) que codifica la espectinomicina adeniltransferasa derivada de *Enterococcus faecalis* como la unidad de gen de actividad del marcador de selección.

Los ejemplos más específicos de los mismos incluyen pBifiCD, que está representado por la secuencia de nucleótidos de IDENTIFICADOR DE SECUENCIA N°: 1.

El vector de expresión utilizado en la transformación del microorganismo anaerobio para el tratamiento de una enfermedad anaerobia de la presente invención se puede construir de conformidad con la descripción dada en, por ejemplo, la solicitud provisional de los Estados Unidos N° 61/124.528.

Por consiguiente, el vector de expresión de la presente invención puede construirse mediante

(1) construir un plásmido que comprende un origen de replicación de *E. coli*, por ejemplo, pUC ori, y opcionalmente una unidad de gen de actividad marcadora de selección, por ejemplo, un casete AAD9 (denominado en lo sucesivo plásmido marcador de selección) (Etapa 1),

(2) preparar un plásmido lineal del plásmido marcador de selección, ligarlo con un promotor y un terminador tal como, por ejemplo, un promotor y un terminador de un gen que codifica la proteína de enlace a ADN de tipo histona derivada de *Bifidobacterium*, y (a) una proteína que tiene actividad antitumoral o (b) una proteína que tiene una actividad de convertir un precursor de sustancia antitumoral en una sustancia antitumoral tal como, por ejemplo, un fragmento que comprende un CD (en lo sucesivo, unidad de expresión de proteína), para construir un plásmido que tiene una unidad de gen de actividad de marcador de selección y una unidad de expresión de proteína (en lo sucesivo, denominado plásmido de proteína activadora de marcador de selección) (Etapa 2),

(3) preparar un plásmido lineal de este plásmido de proteína activa de marcador de selección, ligarlo con una unidad de replicación de plásmido que actúa en un microorganismo anaerobio distinto de *E. coli* tal como, por ejemplo, un fragmento de ADN de una unidad de replicación pTB6 formada a partir de un gen RepB y una región OriV que actúan en *Bifidobacterium* (en lo sucesivo, unidad de replicación de plásmido) para construir un plásmido que tiene una localización de iniciación de la replicación de *E. coli* y una unidad de gen de actividad marcadora de selección, una unidad de expresión de proteína y una unidad de replicación de plásmido (en lo sucesivo, denominado un plásmido lanzadera) (Etapa 3), y

(4) eliminación de la localización de iniciación de la replicación de *E. coli* del plásmido lanzadera (en lo sucesivo, denominado Etapa 4).

El procedimiento de cada etapa puede realizarse de conformidad con un método conocido descrito en los informes de referencias.

El vector de expresión de la presente invención también puede construirse insertando, mediante un método estándar, una unidad de expresión de proteína que comprende un ADN que codifica una proteína dada que tiene actividad objetivo y un fragmento de ADN que contiene un promotor y un terminador que actúan en el microorganismo anaerobio en los diversos tipos de plásmidos lanzadera mencionados anteriormente, tales como los plásmidos lanzadera pBLES100 (Matsumura et al., Biosci. Biotechnol. Biochem., 61, 1211 - 1212 (1997)), pAV001 (WO 2006 - 57289), pBRASTA101 (Tanaka), et al., Biosci. Biotechnol. Biochem., 69 (2): 422-425 (2005)), pDG7, pEBM3, pECM2, pLP825, etc. (Alessandra Argnani et al., Microbiology, 142: 109-114 (1996)) y pNTR500F, pCD540FT, etc. (Patentes de Estados Unidos N° 6416754 y 6652849, y Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos 2003/0103952), seguido de la eliminación similar de una unidad de replicación de plásmido que actúa en *E. coli* mediante un método estándar.

Además, de la misma manera que para el plásmido pBifCD anterior de la presente invención en el que el pUC ori, que es el fragmento que contiene el origen de replicación de *E. coli*, se elimina del plásmido pAV001-HU-eCD-M968 (WO 2007 - 136107), el vector de expresión de la presente invención también se puede construir eliminando una unidad de replicación de plásmido que actúa en *E. coli* a partir de los plásmidos pNTR500F, pCD540FT (Patentes de Estados Unidos N° 6416754 y 6652849, y Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos 2003/0103952), pBLES100-S-eCD (JP A 2002-97144), etc.

Además, el vector de expresión de la presente invención también puede construirse recombinando una unidad de expresión de proteína insertada en los plásmidos pNTR500F, pCD540FT (Patentes de Estados Unidos N° 6416754 y 6652849, y Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos 2003/0103952), pBLES100-S-eCD (JP A 2002-97144), pAV001-HU-eCD-M968 (WO 2007-136107), etc. con otra unidad de expresión de proteína dada, y luego eliminar de la misma una unidad de replicación de plásmido que actúa en *E. coli*.

El microorganismo anaerobio transformado para el tratamiento de una enfermedad anaerobia de la presente invención se puede construir transformando un microorganismo anaerobio dado que ha de transformarse de conformidad con un método de ingeniería genética conocido utilizando el vector de expresión mencionado anteriormente.

Puesto que el microorganismo anaerobio transformado para el tratamiento de una enfermedad anaerobia de la presente invención se usa en un agente para tratar una enfermedad anaerobia tal como un tumor sólido, es esencial que este microorganismo anaerobio sea obligadamente anaerobio y no patógeno; se pueden usar bacterias patógenas tales como *Clostridium* o *Salmonella* si se hacen no patógenas, y se puede usar una bacteria facultativa anaerobia como *Lactobacillus* si se ha mutado para que sea obligadamente anaerobia.

Los ejemplos preferidos incluyen bacterias anaerobias no patógenas; las enterobacterias no patógenas son más preferibles, y entre ellas las bifidobacterias son las más preferibles.

Los ejemplos de las bifidobacterias incluyen *B. adolescentis*, *B. animalis*, *B. infantis*, *B. thermophilum*, *B. pseudolongum*, *B. bifidum*, *B. breve* y *B. longum*, y *B. longum* es la más preferible.

Estas bacterias están disponibles comercialmente o están fácilmente disponibles en una institución depositaria. Por ejemplo, *B. longum* ATCC-15707, *B. bifidum* ATCC-11863, *B. infantis* ATCC-15697, etc. se pueden obtener fácilmente de ATCC (The American Type Culture Collection).

La cepa de cada bacteria no está en particular limitada, y los ejemplos de la cepa de *B. longum* incluyen la cepa *B. longum* 105-A, la cepa *B. longum* aE-194b, la cepa *B. longum* bs-601 y la cepa *B. longum* M101-2, y entre ellas la cepa *B. Longum* 105-A es preferible.

Los ejemplos de la cepa de *B. breve* incluyen la cepa *B. breve* estándar (Japan Collection of Microorganisms (JCM) 1192), la cepa *B. breve* aS-1 y la cepa *B. breve* I-53-8W, y entre ellas la cepa estándar de *B. breve* y la cepa de *B. breve* aS-1 son preferibles.

Los ejemplos de la cepa de *B. infantis* incluyen la cepa estándar de *B. infantis* (JCM1222) y la cepa *B. infantis* 1-10-5, y entre ellas son preferibles la cepa estándar de *B. infantis* y la cepa *B. infantis* 1-10-5.

Además, los ejemplos de una cepa de *B. lactentis* incluyen la cepa estándar de *B. lactentis* (JCM1220).

El microorganismo anaerobio transformado de la presente invención no está en particular limitado siempre que sea capaz de crecer en un tejido que se encuentre en un entorno anaerobio y que exprese una proteína que tenga actividad objetivo y, además, no tenga riesgo de transferencia horizontal del vector de expresión retenido a una bacteria distinta de la bacteria transformada, en particular a un microorganismo anaerobio patógeno o aerobio o facultativo.

Los ejemplos preferidos del microorganismo anaerobio transformado de la presente invención incluyen un microorganismo anaerobio transformado que es capaz de crecer en un tejido tumoral que está en un entorno

anaerobio y que expresa una proteína que tiene la actividad de convertir un precursor de sustancia antitumoral en una sustancia antitumoral. Los ejemplos más preferidos de los mismos incluyen un transportador de genes formado a partir de Bifidobacterium que es capaz de crecer en un tejido tumoral que está en un entorno anaerobio y expresar CD, que es una enzima que convierte 5-FC en 5-FU, y los ejemplos en particular preferidos de los mismos incluyen la cepa B. longum 105-A transformada por pBifCD (B. longum 105-A/pBifCD; Número de Acceso NPMD, NITE BP-491).

El transportador de genes de la presente invención se puede construir de conformidad con un método descrito en un libro de texto experimental comercial tal como, por ejemplo, Gene Manual (Kodansha), Gene Manipulation Experimental Method, Ed. por Yasuyuki Takagi (Kodansha), Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory (1982), Molecular Cloning 2^o Edición, Cold Spring Harbor Laboratory (1989), o Methods in Enzymol., 194 (1991).

El microorganismo anaerobio transformado de la presente invención presenta un mejor efecto terapéutico para una enfermedad anaerobia al usarlo en combinación con un potenciador de colonización y proliferación para promover la colonización y proliferación del microorganismo en el tejido corporal objetivo.

Se puede usar cualquier potenciador de colonización y proliferación de microorganismos anaerobios en la presente invención, siempre que pueda mejorar la colonización y proliferación del microorganismo anaerobio transformado de la presente invención concretamente en una localización de enfermedad anaerobia, siempre que sea seguro y pueda ser administrado por vía intravenosa. Los ejemplos de los mismos incluyen sacáridos tales como arabinosa, xilosa, galactosa, glucosa, maltosa, lactosa, melibiosa, melecitosa, rafinosa y lactulosa.

Entre ellos, son preferibles la glucosa, la lactulosa y la maltosa, y la maltosa es la más preferible.

La composición farmacéutica que comprende como componente activo el microorganismo anaerobio transformado de la presente invención no está en particular limitado siempre que comprenda el microorganismo anaerobio transformado de la presente invención. Además, puede comprender dos o más microorganismos anaerobios transformados de la presente invención. Además, la composición farmacéutica o el agente terapéutico de la enfermedad anaerobia de la presente invención se puede usar en combinación con una composición farmacéutica o un agente terapéutico que contiene, además del transportador de genes de la presente invención, un compuesto que presenta un efecto terapéutico sobre la enfermedad anaerobia.

Los ejemplos de la forma de la composición farmacéutica para el tratamiento de una enfermedad anaerobia que contiene, como componente activo, el microorganismo anaerobio transformado de la presente invención, incluye un agente líquido o una preparación sólida que contiene el microorganismo anaerobio transformado. El agente líquido puede producirse purificando un fluido de cultivo del microorganismo anaerobio transformado de la presente invención, añadiéndole, según se requiera, una solución salina fisiológica apropiada, sustitución de fluido o aditivo medicinal, y llenando una ampolla, vial, etc. con el mismo. La preparación sólida se puede producir añadiendo un protector apropiado a un agente líquido, llenando una ampolla, vial, etc., y luego, mediante liofilización o secado en L, o añadiendo un protector apropiado a un agente líquido, liofilizando o secado en L, y luego llenando una ampolla, vial, etc. con el resultado obtenido.

Con respecto a un método para administrar una composición farmacéutica que contiene, como un componente activo, del microorganismo anaerobio transformado de la presente invención, son posibles tanto la administración oral como la administración parenteral, pero la administración parenteral es preferible y, por ejemplo, se pueden realizar una inyección intravenosa, una inyección subcutánea, una infusión o administración intracerebroventricular, y la inyección intravenosa es la más preferible.

La dosis del microorganismo anaerobio transformado para el tratamiento de una enfermedad anaerobia de la presente invención no está en particular limitada en tanto que sea una cantidad suficiente para colonizar una localización de la enfermedad anaerobia y creciente para expresar una dosis terapéutica efectiva de una proteína activa, pero la dosis es preferiblemente lo más pequeña como sea posible desde el punto de vista de aliviar la carga sobre un paciente durante la administración en la medida que sea admisible.

La dosis del microorganismo anaerobio transformado para el tratamiento de una enfermedad anaerobia cuando se usa en el tratamiento real se selecciona apropiadamente según la gravedad de una enfermedad, y el peso corporal, la edad o el sexo de un paciente, y puede aumentarse o disminuirse según corresponda, dependiendo del grado de mejora. Por ejemplo, la dosis se ajusta apropiadamente dependiendo de la dosis terapéutica efectiva de proteína activa producida por el microorganismo anaerobio utilizado, la cantidad de proteína activa producida por el microorganismo anaerobio utilizado, etc.

Más concretamente, en el caso de la administración intravenosa, para evitar un riesgo tal como una embolización debido a una masa de bacterias, es preferible usar la inyección a una concentración lo más baja posible, dividir la inyección en una pluralidad de inyecciones, o diluir la inyección con un líquido de transfusión apropiado y administrar mediante infusión continua. Por ejemplo, en el caso de un adulto, se administran de 10^6 a 10^{12} cfu por kg de peso corporal de las células del microorganismo anaerobio transformado una vez a una pluralidad de veces por día, y

sucesivamente o en intervalos apropiados desde 1 día a una pluralidad de días. Más concretamente, de 1 a 1.000 ml por adulto de una preparación que contiene 10^4 a 10^{10} cfu/ml de las células del microorganismo anaerobio transformado se administra directamente o por dilución con una sustitución de fluido apropiada y, preferiblemente, dividiéndolo en 1 a una pluralidad de veces al día para 1 a una pluralidad de días, sucesivamente.

5 Además, en el caso de la administración local que implica la administración directa a tejido enfermo, puesto que es necesario que las células bacterianas colonicen y proliferen en todo el tejido enfermo tanto como sea posible, es deseable administrar una inyección de alta concentración deseablemente administrada a una pluralidad de posiciones del tejido enfermo. Por ejemplo, en el caso de un adulto, se administran de 10^6 a 10^{12} cfu por kg de peso corporal de las células del microorganismo anaerobio de la presente invención una vez o una pluralidad de veces al día, y sucesivamente o en intervalos según corresponda durante 1 día, a una pluralidad de días, según sea necesario. Más concretamente, de 1 a 1000 ml por adulto de una preparación que contiene de 10^4 a 10^{10} cfu/ml de las células del microorganismo anaerobio de la presente invención se administran directamente varias veces al día durante 1 a una pluralidad de días sucesivos, cuando sea necesario.

15 Cuando se observa que las bacterias en el tejido enfermo han desaparecido durante el período de tratamiento, el tratamiento primero se suspende, y luego las bacterias se administran nuevamente de la misma manera que con anterioridad.

20 Los ejemplos de una composición farmacéutica que comprende como componente activo el promotor de colonización y proliferación de microorganismos anaerobios de la presente invención incluyen un agente líquido o una preparación sólida que comprende el promotor de colonización y proliferación de microorganismos anaerobios. El agente líquido puede producirse disolviendo la colonización de microorganismos anaerobios y potenciador de proliferación en agua para inyección, añadiendo a la misma, según sea necesario, un aditivo farmacéutico apropiado tal como un agente tampón, un agente isotonzante, un estabilizador o un agente de ajuste de pH, esterilizando adicionalmente, y luego cargar en una bolsa o una botella de infusión. Además, la preparación sólida puede obtenerse mezclando el promotor de colonización y proliferación de microorganismos anaerobios con un aditivo farmacéutico apropiado tal como un agente tampón, un agente isotonzante, un estabilizador o un agente de ajuste del pH. Cuando se administra dicha preparación sólida, se administra disolviéndola en agua esterilizada para inyección, solución salina fisiológica, etc.

25 Como un método para administrar la composición farmacéutica del promotor de colonización y proliferación de microorganismos anaerobios de la presente invención, la administración intravenosa es la más preferible, pero puede realizarse cuando sea necesario mediante inyección subcutánea, infusión local, administración intracerebroventricular, etc., y la administración oral también puede realizarse.

30 La dosis del promotor de colonización y proliferación de microorganismos anaerobios de la presente invención no está en particular limitada en tanto que sea una cantidad que permita que el microorganismo anaerobio transformado de la presente invención colonice concretamente una localización de enfermedad anaerobia, prolifere hasta una cantidad terapéutica efectiva, y esté continuamente presente durante el período de tratamiento hasta su finalización, pero preferiblemente es una cantidad que tenga el menor efecto posible en un paciente o tejido enfermo.

35 La dosis utilizada en el tratamiento real se selecciona apropiadamente dependiendo del peso corporal, la edad o el sexo de un paciente, y puede aumentarse o disminuirse según sea apropiado dependiendo de la dosis del microorganismo anaerobio transformado para el tratamiento de una enfermedad anaerobia de la presente invención.

40 Concretamente, por ejemplo, cuando se utiliza un promotor de colonización y proliferación de microorganismos anaerobios que contiene maltosa como componente activo para un adulto, se administra una solución de maltosa al 10% para inyección intravenosa a razón de 3 a 20 ml por kg de peso corporal una vez al día, de 5 a 10 ml por kg de peso corporal una vez al día. Más concretamente, se administra una preparación de solución de maltosa al 10% para administración intravenosa de 200 a 600 ml por adulto una vez al día de forma continua durante el período de tratamiento.

45 El potenciador de la colonización y proliferación de microorganismos anaerobios de la presente invención se puede administrar como un líquido de infusión para diluir bacterias cuando se administra el microorganismo anaerobio transformado de la presente invención.

50 Además, la composición farmacéutica o el agente terapéutico para una enfermedad anaerobia de la presente invención puede contener componentes adicionales distintos del microorganismo anaerobio transformado o el promotor de colonización y proliferación de microorganismos anaerobios de la presente invención siempre que el efecto de la presente invención no sea perjudicado. Los ejemplos de tales componentes adicionales incluyen un soporte farmacéuticamente aceptable, un excipiente y un diluyente.

55 Cuando el microorganismo anaerobio transformado de la presente invención es una bacteria anaerobia en la que se introduce un gen que puede 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 una enfermedad anaerobia que comprende el microorganismo anaerobio transformado para el tratamiento de una enfermedad anaerobia como componente activo se usa en una combinación con una cantidad de un precursor de sustancia antitumoral que se puede convertir en una cantidad eficaz de una sustancia antitumoral por la proteína expresada por el microorganismo anaerobio transformado.

Este precursor de sustancia antitumoral puede estar contenido en la composición farmacéutica o en el agente terapéutico para una enfermedad anaerobia que contiene, como un componente activo, el microorganismo anaerobio transformado de la presente invención, pero es preferible usar una composición farmacéutica que contenga el precursor de sustancia antitumoral en combinación con una composición farmacéutica o con un agente terapéutico para una enfermedad anaerobia que contiene el microorganismo anaerobio transformado para el tratamiento de una enfermedad anaerobia de la presente invención como un componente activo.

El precursor de sustancia antitumoral usado en la presente invención no está en particular limitado siempre que tenga pocos efectos secundarios sobre el tejido normal en el estado precursor (profármaco) y tenga un alto efecto terapéutico en el objetivo de tratamiento para una enfermedad anaerobia después de convertirse en una sustancia antitumoral, y sus ejemplos incluyen 5-FC, que es un profármaco de 5-FU, CB1945, que se convierte en un agente alquilante antitumoral, ganciclovir, que se convierte en un metabolito activo antitumoral, y una sustancia activa antitumoral glucuronidada.

Por consiguiente, cuando la composición farmacéutica o el agente terapéutico para una enfermedad anaerobia de la presente invención se usa en combinación con un precursor de sustancia antitumoral, el método para administrar la composición farmacéutica o el agente terapéutico para una enfermedad anaerobia 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 momentos separados; la administración de la composición farmacéutica que contiene el precursor de sustancia antitumoral se lleva a cabo preferiblemente después de permitir un tiempo suficiente para que el microorganismo anaerobio transformado de la presente invención se desarrolle en células tumorales después de que se administre la composición farmacéutica o el agente terapéutico para una enfermedad anaerobia de la presente invención.

Además, cuando la composición farmacéutica o el agente terapéutico para una enfermedad anaerobia de la presente invención se usa en combinación con un precursor de sustancia antitumoral, puesto que el microorganismo anaerobio transformado para el tratamiento de una enfermedad anaerobia coloniza y prolifera solo en el tejido tumoral que es un entorno anaerobio y localmente produce una proteína activa en ese lugar, en comparación con un método para tratar un tumor sólido utilizando un precursor de sustancia antitumoral normal, los efectos secundarios pueden ser suprimidos en gran medida, y la dosis del precursor de sustancia antitumoral puede establecerse en un amplio margen.

La dosis del precursor de sustancia antitumoral se puede seleccionar apropiadamente de conformidad con la tasa de proliferación en el tejido tumoral del microorganismo anaerobio transformado usado en combinación y la eficacia de convertir el precursor de sustancia antitumoral en la sustancia antitumoral. De la misma manera que para la dosis del transportador de genes, puede seleccionarse según corresponda de conformidad con la gravedad de una enfermedad, y el peso corporal, la edad o el sexo de un paciente, y puede aumentarse o reducirse según corresponda de conformidad con el grado de mejora.

Por ejemplo, en el tratamiento real, la dosis se ajusta apropiadamente dependiendo del tipo de precursor de la sustancia antitumoral usado y de la sustancia antitumoral a ser convertidas, la dosis terapéutica eficaz de la sustancia antitumoral convertida a partir del precursor de la sustancia antitumoral, el tipo de proteína que se obtiene por el microorganismo anaerobio utilizado que tiene una actividad de conversión del precursor de sustancia antitumoral en la sustancia antitumoral, y la cantidad de proteína activa que se obtiene por el microorganismo anaerobio utilizado, etc.

Concretamente, por ejemplo, cuando un CD que expresa el microorganismo anaerobio transformado y el precursor de sustancia antitumoral 5-FC se administran en combinación, después de que se confirme que las bacterias han colonizado y crecido en tejido enfermo y las bacterias han desaparecido en la sangre y en el tejido normal, el 5-FC se administra de 1 a 100 mg/día por kg de peso corporal de un adulto, una vez o una pluralidad de veces al día sucesivamente durante un período de tratamiento. El método de administración es preferiblemente administración oral, pero puede realizarse administración parenteral tal como administración intravenosa o administración anal.

La expresión 'en una combinación de X e Y' referida en la presente invención, incluye tanto un caso en el que X e Y están cada uno en configuraciones diferentes y un caso en el que X e Y están en una configuración única (por ejemplo, una configuración que contiene X e Y) cuando X e Y están en configuraciones diferentes, X e Y pueden contener cada uno adicionalmente otro componente.

La composición farmacéutica o el agente terapéutico para una enfermedad anaerobia de la presente invención se puede aplicar a una enfermedad que tiene un entorno anaerobio, y preferiblemente a varios tipos de cánceres

sólidos. Ejemplos de 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 de vías biliares, cáncer de páncreas, cáncer de células de 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 ovario, cáncer de útero, cáncer de tiroides, tumor carcinoide maligno, cáncer de piel, melanoma maligno, osteosarcoma, sarcoma de tejidos blandos, neuroblastoma, tumor de Wilms, retinoblastoma, melanoma y cáncer escamoso.

Además, ejemplos de otras enfermedades que se encuentran en un entorno anaerobio incluyen enfermedades isquémicas tales como infarto de miocardio o arteriosclerosis ocliterante, y enfermedades isquémicas de miembros inferiores tales como la enfermedad de Buerger.

La presente invención se explica más concretamente a continuación haciendo referencia al apartado Ejemplos de Referencia y Ejemplos, pero el alcance técnico de la presente invención no se limita a estos ejemplos.

Producción de preparación congelada de B. longum Re-105A/pBifiCD (NITE BP-491)

Se obtuvieron 2 ml de un líquido de cultivo de B. longum Re-105A/pBifiCD mediante un método descrito en la Solicitud Provisional de Estados Unidos n° 61/124.528, que se vertieron en 2 litros de medio de soporte (medio APS-2S-2.5R) preparado mediante la adición de glucosa, péptido de soja (Hinute (marca registrada) SMP), hidrocioruro de cisteína, pantotenato de potasio, biotina, ácido nicotínico, riboflavina, hidrocioruro de tiamina, ácido ascórbico, carbonato sódico, ácido p-aminobenzoico, timidina, sulfato de magnesio, sulfato de manganeso, cloruro de sodio, fosfato de monopotasio, cloruro férrico, etc., y se realizó un cultivo anaerobio a una temperatura aproximada de 40 °C durante 18 a 21 horas. Una vez terminada la operación de cultivo, el líquido bacteriano se purificó por filtración utilizando un filtro provisto de una membrana de ultrafiltración con un tamaño de poro de 0,8 micrómetros (número de producto FS001K05, Pall Corporation), obteniendo así un líquido bacteriano purificado.

Se añadió agua para inyección a 100 g de glicerol para obtener una cantidad total de 1 litro, que se filtró utilizando una membrana filtrante con un tamaño de poro de 0,2 micrómetros y luego se esterilizó en autoclave a 121°C durante 20 minutos, obteniendo así una solución de glicerol al 10%.

Se añadió una cantidad igual de solución de glicerol al 10% al líquido bacteriano purificado para obtener una solución de preparación de glicerol al 5%, y cada uno de los recipientes de vial de 30 ml se cargaron con 10 ml de dicha solución, se llenaron con gas nitrógeno filtrado estéril y luego fueron objeto de sellado hermético.

Posteriormente, los viales se congelaron utilizando nitrógeno líquido y se almacenaron dentro de un congelador profundo.

Asimilación de varios tipos de sacáridos por B. longum Re-105A/pBifiCD (NITE BP-491).

La asimilación de varios tipos de sacáridos por B. longum Re-105A/pBifiCD (NITE BP-491) se confirmó utilizando API 50 CH y API 20 A.

Una colonia fue suspendida en un medio de API 50 CH o API 20 A mediante un método estándar, se ajustó la turbidez, se inoculó luego una placa de kit, se realizó el cultivo, y se realizó una evaluación por cambio de color después de 24 y 48 horas de cultivo. La evaluación se realizó en base a los resultados transcurridas 48 horas.

Cada una de las pruebas API 50 CH y API 20 A se realizaron dos veces por dos probadores. La prueba API 20 A se realizó para glicerol, arabinosa, xilosa, glucosa, manosa, ramnosa, manitol, sorbitol, salicina, celobiosa, maltosa, lactosa, sacarosa, trehalosa, melecitosa y rafinosa, pero puesto que otros sacáridos no se incluyeron como elementos de prueba, no fueron probados.

Se realizó una evaluación global basada en las evaluaciones finales API 50 CH y API 20 A.

Las evaluaciones finales API 50 CH y API 20 A se realizaron en base a los cuatro resultados de prueba para cada una (dos pruebas por cada uno de los dos evaluadores).

Cuando las evaluaciones finales de API 50 CH y API 20 A fueron diferentes, puesto que API 20 A es un kit diseñado para Bifidobacterium, se utilizó la evaluación API 20 A, y con respecto a elementos de prueba distintos de API 20 A, se utilizó la evaluación de API 50 CH.

Los resultados fueron que L-arabinosa, D-xilosa, galactosa y glucosa, que son monosacáridos, maltosa, lactosa y melibiosa, que son disacáridos, y melecitosa y rafinosa, que son trisacáridos, mostraron un efecto positivo, y ribosa y fructosa, que son monosacáridos, y la sacarosa, que es un disacárido, mostraron un efecto positivo débil.

Los resultados de la prueba se proporcionan en la Tabla 1. En la tabla, (+) indica positivo, (-) indica negativo y (w)

indica positivo débil, y (v) y (wv) indican variabilidad en los resultados de las pruebas.

(NT) en la columna de API 20 A indica que la prueba no se ha llevado a cabo (elemento no probado).

5

Tabla 1. Asimilación de varios tipos de sacáridos

Nº	Sustancia de prueba	API 50 CH	API 20 A	Evaluación global
1	Glicerol	-	-	-
2	Eritritol	-	NT	-
3	d-Arabinosa	-	NT	-
4	1-Arabinosa	+	+	+
5	Ribosa	wv	NT	wv
6	d-xilosa	+	+	+
7	l-xilosa	-	NT	-
8	Adonitol	-	NT	-
9	β-Metil-d-xilósido	-	NT	-
10	Galactosa	+	NT	+
11	Glucosa	+	+	+
12	Fructosa	wv	NT	wv
13	Manosa	-	V	v
14	Sorbosa	-	NT	-
15	Rhamnosa	-	-	-
16	Dulcitol	-	NT	-
17	Inositol	-	NT	-
18	Manitol	-	-	-
19	Sorbitol	-	-	-
20	α-Metil-d-manósido	-	NT	-
21	α-Metil-d-glucósido	-	NT	-
22	n-acetilglucosamina	-	NT	-
23	Amigdalina	-	NT	-
24	Arbutin	-	NT	-
25	Esculina	-	NT	-
26	Salicina	-	-	-
27	Celobiosa	-	-	-
28	Maltosa	+	+	+
29	Lactosa	+	+	+
30	Melibiosa	+	NT	+
31	Sacarosa	-	wv	wv
32	Trehalosa	-	-	-
33	Inulina	-	NT	-
34	Melezitosa	+	+	+
35	Rafinosa	+	+	+
36	Almidón	-	NT	-
37	Glucógeno	-	NT	-
38	Xylitol	-	NT	-
39	Gentiobiosa	-	NT	-
40	d-Turanosa	-	NT	-
41	d-Lyxosa	-	NT	-
42	d-Tagatosa	-	NT	-
43	d-Fucosa	-	NT	-
44	l-Fucosa	-	NT	-
45	d-Arabitol	-	NT	-
46	1-Arabitol	-	NT	-
47	Gluconato	-	NT	-

Nº	Sustancia de prueba	API 50 CH	API 20 A	Evaluación global
48	2-Ketogluconato	-	NT	-
49	5-Ketogluconato	-	NT	-

Uso combinado de B. longum Re-105A/pBifiCD y glucosa

(1) Preparación del ratón atímico que porta un tumor

5 Se trasplantaron células KPL-1 de línea celular de cáncer de mama humano a 5 x 10⁵ células/ratón/0,2 ml debajo de la piel del lado posterior de la extremidad anterior derecha de un ratón atímico. Las dimensiones del tumor (diámetro mayor, diámetro menor, grosor) se midieron utilizando calibres (Digimatic Caliper, CD-15PS, Mitutoyo, Kanagawa), y el volumen del tumor se determinó a partir de la ecuación siguiente. La medición del volumen del tumor se realizó el día antes de la administración de B. longum Re-105A/pBifiCD (día -1) y 7 días después de la administración de B. longum Re-105A/pBifiCD (día 7). Volumen tumoral (mm³) = diámetro mayor (mm) x diámetro menor (mm) x grosor (mm)/2.

15 (2) Administración de la preparación congelada de B. longum Re-105A/pBifiCD, solución de glucosa al 10% y solución salina fisiológica.

20 Se seleccionaron 22 ratones atímicos portadores de un tumor con un volumen tumoral del orden de magnitud de 80 a 150 mm³ a partir de 61 ratones atímicos portadores de tumores KPL-1 y divididos en dos grupos (11 ratones por grupo) con un nivel igual de volumen tumoral como criterio. La preparación congelada de B. longum Re-105A/pBifiCD se administró por vía intravenosa a los ratones de cada grupo utilizando un Myjector (29G x 1/2, TERUMO, Tokio) 0,05 ml a la vez 4 veces al día (el intervalo entre las 4 veces de la administración fue de 1 hora, y la preparación se dejó a temperatura ambiente durante el período de administración) (Día 0).

25 Desde el día posterior a la administración de B. longum Re-105A/pBifiCD (Día 1), se administró una solución de glucosa al 10% por vía intraperitoneal al primer grupo [grupo de glucosa (+)] 1 ml a la vez dos veces al día (por la mañana/tarde) utilizando una aguja de inyección (25G x 1 RB, TERMO), y la misma cantidad se administró posteriormente todos los días durante 6 días hasta el día antes de la extracción del tejido (Día 6). Además, se administró una solución salina fisiológica al segundo grupo [grupo de glucosa (-)] por el mismo método.

30 (3) Medición del número de bacterias dentro del tumor para B. longum Re-105A/pBifiCD (NITE BP-491)

35 7 días después de la administración de la preparación (Día 7), se sacrificó el ratón, se eliminó el tumor y se midió el peso (g) utilizando una balanza electrónica (AB104-S, METTLER TOLEDO, Tokio). Después de la medición, el tumor se cortó finamente en un estado delgado utilizando tijeras, el tumor se colocó en un tubo homogeneizador (HOMOGENIZER, SANSYO, Tokio), se le añadió un diluyente anaerobio en una relación de peso tumoral (g): diluyente anaerobio (ml) = 1:9, y la mezcla fue molida utilizando un homogeneizador (NZ-1300, EYELA) a 300 rpm. El líquido tumoral homogeneizado se diluyó con un diluyente anaerobio, y para cada uno de los líquidos originales y el líquido diluido se mojaron tres placas BLFS con 100 microlitros. Las placas BLFS mojadas se sellaron en un recipiente sellado junto con un agente generador de desoxigenación/dióxido de carbono, y se cultivaron anaerobiamente en una incubadora a 37 °C durante 3 días. Después del cultivo, se contó el número de colonias en la placa y se determinó el número de bacterias dentro del tumor a partir de una placa BLFS para la cual el número de colonias estaba dentro de 30 a 300 (cuando no había placa con varias colonias en el rango mencionado anteriormente, se seleccionó una placa con un número de colonias que era el más próximo al margen). La cantidad de bacterias dentro del tumor se calculó a partir de la ecuación siguiente.

45 Método para calcular el número de bacterias dentro del tumor

Número de bacterias dentro del tumor (cfu/g) = número medio de colonias (n) x relación de dilución al homogeneizar la relación de dilución del tumor (x) x en el enchapado (y) x 10 (z)

50 (n): (P1 + P2 + P3)/3; P1, 2 y 3 son los números de colonias en cada placa

(x): {peso del tumor (g) + cantidad de diluyente anaerobio (ml)}/peso del tumor (g)

(y): A: x 1 (líquido original), B: x 102 (102 veces la dilución), C: x 104 (104 veces la dilución),

(z): una constante para convertir el valor en número de bacterias por gramo de tumor {porque se platican 100 microlitros (= 0.1 g) de líquido homogenado en cada placa}

55 Análisis estadístico

60 Los resultados experimentales así obtenidos se expresaron como un valor medio más/menos de la desviación estándar. Se utilizó SPSS (software de análisis estadístico, SPSS Inc., Tokio) para analizar el grupo de glucosa (+) y el grupo de glucosa (-). Los resultados de la prueba se tomaron como significativamente diferentes para p <0,05.

(5) Resultados: comparación de la colonización y la proliferación del grupo de glucosa (+) y del grupo de glucosa (-)

en el tejido tumoral

En ratones atímicos portadores de tumores KPL-1 que tenían un volumen tumoral del orden de 80 a 150 mm³ hubo colonización de *B. longum* Re-105A/pBifiCD en el tumor en 10 casos de 11 ratones para el grupo de glucosa (+) y 4 casos de 11 ratones para el grupo glucosa (-). A partir de este resultado, se observó una diferencia significativa para la colonización de *B. longum* Re-105A/pBifiCD en el tumor entre el grupo de glucosa (+) y el del grupo de glucosa (-) (prueba de probabilidad exacta de Fisher: $p = 0,024$). Además, el número medio de bacterias dentro del tumor para los ratones de los grupos donde se observó colonización fue de 1.8×10^6 más/menos 1.9×10^6 cfu/g ($n = 10$) para el grupo de glucosa (+) y 1.1×10^4 más/menos 1.6×10^4 cfu/g ($n = 4$) para el grupo glucosa (-), y se observó una diferencia significativa en la proliferación dentro del tumor entre los dos grupos (prueba U de Mann-Whitney, $P = 0.008$).

A partir de lo que antecede, se confirmó que la glucosa presentaba un efecto en promover la colonización específica de *B. longum* Re-105A/pBifiF en tejido tumoral y un efecto en promover la proliferación en el tejido tumoral.

Uso de *B. longum* Re-105A/pBifiCD y maltosa en combinación (1)

1) Preparación del ratón atímico portador de tumor y medición del volumen del tumor

La preparación de ratones atímicos portadores de tumores y la medición del volumen del tumor se realizaron de la misma manera que en el Ejemplo 1.

El número de células trasplantadas fue de 5×10^5 células/ratón, el volumen trasplantado (concentración de líquido celular) fue de 0,2 ml ($2,5 \times 10^6$ células/ml), y el lugar de trasplante estaba debajo de la piel del lado posterior de la extremidad anterior derecha.

(2) Agrupamiento

Se seleccionaron 42 animales sin anomalías utilizando, como criterio, la condición general y el cambio en el peso a partir de ratones atímicos portadores de tumores que tenían un volumen tumoral de aproximadamente 50 a 200 mm³ el día antes de la administración de bacterias (Día-1), y se dividieron en 7 grupos por un método de aleatorización continua estratificada, de modo que los volúmenes tumorales medios estuvieran en el mismo nivel.

(3) Administración de preparación congelada de *B. longum* Re-105A/pBifiCD y solución al 10% de maltosa

La preparación congelada *B. longum* Re-105A/pBifiCD se descongeló completamente utilizando un baño de termostato a 37 °C durante 10 minutos inmediatamente antes del uso. La preparación bacteriana descongelada se dispersó mezclando ligeramente en tambor, y una cantidad predeterminada de 0,2 ml x dos veces (mañana/tarde)/día; total de 0,4 ml/ratón].

La administración se realizó una vez por la mañana y una por la tarde, y la administración por la tarde se realizó transcurrido un intervalo de 4 horas desde la administración en la mañana (el tiempo permitido fue dentro de 30 minutos). El orden de administración fue a partir del número individual más menor para cada grupo, y la administración se realizó en orden desde el grupo A al grupo H. La administración se realizó en una vena de la cola utilizando una aguja de inyección 26G y una jeringa de polipropileno de 1 ml.

De conformidad con la constitución del grupo que se indica en la Tabla 2 a continuación, maltosa líquida (Otsuka Pharmaceutical Factory, Inc., de inyección de maltosa al 10%) o solución salina fisiológica [1 ml x dos veces (mañana/tarde)/día; total de 2 ml/ratón] se administró por vía intraperitoneal (ip).

La administración intraperitoneal en el día 0 se realizó dentro de 1 hora después de que se completara la administración en la vena de la cola para 6 ratones en cada grupo, tanto por la mañana como por la tarde.

Desde el día 1 en adelante, la administración se realizó una vez por la mañana y por la tarde, y la administración por la tarde se realizó después de un intervalo de 4 horas desde la administración en la mañana (el tiempo permitido fue de 30 minutos).

Tabla 2. Constitución del grupo

Grupo	Agente administrado	Período de administración*	Día de la autopsia	Número de animales
A	10% de maltosa (ip)	Día 0	Día 1	6
B	10% de maltosa (ip)	Día 0 a Día 6	Día 7	6
C	10% de maltosa (ip)	Día 0 al Día 13	Día 14	6
D	10% de maltosa (ip)	Día 0 a Día 6	Día 14	6

Grupo	Agente administrado	Período de administración*	Día de la autopsia	Número de animales
F	Solución salina fisiológica (ip)	Día 0	Día 1	6
G	Solución salina fisiológica (ip)	Día 0 a Día 6	Día 7	6
H	Solución salina fisiológica (ip)	Día 0 a Día 13	Día 14	6

* El día de administración de las bacterias se definió como Día 0.

5 (4) Medición del número de bacterias dentro del tumor y el hígado de conformidad con la constitución del grupo descrita en la Tabla 2 de (3) anterior, los ratones se sacrificaron el Día 1, el Día 7 y el Día 14, se extirparon el tumor y el hígado, y el peso (g) se midió utilizando una balanza electrónica (AB204-S, METTLER TOLEDO, Tokio).

10 El tejido eliminado se cortó finamente en un estado delgado utilizando tijeras y se colocó en un tubo homogeneizador (HOMOGENIZER, SANSYO, Tokio), se añadió un diluyente anaerobio al mismo en una relación de peso del tejido (g): diluyente anaerobio (ml) = 1:9, y la mezcla fue molida utilizando un homogeneizador (NZ-1300, EYELA) a 300 rpm.

15 El líquido tisular homogeneizado se diluyó con un diluyente anaerobio, y para cada uno de los líquidos originales y el líquido diluido, se mojaron tres placas BLFS con 100 microlitros. Las placas BLFS mojadas se sellaron en un recipiente sellado junto con un agente generador de desoxigenación/dióxido de carbono, y se cultivaron anaerobiamente en una cámara termostática a 37 °C durante 3 días.

20 Además, se diluyeron 106 microplacas de la preparación congelada B. longum Re-105A/pBifiCD, 10⁶ veces con un diluyente anaerobio, y se cultivó una placa BLFS con 100 microlitros del líquido diluido como control positivo al mismo tiempo en un contenedor sellado.

25 Después del cultivo, se realizó un recuento del número de colonias en la placa, y se determinaron las cantidades de bacterias dentro del tumor y del hígado a partir de placas BLFS para las cuales el número de colonias estaba dentro de 30 a 300. Cuando no había placa con un número de colonias en el margen mencionado anteriormente, se seleccionó una placa con un número de colonias que era la más cercana a dicho margen. El número de bacterias dentro del tejido se calculó de la misma manera que en el Ejemplo 1 (3).

30 (5) Resultados 1: Comparación de la colonización en el tumor y el número de bacterias dentro del tumor entre el grupo administrado con maltosa y el grupo administrado sin maltosa

35 La colonización en el tumor y el número de bacterias dentro del tumor (valor medio/valor mediano) del grupo administrado con maltosa y del grupo administrado sin maltosa el día después de la administración final de las bacterias (Día 1), 7 días después de la administración (Día 7), y 14 días después de la administración (Día 14), se indican en la Tabla 3 y en la Tabla 4.

Tabla 3. Número de bacterias dentro del tumor del grupo administrado por maltosa

Grupo	A	B	C	D
Nº	Período de administración: Día 0	Día 0 a Día 6	Día 0 al día 13	Día 0 a Día 6
	Día de la autopsia: Día 1	Día 7	Día 14	Día 14
1	5.3 X 10 ⁵	9,8 X 10 ¹	4,7 X 10 ⁷	1,2 X 10 ⁷
2	3.4 X 10 ⁵	4,3 X 10 ⁵	1,0 X 10 ⁶	2,4 X 10 ⁵
3	2.1 X 10 ⁶	4,2 X 10 ⁷	2,4 X 10 ⁷	4,1 X 10 ⁴
4	8.3 X 10 ⁵	N.D	1,4 X 10 ⁶	3,7 X 10 ⁴
5	5.1 X 10 ⁵	3,7 X 10 ⁶	3,5 X 10 ⁵	1,8 X 10 ⁵
6	4.0 X 10 ⁵	1,0 X 10 ⁷	1,6 X 10 ⁶	8,6 X 10 ⁴
Media	7.9 X 10 ⁵	1,1 X 10 ⁷	1,3 X 10 ⁷	2,1 X 10 ⁶
Mediana	5.2 X 10 ⁵	3,7 x 10 ⁶	1,5 X 10 ⁶	1,3 X 10 ⁵

Tabla 4. Número de bacterias dentro del tumor del grupo administrado sin maltosa (grupo administrado con solución salina fisiológica)

Grupo	F	G	H
Nº	Periodo de administración: Día 0	Día 0 a Día 6	Día 0 a Día 13

	Día de la autopsia: Día 1	Día 7	Día 14
1	$7,2 \times 10^3$	$2,0 \times 10^5$	$2,5 \times 10^5$
2	$1,4 \times 10^4$	$3,3 \times 10^1$	$3,3 \times 10^2$
3	$1,5 \times 10^5$	$7,1 \times 10^4$	$6,6 \times 10^1$
4	$1,4 \times 10^4$	$2,5 \times 10^5$	$1,6 \times 10^3$
5	$4,2 \times 10^5$	$2,0 \times 10^6$	$2,2 \times 10^5$
6	$8,0 \times 10^3$	$1,7 \times 10^5$	$2,8 \times 10^5$
Media	$1,0 \times 10^5$	$4,5 \times 10^5$	$1,3 \times 10^5$
Mediana	$1,4 \times 10^4$	$1,9 \times 10^5$	$1,1 \times 10^5$

Comparación del número de bacterias dentro del tumor en el Día 1

5 A partir de los resultados de comparar el número de bacterias dentro de un tumor entre el grupo A (grupo administrado con maltosa) y el grupo F (grupo administrado sin maltosa), usando el valor de la mediana como criterio, se deduce que había más bacterias en el grupo A que en el grupo F, y hubo una diferencia estadísticamente significativa (prueba U de Mann-Whitney, $P = 0,009$).

10 A partir de lo que antecede, se confirmó que la maltosa presenta un efecto en favorecer la colonización específica de *B. longum* Re-105A/pBifCD en tejido tumoral.

Comparación del número de bacterias dentro del tumor en el Día 7

15 De los resultados de comparar el número de bacterias dentro de un tumor entre el grupo B (grupo administrado con maltosa) y el grupo G (grupo administrado sin maltosa) utilizando el valor de la mediana como criterio, hubo más bacterias en el grupo B que en el grupo G. A partir de lo que antecede, se confirmó que la maltosa presenta un efecto en favorecer la proliferación de *B. longum* Re-105A/pBifCD en tejido tumoral.

20 Comparación del número de bacterias dentro del tumor en el Día 14

25 A partir de los resultados de comparar el número de bacterias dentro de un tumor entre el grupo C (grupo administrado con maltosa) y el grupo H (grupo administrado sin maltosa) utilizando el valor de la mediana como criterio, se dedujo que había más bacterias en el grupo A que en el grupo F, y hubo una diferencia estadísticamente significativa (prueba U de Mann-Whitney (corrección de Bonferroni, significativa si $P < 0,017$), $P = 0,002$).

30 Por otro lado, el número de bacterias dentro de un tumor del grupo D (grupo en el que se suspendió la administración de maltosa desde el día 7 en adelante) estaba en el mismo nivel que el grupo H, y no hubo una diferencia estadísticamente significativa (prueba U de Mann-Whitney), (corrección de Bonferroni, significativa si $P < 0,017$) $P = 0,589$).

35 A partir de los resultados anteriores, se confirmó que la maltosa presenta un efecto en favorecer la proliferación y un efecto de mantener la proliferación de *B. longum* Re-105A/pBifCD en tejido tumoral y, además, se confirmó que la administración continua es necesaria para mantener la proliferación.

(6) Resultados 2: Comparación de colonización en hígado y número de bacterias en el hígado entre el grupo administrado con maltosa y el grupo administrado sin maltosa.

40 La colonización en el hígado y la cantidad de bacterias dentro del hígado (valor medio/valor de mediana) del grupo administrado con maltosa y del grupo administrado sin maltosa el día después de la administración final de bacterias (Día 1), 7 días después de la administración (Día 7) y 14 días después de la administración (Día 14), se indican en la Tabla 5 y Tabla 6.

Tabla 5. Número de bacterias dentro del hígado del grupo administrado por maltosa

Grupo	A	B	C	D
Nº	Periodo de administración: Día 0 Día de la autopsia: Día1	Día 0 a Día 6 Día 7	Día 0 a Día 13 Día 14	Día 0 a Día 6 Día 14
1	$3,3 \times 10^3$	N.D.	N.D.	N.D.
2	$2,9 \times 10^3$	N.D.	N.D.	N.D.
3	$5,1 \times 10^2$	N.D.	N.D.	N.D.
4	$3,5 \times 10^3$	N.D.	N.D.	N.D.
5	$5,3 \times 10^2$	N.D.	N.D.	N.D.

6	$9,4 \times 10^2$	N.D.	N.D.	N.D.
Media	$2,0 \times 10^3$	N.D.	N.D.	N.D.
Mediana	$1,9 \times 10^3$	N.D.	N.D.	N.D.

Tabla 6. Número de bacterias en el hígado del grupo administrado sin maltosa (grupo administrado con solución salina fisiológica)

Grupo	F	G	Ft
Nº	Periodo de administración: Día 0 Día de la autopsia: Día1	Día 0 a Día 6 Día 7	Día 0 a Día 13 Día 14
1	$8,0 \times 10^2$	N.D.	N.D.
2	$3,3 \times 10^1$	N.D.	N.D.
3	$8,5 \times 10^2$	N.D.	N.D.
4	$2,6 \times 10^2$	N.D.	N.D.
5	$4,6 \times 10^2$	N.D.	N.D.
6	$2,6 \times 10^3$	N.D.	N.D.
Media	$8,3 \times 10^2$	N.D.	N.D.
Mediana	$6,3 \times 10^2$	N.D.	N.D.

5 Comparación del número de bacterias en el hígado entre el grupo administrado con maltosa y el grupo administrado sin maltosa en Día 1, Día 7 y Día 14. El Día 1, se observaron bacterias en el hígado tanto para el grupo administrado con maltosa como para el grupo administrado sin maltosa, pero el Día 7 y el Día 14 no se observaron bacterias en ninguno de los grupos.

10 A partir de lo que antecede se confirmó que la maltosa no afecta la colonización y proliferación de *B. longum* Re-105A/pBifCD en tejido normal.

15 Uso de *B. longum* Re-105A/pBifCD y maltosa en combinación (2)

(1) Cultivo y subcultivo de células tumorales

20 Las células MKN45 de línea celular de cáncer de estómago humano se cultivaron estáticamente utilizando una incubadora de CO₂ ajustada a 37 °C con CO₂ al 5% (MCO-20AIC, Sanyo Electric Co., Ltd.) bajo condiciones de humidificación. Además, el subcultivo se realizó mediante el siguiente procedimiento cuando la densidad celular se hizo confluyente. Se extrajo el medio dentro del recipiente de cultivo y el recipiente fue ligeramente enjuagado utilizando solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco, libre de Ca²⁺, Mg²⁺ + (PBS(-), Lote N° 160708, Nissui Pharmaceutical Co., Ltd.). Después de aspirar PBS(-), pequeñas cantidades suficientes para que las células se sumergieran de tripsina al 0,25% (lote N° 6280J, Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) y EDTA al 0,02% (lote N° SS054, Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) que contenía PBS(-) (líquido de tripsina/EDTA) se añadieron al mismo y se permitió a la mezcla permanecer en reposo dentro de un incubador de CO₂. Después de confirmar que las células se habían despegado sustancialmente del fondo del recipiente de cultivo cuando se examinaron utilizando un microscopio, se añadió un medio de crecimiento. Las células se separaron utilizando una pipeta, luego se transfirieron a un tubo de centrifugación y se centrifugaron a aproximadamente 1.000 rpm (180 x g) durante 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante, se añadió medio de crecimiento y se inoculó un recipiente de cultivo con las células. El subcultivo de las células se realizó cada 3 o 4 días.

(2) Trasplante de células tumorales

35 Las células recogidas en (1) anterior se lavaron utilizando PBS(-). Las células se suspendieron en una cantidad apropiada de PBS(-), parte de la misma se mezcló con azul de tripán al 0,4% y se determinó el número de células y la viabilidad. El resultado fue que la viabilidad era del 93%. La densidad celular viable se ajustó a 5×10^7 células/ml utilizando PBS(-). La suspensión celular se almacenó bajo enfriamiento con hielo hasta que se usó para trasplante.

40 El trasplante se realizó bajo la piel del área dorsal derecha de un animal utilizando una jeringa de 1 ml (Terumo Corp.) y una aguja de inyección de 26G (Terumo Corp.).

Número de células trasplantadas: 5×10^6 células/0,1 ml/cuerpo

45 (3) Agrupamiento y constitución de grupos de prueba

Agrupamiento

Después de trasplantar las células tumorales, se midieron el diámetro mayor y el diámetro menor del tumor utilizando calibradores (CD-S20C, Mitutoyo), y se determinó el volumen del tumor a partir de la ecuación de (8) siguiente. En primer lugar, se realizó la "eliminación del individuo por una variable única", y se seleccionaron los animales que se utilizarían en el experimento. Estos animales tenían un volumen tumoral medio de 221,5 mm³. Se realizó una "asignación bloqueada por variable única", y la asignación se realizó de modo que el valor medio del volumen tumoral fuera igual para cada grupo de prueba. Este día se estableció como Día 0 (10 días después del trasplante). Como software, se utilizó SAS System Release 8.2 (SAS Preclinical Package Version 5.0, SAS Institute Japan).

Constitución del grupo de prueba

La constitución del grupo de prueba fue como se indica en la Tabla 7.

Tabla 7. Constitución del grupo de prueba

Grupo	Sustancia administrada	Dosis	Frecuencia de administración (/día)	Día de la administración (día)	Número de animales
Primer grupo	Bacterias	-	-	-	8
	5-FC	-	-	-	
	Maltosa	-	-	-	
Segundo grupo	Bacterias	1 X 10 ¹⁰ (cfu/kg/día)	1	1 a 3	8
	5-FC	750 (mg/kg/día)	3	5 a 25, 26	
	Maltosa	200 (mg/cuerpo/día)	2	1 a 25	
Tercer grupo	Bacterias	4 X 10 ¹⁰ (cfu/kg/día)	1	1 a 3	8
	5-FC	750 (mg/kg/día)	3	5 a 25, 26	
	Maltosa	200 (mg/cuerpo/día)	2	1 a 25	
Cuarto grupo	Bacterias	4 X 10 ¹⁰ (cfu/kg/día)	1	1 a 3	8
	5-FC	750 (mg/kg/día)	3	5 a 25, 26	
	Maltosa	-	2*	1 a 25	

Nota) *: para el cuarto grupo, se administró solución salina fisiológica en lugar de maltosa.

(4) Preparación de líquidos de administración

Método de preparación y frecuencia de preparación para bacterias (B. longum Re-105A/pBifiCD)

Un vial cargado con 10 ml (2,3 x 10⁹ cfu/ml) se descongeló en un baño de agua caliente a 37 °C durante 10 minutos inmediatamente antes de su uso.

Método de preparación y frecuencia de preparación para 5-FC

Se midió con precisión una cantidad requerida de 5-FC. Se añadió a la misma agua para inyección, y la mezcla se trató utilizando un dispositivo ultrasónico durante 20 minutos, obteniendo así una solución de 12,5 mg/ml. El almacenamiento y el uso de los líquidos de administración se limitaron al día de la preparación, y se prepararon líquidos de administración 1 a 3 al mismo tiempo. Los líquidos de administración se almacenaron a temperatura ambiente bajo sombra hasta que se completaron todas las administraciones.

Método de preparación y frecuencia de preparación para maltosa y solución salina fisiológica

Se utilizó maltosa o solución salina fisiológica mediante dispensación el día de la administración. El almacenamiento y el uso de los líquidos de administración se limitaron al día de la preparación, y los 1º y 2º líquidos de administración se prepararon al mismo tiempo. Los líquidos de administración se almacenaron a temperatura ambiente bajo sombra hasta que se completaron todas las administraciones.

(5) Frecuencia de administración, tiempo de administración y período de administración de la Bacteria (B. longum Re-105A/pBifiCD)

5 El Día 1 a Día 3, la administración al segundo y cuarto grupos se realizó una vez al día (7,30 a 12,00) durante 3 días.

5-FC

10 En el intervalo del Día 5 al Día 25, la administración al segundo a cuarto grupos se realizó tres veces al día (a intervalos de aproximadamente 4 horas), y el Día 26 la administración se realizó una vez, para un total de 64 administraciones.

Maltosa y solución salina fisiológica

15 El Día 1 a Día 25, la administración al segundo a cuarto grupos se realizó dos veces al día, para un total de 50 administraciones. El intervalo de administración fue de al menos 6 horas. El Día 1 a Día 3, puesto que la primera administración se realizó después de que había transcurrido al menos una hora después de que se completara la administración de bacterias (B. longum Re-105A/pBifiCD), el intervalo de administración fue de 3 a 4 horas.

20 (6) Método de administración

Bacterias (B. longum Re-105A/pBifiCD)

25 Se retuvo una rata desnuda y se le inyectó de forma continua un líquido de administración en la vena de la cola utilizando una jeringa de 10 ml (Terumo Corp.), una aguja de inyección intravenosa alada de 25G (Terumo Corp.) y una bomba de jeringa (TE-331S, Terumo Corp.).

5-FC

30 Se administró por vía oral utilizando una jeringa de 5 ml (Terumo Corp.) y un tubo estomacal (RZ-1, fabricado en teflón, CLEA Japan Inc.) maltosa y solución salina fisiológica.

35 Se administró por vía intraperitoneal con una jeringa de 2,5 ml (Terumo Corp.) y una aguja de inyección 27G (NIPRO).

(7) Dosis

Bacterias (B. longum Re-105A/pBifiCD)

40 1×10^{10} cfu/kg/día (segundo grupo: $1,4$ a $1,8 \times 10^9$ cfu/cuerpo/día) o 4×10^{10} cfu/kg/día (tercer grupo: $5,8$ a $7,0 \times 10^9$ cfu/cuerpo/día, cuarto grupo: $6,0$ a $6,7 \times 10^9$ cfu/cuerpo/día). La tasa de administración fue de 10 ml/kg/hora. La tasa de administración se calculó a partir del peso de la rata en el Día 1 y se redondeó a la primera cifra decimal.

45 5-FC

750 mg/kg/día (250 mg/kg/tiempo). El volumen de administración fue de 60 ml/kg/día (20 ml/kg/tiempo). La cantidad de líquido de administración se calculó a partir del último peso de la rata y se redondeó a la primera cifra decimal.

50 Maltosa y solución salina fisiológica

La dosis de maltosa fue de 200 mg/cuerpo/día (100 mg/cuerpo/tiempo) y la dosis de solución salina fisiológica fue de 0 mg/cuerpo/día (expresada como cantidad de maltosa). El volumen de administración fue de 2 ml/cuerpo/día (1 ml/cuerpo/tiempo).

55 (8) Medición del diámetro tumoral

Cálculo del volumen tumoral

60 Después del trasplante de células tumorales, se midieron el diámetro mayor y el diámetro menor del tumor utilizando calibres, y el volumen del tumor se determinó a partir de la ecuación siguiente. Desde el día del agrupamiento en adelante, la medición del diámetro del tumor se realizó el Día 0, 5, 8, 11, 14, 17, 20, 23 y 26.

Volumen tumoral (mm^3) = diámetro mayor (mm) x diámetro menor (mm) x diámetro menor (mm)/2

65 Cálculo de la tasa de crecimiento tumoral

La tasa de crecimiento tumoral se calculó de conformidad con la siguiente ecuación del volumen tumoral al comienzo de la administración de 5-FC en adelante.

5 Tasa de crecimiento tumoral = volumen tumoral desde el Día 5 en adelante/volumen tumoral el Día 5

Cálculo de T/C (%)

10 T/C (%) se calculó de conformidad con la siguiente ecuación a partir de la tasa de crecimiento tumoral desde el Día 8 en adelante.

T/C (%) = tasa de crecimiento tumoral medio del segundo, tercer o cuarto grupo/tasa de crecimiento tumoral medio del primer grupo x 100

15 (9) Resultados

Volumen tumoral

20 Los resultados de la medición del volumen tumoral se indican en la Tabla 8 y en la Figura 2. El volumen tumoral del primer grupo (grupo no tratado) fue 223,3 más/menos 43,0 mm³ el Día 0 y 505,0 más/menos 125,9 mm³ el Día 5. El Día 26, fue 4002,6 más/menos 661,1 mm³. El volumen del tumor aumentó notablemente durante el período de examen.

25 El volumen tumoral del segundo grupo (dosis bacteriana baja, administración con maltosa) fue de 221,0 más/menos 44,4 mm³ el Día 0 y 496,1 más/menos 108,3 mm³ el Día 5, en el que se inició la administración de 5 FC. Además, el día 26 fue 2370,9 más/menos 487,4 mm³. Para el segundo grupo, en comparación con el primer grupo, se observó un valor significativamente menor para el volumen del tumor en todo momento desde el Día 11 en adelante (en el día 11 P <0,05, en el día 14, 17, 20, 23 y 26 P < 0,001: Prueba t de Estudiante).

30 El volumen tumoral del tercer grupo (dosis bacteriana alta, administración de maltosa) fue de 219,7 más/menos 41,9 mm³ el Día 0, y 488,7 más/menos 80,2 mm³ el Día 5, en el que se inició la administración de 5 FC. Además, el día 26 fue 2135,6 más/menos 592,9 mm³. Para el tercer grupo, en comparación con el primer grupo, se observó un valor significativamente menor para el volumen tumoral en todo momento desde el Día 8 en adelante (en el día 8 P <0,01, Día 11, 14, 17, 20, 23 y 26 P <0,001: prueba t de Estudiante) y, además, en comparación con el cuarto grupo, se observó un valor significativamente menor para el volumen del tumor en los días 14, 20, 23 y 26 (en todos los P <0,05: prueba t de Estudiante).

40 El volumen tumoral del cuarto grupo (dosis bacteriana alta, administración sin maltosa) fue 222,1 más/menos 43,5 mm³ en Día 0, y 500,3 más/menos 109,3 mm³ en el Día 5, en que se inició la administración de 5-FC. Además, el día 26 fue de 2879,3 más/menos 658,4 mm³. Para el cuarto grupo, en comparación con el primer grupo, se observó un valor significativamente menor para el volumen del tumor en todo momento desde el Día 11 en adelante (en el día 14 P <0,05, en el día 11, 17, 20, 23 y 26 P < 0,01: prueba t de Estudiante).

45 **Tabla 8. Volumen tumoral (valor medio)**

Grupo	Número de animales	Volumen tumoral (mm ³) (valor medio)								
		Día 0	Día 5	Día 8	Día 11	Día 14	Día 17	Día 20	Día 23	Día 26
Primer grupo	8	223,3 ± 43,0	505,0 ± 125,9	736,1 ± 112,6	1006,3 ± 106,4	1370,7 ± 155,5	1860,2 ± 303,6	2547,9 ± 426,4	3288,3 ± 566,4	4002,6 ± 661,1
Segundo grupo	8	221,0 ± 44,4	496,1 ± 108,3	683,4 ± 134,6	835,5 ± 143,8	1032,7 ± 149,0	1320,7 ± 160,4	1633,7 ± 249,8	1970,2 ± 341,0	2370,9 ± 487,4
Tercer grupo	8	219,7 ± 41,9	488,7 ± 80,2	562,8 ± 113,3	673,8 ± 177,4	885,1 ± 206,0	1078,0 ± 265,3	1450,2 ± 356,1	1807,3 ± 488,3	2135,6 ± 592,9
Cuarto grupo	8	222,1 ± 43,5	500,3 ± 109,3	662,7 ± 129,9	827,8 ± 116,4	1117,9 ± 183,3	1334,3 ± 216,7	1884,1 ± 353,6	2388,2 ± 477,9	2879,3 ± 658,4

Tasa de crecimiento tumoral

Los resultados se proporcionan en la Tabla 9.

La tasa de crecimiento tumoral del primer grupo fue 8,4 más/menos 2,7 el Día 26.

5 Comparado con el primer grupo, la tasa de crecimiento tumoral del segundo grupo fue significativamente menor en todo momento desde el Día 17 en adelante (en el Día 17, 20 y 23 $p < 0,05$, en el Día 26 $P < 0,01$: prueba t de Estudiante), y el Día 26 fue 4,9 más/menos 1,2.

10 En comparación con el primer grupo y el cuarto grupo, la tasa de crecimiento tumoral del tercer grupo fue un valor significativamente menor en todo momento desde el Día 8 en adelante (en comparación con el primer grupo $P < 0,01$ y comparado con el cuarto grupo $P < 0,05$) en todo momento: prueba t de Estudiante), y en el Día 26 fue de 4,4 más/menos 0,8. En comparación con el primer grupo, la tasa de crecimiento tumoral del cuarto grupo fue significativamente menor desde el Día 17 en adelante (todos fueron $P < 0,05$: prueba t de Estudiante) y el Día 26 fue 5,9 más/menos 1,4.

15

Tabla 9. Tasa de crecimiento tumoral (valor medio)

Grupo	Número de animales	Tasa de crecimiento tumoral (valor medio)							
		Día 5	Día 8	Día 11	Día 14	Día 17	Día 20	Día 23	Día 26
Primer grupo	8	1,0	1,5	2,1	2,9	3,9	5,3	6,9	8,4
		\pm 0,0	\pm 0,3	\pm 0,5	\pm 0,9	\pm 1,1	\pm 1,6	\pm 2,3	\pm 2,7
Segundo grupo	8	1,0	1,4	1,7	2,2	2,8	3,5	4,2	4,9
		\pm 0,0	\pm 0,2	\pm 0,3	\pm 0,6	\pm 0,9	\pm 1,2	\pm 1,2	\pm 1,2
Tercer grupo	8	1,0	1,2	1,4	1,8	2,2	3,0	3,7	4,4
		\pm 0,0	\pm 0,1	\pm 0,3	\pm 0,2	\pm 0,3	\pm 0,4	\pm 0,7	\pm 0,8
Cuarto grupo	8	1,0	1,3	1,7	2,3	2,7	3,9	4,9	5,9
		\pm 0,0	\pm 0,1	\pm 0,2	\pm 0,4	\pm 0,6	\pm 0,8	\pm 1,0	\pm 1,4

T/C (%)

20

Los resultados se proporcionan en la Tabla 10.

El valor de T/C (%) del segundo grupo en el Día 26 fue 58,3.

El valor de T/C (%) del tercer grupo en el día 26 fue 52,4.

El valor de T/C (%) del cuarto grupo en el día 26 fue 70,2.

25

Tabla 10. T/C (%)

Grupo	Número de animales	T/C (%)						
		Día 8	Día 11	Día 14	Día 17	Día 20	Día 23	Día 26
Primer grupo	8	-	-	-	-	-	-	-
Segundo grupo	8	93,3	81,0	75,9	71,8	66,0	60,9	58,3
Tercer grupo	8	80,0	66,7	62,1	56,4	56,6	53,9	52,4
Cuarto grupo	8	86,7	81,0	79,3	69,2	73,6	71,0	70,2

30 A partir de los resultados de esta prueba, se confirmó que la maltosa presenta un efecto en favorecer la colonización específica de B. longum Re-105A/pBifCD en tejido tumoral y un efecto en favorecer la proliferación y un efecto en el mantenimiento de la proliferación en el tejido tumoral.

35 Además, de conformidad con el uso de maltosa en combinación, es posible que una dosis baja de bacterias presente un efecto antitumoral al mismo nivel que una dosis alta de bacterias, por lo tanto, es posible reducir la dosis de bacterias, y se ha confirmado que se puede llevar a cabo un tratamiento seguro que tiene una carga baja en un paciente y causa menos efectos secundarios.

Uso de B. longum Re-105A/pBifiCD y maltosa o lactulosa en combinación

(1) Preparación del tumor en ratones atímicos y medición del volumen del tumor

5 La preparación de ratones atímicos portadores de tumores y la medición del volumen tumoral se realizaron de la misma manera que en el Ejemplo 1 y el Ejemplo 2.

(2) Agrupamiento y administración del fármaco de prueba

10 Se seleccionaron 32 ratones con tumor KPL-1 que tenían un volumen tumoral de 60 a 90 mm³ y se dividieron en cuatro grupos (8 ratones por grupo), y cada fármaco de prueba se administró de conformidad con el calendario de constitución y administración del grupo mostrado en (3) a continuación.

Administración de bacterias (B. longum Re-105A/pBifiCD)

15 Con respecto a las bacterias (B. longum Re-105A/pBifiCD), de conformidad con (3) la constitución del grupo y el programa de administración, una preparación congelada de B. longum Re-105A/pBifiCD ($2,3 \times 10^9$ cfu/ml) se administró por vía intravenosa a 0,3 ml por ratón dos veces al día durante 3 días (Día 1 a 3). La dosis total de la bacteria fue de $4,1 \times 10^9$ cfu/ratón.

20 Administración de flucitosina (5-FC)

25 Se administró por vía oral 0,4 ml de una solución de 5,5 FC/12,5 mg/ml (750 mg/kg/día) dos veces al día a ratones de dos grupos excluyendo el grupo de control (grupo A) de conformidad con el programa de constitución y administración del grupo que se indican en (3). El período de administración fue de 21 días (Días 4 a 24) desde el día después de la administración final de la bacteria.

Administración de maltosa

30 De conformidad con el programa de constitución y administración del grupo que se indica en (3), se administró intraperitonealmente 1 ml de una inyección de 10% de maltosa a ratones dos veces al día. El período de administración fue de 24 días (Día 1 a 24) desde el día de la administración de las bacterias (B. longum Re-105A/pBifiCD).

35 Para el grupo D, en lugar de maltosa, se utilizó la misma cantidad de solución salina fisiológica administrada con la misma planificación (Día 1 a 24).

Administración de lactulosa

40 Se administró por vía intraperitoneal 1 ml de una solución de lactulosa al 20% (p/v) en agua purificada una vez al día a los ratones de conformidad con el programa de constitución y administración que se indica en (3). El período de administración fue de 24 días (Día 1 a 24) desde el día de la administración de la bacteria, pero como se confirmó que dos ratones habían muerto durante el período de administración (Día 13 y Día 19) se modificó el calendario de administración y se suspendió la administración a partir del Día 19 en adelante.

45 (3) Resumen del programa de constitución y administración del grupo

El programa de constitución y administración del grupo se indican en la Tabla 11.

50 **Tabla 11. Programa de constitución y administración del grupo**

Grupo	Sustancia administrada	Dosis por día	Día de administración (Día)	Número de animales
	Bacteria	-	-	
Grupo A	5-FC	-	-	8
	Sacárido	-	-	
	Bacterias ($2,3 \times 10^9$ cfu/ml)	0,6 ml ($1,38 \times 10^9$ cfu/día)	1 a 3	
Grupo B	5-FC (12,5 mg/ml)	1,2 ml (750 mg/kg/día)	4 a 24	8
	Maltosa (10%)	2 ml (200 mg/día)	1 a 24	
	Bacterias ($2,3 \times 10^9$ cfu/ml)	0,6 ml ($1,38 \times 10^9$ cfu/día)	1 a 3	
Grupo C	5-FC (12,5 mg/ml)	1,2 ml (750 mg/kg/día)	4 a 24	8

	Lactulosa (20%)	1 ml (200 mg/día)	1 a 24	
	Bacterias (2,3 X 10 ⁹ cfu/ml)	0,6 ml (1,38 X 10 ⁹ cfu/día)	1 a 3	
Grupo D	5-FC (12,5 mg/ml)	1,2 ml (750 mg/kg/día)	4 a 24	8
	Sacárido	-	1 a 24	

Nota)*: Solución salina fisiológica administrada al grupo D en lugar de sacárido (maltosa o lactulosa).

(4) Medición del número de bacterias dentro del tumor

5 Se administró 5-FC por vía oral en el día final de observación de la prueba (Día 25) y en el día siguiente (Día 26), transcurrida 1 hora desde que fue sacrificado el ratón, se extirpó el tumor, se midió el peso (g) y luego se homogeneizó utilizando un diluyente anaerobio.

10 El número de bacterias dentro del tumor se calculó de la misma manera que en el Ejemplo 1, (3).

(5) Resultados

15 El volumen tumoral de ratones de cada grupo se midió cronológicamente y se expresó como un valor medio más/menos SD (desviación estándar). La relación de volumen tumoral [T/C (%)] en relación con el grupo de control se utilizó como criterio en la evaluación del efecto antitumoral.

20 Cambios en el volumen tumoral en el grupo de control (grupo A) y los grupos a los que se administraron bacterias (B. longum Re-105A/pBiflCD) y sacáridos en combinación y la tasa de crecimiento tumoral del volumen tumoral en el Día 25 en relación con el volumen tumoral en el Día 4, se indica en la Tabla 12.

Además, T/C (%) como el criterio para el efecto antitumoral se indica en la Tabla 13.

25 Mientras que el T/C del grupo sin uso de sacáridos (grupo D) en el Día 25 fue de 51,3 (%) (prueba t de Estudiante: p = 0,013), el T/C del grupo de uso combinado de maltosa (grupo B) fue 38,5 (%) (p = 0,003), y la T/C del grupo de uso combinado de lactulosa (grupo C) fue 35,0 (%) (p = 0,002), presentando así un efecto en la mejora de la supresión del crecimiento tumoral en ambos casos.

Tabla 12. Volumen tumoral (valor medio) y tasa de crecimiento tumoral

Grupo	Número de animales	Volumen tumoral (mm ³) (valor medio)								Tasa de crecimiento tumoral (%)
		Día 0	Día 4	Día 7	Día 11	Día 14	Día 18	Día 21	Día 25	
Grupo A	8	74,8 ± 8,5	150,9 ± 25,2	229,6 ± 45,1	358,1 ± 107,7	575,4 ± 161,0	864,1 ± 247,5	1222,3 ± 413,6	1906,1 ± 762,0	12,8
Grupo B	8	75,0 ± 8,7	119,0 ± 35,1	158,3 ± 61,7	224,4 ± 106,4	306,0 ± 129,0	412,4 ± 202,7	546,4 ± 322,5	734,6 ± 494,0	5,9
Grupo C	6*	75,4 ± 10,7	120,2 ± 43,8	165,6 ± 96,5	280,9 ± 213,4	370,0 ± 260,6	382,6 ± 267,2	451,1 ± 296,3	667,4 ± 292,9	5,6
Grupo D	8	73,7 ± 8,7	95,3 ± 21,2	119,7 ± 23,7	245,4 ± 70,6	331,8 ± 121,7	439,5 ± 213,9	620,2 ± 254,6	978,5 ± 505,1	10,1

Nota) * 2 de 8 ratones murieron durante la prueba.

Tabla 13. T/C (%)

Grupo	Número de animales	T/C (%)						Prueba t de Estudiante
		Día 7	Día 11	Día 14	Día 18	Día 21	Día 25	
Grupo A	8	-	-	-	-	-	-	
Grupo	8	68,9	62,7	53,2	47,7	44,7	38,5	P = 0,003

ES 2 686 080 T3

B								
Grupo C	6*	72,1	78,4	64,3	44,3	36,9	35,0	P = 0,002
Grupo D	8	52,1	68,5	57,7	50,9	50,7	51,3	P = 0,013

Nota) * 2 de 8 ratones murieron durante la prueba.

5 De los resultados de esta prueba, se puede confirmar que de la misma manera que la maltosa, la lactulosa también presenta un efecto en la promoción de la colonización específica de *B. longum* Re-105A/pBifiCD en el tejido tumoral y un efecto en la promoción de la proliferación y un efecto en el mantenimiento de la proliferación, y puede mejorar el efecto antitumoral de *B. longum* Re-105A/pBifiCD.

10 El vector de expresión de la presente invención puede proporcionar un transportador genético extremadamente seguro para introducir un microorganismo anaerobio y un gen exógeno con un uso terapéutico o profiláctico sin riesgo de transferencia horizontal a otros microorganismos patógenos o aeróbicos/facultativamente anaerobios tales como *E. coli*, e incluso si se produce una transferencia horizontal, el vector no se replicará en microorganismos distintos del transformante, puesto que el vector no comprende un origen de replicación de dicho otro microorganismo. Además, el potenciador de colonización y proliferación para el microorganismo transformado de la
 15 presente invención mejora el efecto terapéutico del microorganismo transformado de la presente invención, permitiendo la reducción de la dosificación del microorganismo transformado a la vez que proporciona un efecto terapéutico idéntico, con lo que reduce la carga del paciente a ser tratado. Además, el agente terapéutico de la presente invención que comprende en combinación una composición farmacéutica incluyendo el microorganismo anaerobio transformado y una composición farmacéutica que comprende el potenciador de colonización y
 20 proliferación tiene una utilidad como agente terapéutico para una enfermedad anaerobia, con un efecto terapéutico mejorado y reducción de la dosis efectiva requerida, así como una mayor seguridad tanto desde el punto de vista ambiental como terapéutico.

LISTADO DE SECUENCIAS

25 <110> Sasaki, Takayuki
 Simizu, Hitomi
 Shimatani-Shibata, Yuko
 Yonekura, Hiromi
 30 <120> Therapeutic Agent for Anaerobic Diseases
 <130> US Provisional Application No. 61/124,528
 <160> 1
 <170> PatentIn version 3.1
 <210> 1
 35 <211> 4476
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> plasmid pBifiCD
 40 <400> 1

ES 2 686 080 T3

agatccgtct tccctgctggc ctatgcattg ggttccgcag tgcccactcc aggcgggtctg 60
 ggcgggtgtgg aagcggcgct gacattcgcg ttcgtggcgg tcggagtgcc gcagggcgtg 120
 gcgctttccg ccaactttgct gcaccgcgtg gtgttctact ggctgcgcat tccgctgggc 180
 gcggcggcca tgaagtggct tgacaagcat aatcttgtct gattcgtcta tttcatacc 240
 cccttcgggg aatatagatgt 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
 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 cccaacgggtg aagcgttget 900
 ggaagaggcg ttacgcttag gggcagatgt agtggggcg attccgcatt ttgaatttac 960
 ccgtgaatac ggcgtggagt cgctgcataa aaccttcgcc ctggcgcaaa aatacgaccg 1020
 tctcatcgac gttcactgtg atgagatoga tgacgagcag tcgcgctttg tcgaaaccgt 1080
 tgctgcctg gcgcaccatg aaggcatggg cgcgcgagtc accgccagcc acaccacggc 1140

ES 2 686 080 T3

aatgcaactcc tataacgggg cgtatacctc acgcctgttc cgcttgctga aaatgtccgg 1200
tattaacttt gtcgccaacc cgctggtcaa tattcatctg caaggacggt tcgataccta 1260
tccaaaacgt cgcggcatca cgcgcgttaa agagatgctg gagtccggca ttaacgtctg 1320
ctttggtcac gatgctgtct tcgatccgtg gtatccgctg ggaacggcga atatgctgca 1380
agtgtgcat atggggctgc atgtttgcca gttgatgggc tacgggcaga ttaacgatgg 1440
cctgaattta atcaccacc acagcgaag gacgttgaat ttgcaggatt acggcattgc 1500
cgccgaaac agcgcacaacc tgattatcct gccggctgaa aatgggtttg atgcgctgcg 1560
ccgtcaggtt ccggtacggt attcggtagc tggcggcaag gtgattgcca gcacacaacc 1620
ggcacaacc accgtatatac tggagcagcc agaagccatc gattacaaac gttgaccttc 1680
tgctcgtagc gallacttcg agcattactg acgacaaaaga ccccgaccga gatggtcggg 1740
gtctttttgt tgtggtgctg tgacgtgttg tccaaccgta ttattccgga ctagtctctc 1800
aggacctcgt ctacgaggcg ctgagcgagg aatggcgcaa aaggacggc gagatcagcg 1860
acccatgggc caacgacgag gcggacggat accagccgc ctcatacagag ccggtcaacc 1920
ccgaacgcag gactccccag acgccctccg atggcctgat ctgacgtccg aaaaaggcg 1980
ctgtgcgccc ttttaaatc tttataaat cttttacat tcttttagcc cctccgcagc 2040
cttactctcc caacgggttt cagccgaaac ctacaccaa aggggagcga acctacacca 2100
aaaggggagc gaacctacac caaaagggga gcgaacctac accaaaaggg gagctatata 2160
cacctttgt tatttaaggt gcaagttgtg ctatgctgag gccatgtcca atgagatcgt 2220
gaagttcagc aaccagttca acaacgtcgc gctgaagaag ttcgacgccg tgcacctgga 2280
cgtgctcatg gcgatgcct caaggtgag ggagaagggc acggccacgg tggagttctc 2340
gttcgaggag ctgcgcgcc tcatgcgatt gaggaagaac ctgaccaaca agcagctggc 2400
cgacaagatc gtgcagacga acgcgcgct gctggcgctg aactacatgt tcgaggattc 2460
gggcaagatc atccagttcg cgctgttcac gaagttcgtc accgaccgc aggaggcgac 2520
tctcgcggtt ggggtcaacg aggagttcgc gttcctgctc aacgacctga ccagccagtt 2580
cacgccttc gagctggccg agttcggca cctcaagagc aagtacgcca aggagttcta 2640
ccgcagggcc aagcagtlacc gcagctccgg aatctggaag atcggccgcg acgagttctg 2700
ccgactgctt ggcgttcac cgctggcaat aaccagaca cgatatctga atcagaaggt 2760
tcttcagcca attcaggagg agtgtgggccc tctccttggc ctgaagatcg agcggcagta 2820
cgtgaaacgc aggtgtcgg gcttcgtgtt cacattcgc cgcgagacc ctccggtgat 2880
cgacgccagg cccgtggagg cgaggaagac ggacggcgac ggcaagggcc attggacgag 2940

ES 2 686 080 T3

cgttgccggg tacggcgagg tgttcacgac cacggcggtg ttcgacgtga cggccgcccg 3000
 ggctcacttc gacggcaccg ttgaagccgg ggagtgccgt tctgcgcgt ttgacgcgcg 3060
 caaccgcgaa catcatgcgc ggaacgcggg aaggctgttc tagcggccgt gtcgcgcct 3120
 ctggggcggg tgcgcctgcc atgggtcgat ctgccgctgt tcggcctcac gctggtctgt 3180
 gcgctgcctg atctccctga gcaggtcggc cttggtcctg ggggcgcttc gctcctcgaa 3240
 cgggcccgtc tccccagggt cctcgggctc gctcagggtcc aacggctcgt caccggacgg 3300
 ctccggccgg 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 tagaagcca atgaaatcta 3600
 taaataaact aaattaagtt tatttaatta acaactatgg atataaaata ggtactaact 3660
 aaaatagtga ggaggatata tttgaataca tacgaacaaa taataaagt gaaaaaaata 3720
 cttcggaaac atttaaaaaa taaccttatt ggtacttaca tgtttgatc aggagttgag 3780
 agtggactaa aaccaaatag tgatcttgac tttttagtcg tcgtatctga accattgaca 3840
 gatcaaagta aagaaatact tatacaaaaa attagacctt ttcacaaaaa aataggagat 3900
 aaaagcaact tacgatatat tgaattaaca attattatc agcaagaat ggtaccgtgg 3960
 aatcatcctc ccaaacaaga atttatztat ggagaatggt tacaagagct ttatgaacaa 4020
 ggatacatte ctcagaagga attaaattca gatttaacca taatgcttta ccaagcaaaa 4080
 cgaaaaata aaagaatata cggaaattat gacttagagg aattactacc tgatattcca 4140
 ttttctgatg tgagaagagc cattatggat tcgtcagagg aattaataga taattatcag 4200
 gatgatgaaa ccaactctat attaacttta tgccgatga ttttaactat ggacacgggt 4260
 aaaatcatac caaaagatat tgcgggaaat gcagtggtcg aatcttctcc attagaacat 4320
 agggagagaa ttttgttagc agttcgtagt tatcttgagc agaatattga atggactaat 4380
 gaaaatgtaa atttaactat aaactattta aataacagat taaaaaaatt ataaaaaat 4440
 tgaaaaaatg gtggaacac ttttttcaat tttttt 4476

REIVINDICACIONES

1. Un agente terapéutico para uso en el tratamiento de un tumor sólido, que comprende en combinación:
 5 una composición farmacéutica que comprende como componente activo un microorganismo anaerobio transformado por un vector plasmídico que comprende (1) una unidad de replicación de plásmido que actúa en el microorganismo anaerobio distinto de *E. coli*, y (2) una unidad de expresión de proteína que comprende un ADN que codifica a) una proteína que tiene una actividad antitumoral o b) una proteína que tiene una actividad de conversión de un precursor de sustancia antitumoral en una sustancia antitumoral y un fragmento de ADN que contiene un promotor y un terminador que actúa en el microorganismo anaerobio y que no comprende un origen de replicación de los otros
 10 microorganismos y una composición farmacéutica que comprende, como un componente activo, un intensificador de colonización y proliferación para el microorganismo anaerobio, en el que el microorganismo anaerobio se selecciona del grupo constituido por *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* y *Clostridium*.
2. El agente terapéutico para su uso según la reivindicación 1, donde el vector plasmídico consiste esencialmente
 15 en (1) una unidad de replicación de plásmido que actúa en un microorganismo anaerobio distinto de *E. coli*, y (2) una unidad de expresión de proteína que consiste esencialmente en ADN que codifica 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 y un fragmento de ADN que contiene un promotor y un terminador que actúa en el
 20 microorganismo anaerobio y que solo actúa en un microorganismo transformado distinto de *E. coli*.
3. El agente terapéutico para su uso de conformidad con la reivindicación 1 o 2, donde la proteína que tiene actividad terapéutica para una enfermedad que está en un entorno anaerobio es (b) una proteína que tiene una actividad de convertir un precursor de sustancia antitumoral en una sustancia antitumoral.
- 25 4. El agente terapéutico para su uso de conformidad con la reivindicación 1, en el que el microorganismo anaerobio es *Bifidobacterium*.
5. El agente terapéutico para su uso de conformidad con la reivindicación 4, en el que *Bifidobacterium* se selecciona desde el grupo constituido por *Bifidobacterium* (*B.*) *adolescentis*, *B. animalis*, *B. infantis*, *B. thermophilum*,
 30 *B. pseudolongum*, *B. bifidum*, *B. breve*, y *B. longum*.
6. El agente terapéutico para su uso de conformidad con la reivindicación 5, en el que *Bifidobacterium* es *B. longum*.
- 35 7. El agente terapéutico para su uso de conformidad con la reivindicación 3, en el que el microorganismo anaerobio transformado por el vector plasmídico es *B. longum* 105-A/pBifiCD (Número de Acceso de Depósito de Microorganismos de Patente (NPMD) NITE BP-491).
8. El agente terapéutico para su uso de conformidad con la reivindicación 3, donde la proteína que tiene una actividad de conversión de un precursor de sustancia antitumoral en una sustancia antitumoral se selecciona del
 40 grupo constituido por citosina desaminasa, nitrorreductasa y b-glucuronidasa.
9. El agente terapéutico para su uso de conformidad con la reivindicación 8, en el que la proteína que tiene una actividad de convertir un precursor de sustancia antitumoral en una sustancia antitumoral es la citosina desaminasa.
- 45 10. El agente terapéutico para su uso de conformidad con la reivindicación 1, en el que el potenciador de colonización y proliferación es al menos uno seleccionado del grupo constituido por arabinosa, xilosa, galactosa, glucosa, maltosa, lactosa, melibiosa, melecitosa, rafinosa y lactulosa.
- 50 11. El agente terapéutico para su uso de conformidad con la reivindicación 10, en el que el potenciador de colonización y proliferación es glucosa o maltosa.
12. El agente terapéutico para su uso de conformidad con la reivindicación 11, en el que el potenciador de colonización y proliferación es maltosa.
- 55 13. El agente terapéutico para su uso de conformidad con la reivindicación 3, que comprende además una composición farmacéutica que comprende como componente activo un precursor de sustancia antitumoral que se convierte en una sustancia antitumoral por (b) una proteína que tiene una actividad de convertir el precursor de sustancia antitumoral en una sustancia antitumoral.
- 60 14. El agente terapéutico para su uso de conformidad con la reivindicación 13, en el que el precursor de sustancia antitumoral es 5-fluorocitosina.
- 65 15. El agente terapéutico para su uso de conformidad con la reivindicación 4, en el que la unidad de replicación del plásmido es una unidad de replicación de pTB6 que comprende una región de OriV y un gen RepB que actúa en *Bifidobacterium*.

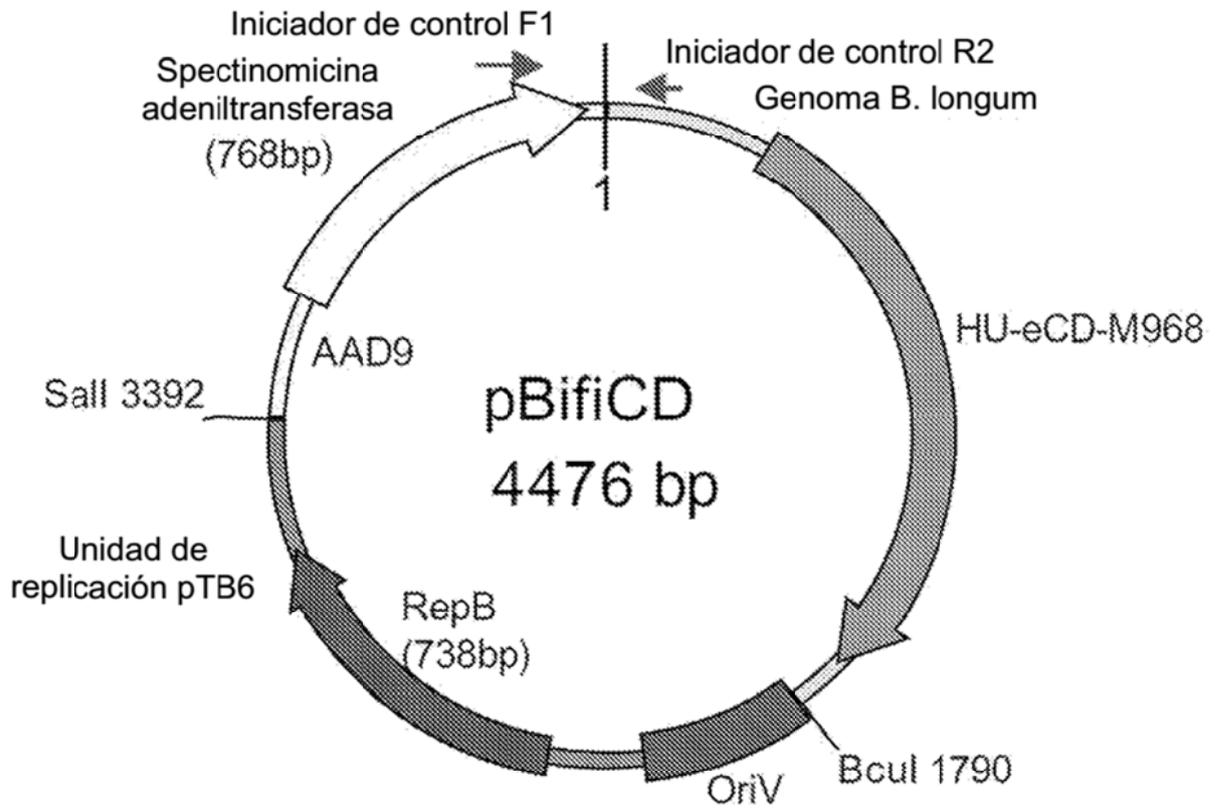


Fig.1

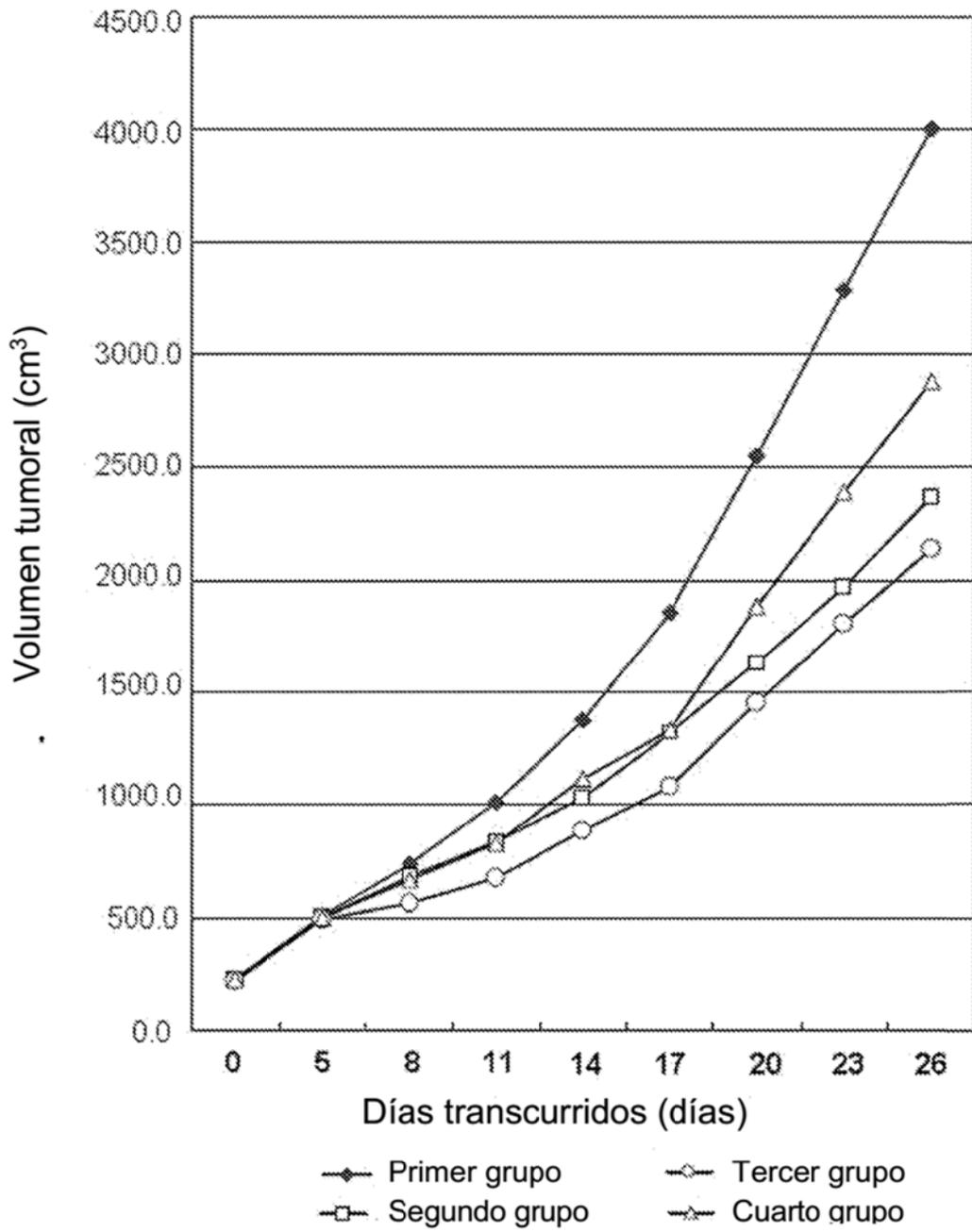


Fig.2