

(12) **SOLICITUD de PATENTE**

(43) Fecha de publicación: 09/10/2008 (51) Int. Cl: C12N 15/00 (2006.01)
(22) Fecha de presentación: 23/05/2006 C12N 15/09 (2006.01)
(21) Número de solicitud: NL06000035

(71) Solicitante:
INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACION
CIENTIFICA Y TECNOLOGICA, A.C.
Camino a la Presa San Jose 2055 78126 SAN LUIS
POTOSI San Luis Potosí MX

(72) Inventor(es):
ANTONIO DE LEON RODRIGUEZ
Rincon de los Sauces 156-A SAN LUIS POTOSI San
Luis Potosí 78210 MX
MARIA DE LOURDES REYES ESCOGIDO
ANA PAULINA BARBA DE LA ROSA

(74) Representante:
DAVID RIOS JARA
Camino a la Presa San Jose 2055 SAN LUIS POTOSI
San Luis Potosí 78126 MX

(54) Título: PLASMIDO PLR PARA EXPRESION DE PROTEINAS RECOMBINANTES EN BACTERIAS DEL GENERO BIFIDOBACTERIUM.

(54) Title: PLR PLASMID FOR EXPRESSING RECOMBINANT PROTEINS IN BACTERIA OF THE GENUS BIFIDOBACTERIUM.

(57) Resumen

La presente invención se refiere a la construcción y uso de un vector de expresión para el género Bifidobacterium. Particularmente se refiere plásmido pLR-hIL-10 en el cual se incluyeron un promotor, un terminador y un péptido señal BIF3, además del gen que codifica para la interleucina-10 humana. Se usa Bifidobacterium longum, como vehículo para la IL-10, debido a las ventajas que ofrece sobre otros sistemas de expresión como E. coli, entre las que destacan la ausencia de lipopolisacáridos de superficie que son causantes de patogenicidad y el contar de eficientes sistemas de exporte de proteínas hacia el medio extracelular. La IL-10, es una proteína que ayuda al tratamiento de enfermedades inflamatorias, como son: colitis ulcerosa, mieloma múltiple, melanoma, linfoma no-Hodking's, enfermedad de crhon, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, lupus eritematoso, psoriasis, dermatitis atópica, asma, entre otras. El resultado es un producto que puede utilizarse para la producción de proteínas recombinantes para aplicación terapéutica y biotecnológica. Por otro lado, este vector puede ser utilizado para la producción de proteínas inestables debido a que la misma bacteria podría funcionar como vehículo para dirigir la proteína al sitio en que se requiere su acción, sin ser necesario pasar por un proceso de purificación de proteínas.

(57) Abstract

The present invention refers to the construction and use of an expression vector for the genus Bifidobacterium. The invention mainly refers to a pLR-hIL-10 plasmid, wherein a promoter, a terminator and a BIF3 signal peptide are included, as well as a gene that codifies for the human interleukin-10. Bifidobacterium longum is used as a vehicle for IL-10 due to the advantages offered over further expression systems like E.coli, amongst which are the absence of surface lipopolysaccharides which are know to be the cause of pathogenicity, and the presence of efficient systems for exporting proteins to the extracellular medium. The IL-10, is a protein useful for treating inflammatory diseases such as: ulcerative colitis, multiple myeloma, melanoma, no-Hodgkin's lymphoma, Crohn's disease, rheumatoid arthritis, multiple sclerosis, lupus eritematous, psoriasis, atopic dermatitis, asthma, amongst others. The result is a product useful for the production of recombinant proteins to be therapeutically and biotechnologically applied. The inventive vector may be used for producing unstable proteins since the same bacterium may work as a vehicle for leading proteins to the place where the action thereof is required, without being subjected to a protein purification process.

PLÁSMIDO PLR PARA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EN BACTERIAS DEL GÉNERO BIFIDOBACTERIUM

5 OBJETO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a la construcción del plásmido pLR y su uso como vector de expresión de proteínas recombinantes en bacterias del género *Bifidobacterium*. En el vector de expresión se incluyeron: un promotor, un
10 terminador y un péptido señal, además del gen sintético que codifica para la interleucina-10 humana, que puede ser utilizada como terapia en el tratamiento de enfermedades inflamatorias entre ellas la colitis ulcerosa, mieloma múltiple, melanoma, linfoma no-Hodking's, enfermedad de crhon, artritis reumateide, esclerosis múltiple, lupus eritematoso, psoriasis, dermatitis atópica, asma y para
15 terapias génicas dirigidas contra tumores sólidos, especialmente contra tumores cancerosos.

El resultado es un producto que puede ser utilizado para la producción de
proteínas recombinantes para aplicación terapéutica y biotecnológicas. Por otro
20 lado, este vector puede ser utilizado para la producción de proteínas inestables debido a que la misma bacteria podría funcionar como vehículo para dirigir la proteína al sitio en que se requiere su acción, sin ser necesario pasar por un proceso de purificación de proteínas.

25

ANTECEDENTES

La tecnología del ADN de bifidobacterias, se ha desarrollado muy poco en relación con otros microorganismos de interés industrial o médico. Estudios previos,
30 demostraron que *Bifidobacterium* es capaz de colonizar superficies tumorales después de ser administrada por vía sistémica en ratas (Yazawa K, Fujimori M, Nakamura T, Sasaki T, Amano J, Kano Y, and Taniguchi S. 2001. *Bifidobacterium*

longum as a delivery system for gene therapy of chemically induced rat mammary tumors. *Breast Cancer Research and Treatment*. 66: 165-170).

A partir de dichos reportes se propuso el género *Bifidobacterium* como un vehículo
5 para terapias génicas dirigidas contra cáncer (Fujimori M., Amano J., and
Taniguchi S. 2002. The genus *Bifidobacterium* for cancer gene therapy. *Current
opinion in Drug Discovery and Development*. 5: 200-203; Theys J., Barbé S.,
Landuyt S., Nuyts L., Mellaert V., Wouters B., Anné J., and Lambin P. 2003. Tumor
specific gene delivery using genetically engineered bacteria. *Current Gene*
10 *Therapy*. 3: 207-221).

Desde entonces, el desarrollo en la tecnología del ADN recombinante de
bifidobacterias ha sido muy lento, lo que se debe principalmente a la falta de
vectores estables.

15

Sin embargo, existen trabajos en los cuales se ha reportado con éxito la expresión
de proteínas heterólogas en algunas especies del género *Bifidobacterium* como
son: la citosina deaminasa en *B. longum* Nakamura T, Sasaki T, Fujimori M,
Yazawa K, Kano Y, Amano J, and Taniguchi S., 2002. Cloned cytosine deaminase
20 gene expression of *Bifidobacterium longum* and application to enzyme/pro-drug
therapy of hypoxic solid tumors. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. 66:
2362-2366), endostantina en *B. adolescentis* (Li X, Fu GF, Fan YR, Liu WH, Liu
XJ, Wang JJ, and Xu GX. 2003. *Bifidobacterium adolescentis* as a delivery system
of endostatin for cancer gene therapy: Selective inhibitor of angiogenesis and
25 hypoxic tumor growth. *Cancer Gene Therapy*. 10: 105-111) y *B. longum* (Fu GF, Li
X, Hou YY, Fan YR, Liu WH, and Xu GX. 2005. *Bifidobacterium longum* as an oral
delivery system of endostatine for gene therapy on solid liver cancer. *Cancer Gene
Therapy*. 12: 133-140); Pediocina PA-1 en *B. longum* (Moon GS, Pyun YR, Park
MS, Ji GE, and Kim WY. 2005. Secretion of recombinant pediocin PA-1 by
30 *Bifidobacterium longum*, using the signal sequence for bifidobacterial α -amylase.

Applied and Environmental Microbiology. 71: 5630-5632); citosina deaminasa/5-fluorocitosina en *B. infantis* (Yi C, Huang Y, Guo ZY, and Wang S. 2005. Antitumor effect of cytosine deaminase/5-fluorocytosine suicide gene therapy system mediated by *Bifidobacterium infantis* on melanoma. Acta Pharmacologica Sinica. 26: 629-634).

Los estudios en ratas, que presentan alguna alteración en el gen que codifica para la interleucina-10, han mostrado que desarrollan colitis ulcerosa, y un posible tratamiento para esta enfermedad es la administración de interleucina-10 (Khun R, Lohler J, Rennick D, Rajewsky K, Muller W. 1993. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. Cell. 75:263-74. Comment in: Cell. 1993. 75(2):203-205).

Sin embargo, se presentan algunos problemas tanto para la producción como para la administración de esta proteína, entre los que destacan los efectos colaterales al administrarse por vía sistémica, por su gran sensibilidad al pH ácido y su alta inestabilidad después de ser producida. Por lo que una opción, con un importante potencial, puede ser el uso de *Bifidobacterium*, como un vehículo de la misma e incluso de otras proteínas inestables, debido a que podrían ser producidas en el sitio en el cual es requerida su acción, sin que esto afecte a otros sitios adyacentes, ya que su producción y acción se llevaría a cabo solamente en el sitio afectado. Esta es una opción para el uso de *Bifidobacterium* directamente como vacuna oral y aunque se requiere de más estudios para hacerlo, no se descarta esta posibilidad.

25

Es importante mencionar que actualmente, la producción de muchas proteínas ha sido posible gracias a la tecnología del ADN recombinante, y uno de los sistemas más utilizados con este fin es la bacteria *Escherichia coli*.

Las proteínas recombinantes producidas en *E. coli* no cruzan la membrana externa, y por lo tanto, el producto debe ser purificado a partir del citoplasma o del espacio periplásmico. La purificación de proteínas de estos espacios puede ser algo difícil. Los problemas más frecuentes con este sistema incluyen la
5 contaminación con material celular que puede ser tóxico (endotoxinas) y la formación de grandes cantidades de cadenas de polipéptidos formando agregados que se conocen como cuerpos de inclusión.

Debido a estos problemas en la purificación del producto, la atención se ha dirigido
10 a la habilidad natural de bacterias Gram-positivas (*Bifidobacterium* entre ellas) para exportar proteínas gracias a las propiedades de su pared celular. A pesar de los beneficios que ofrecen las bacterias Gram-positivas, poco se conoce sobre sus propiedades genéticas, a comparación con *E. coli*. Sin embargo han llegado a ser reconocidos como candidatos favorables para la producción de proteínas
15 recombinantes entre las cuales se encontrarían principalmente aquellas que se adicionan directamente a alimentos y aquellas que van dirigidas a vacunas orales.

Además de los antecedentes bibliográficos anteriores, existen patentes sobre este tema que citamos a continuación:

20 La solicitud de patente de los Estados Unidos N° 20050025745, se refiere a la obtención de un vector de expresión para bacterias del género *Bifidobacterium* propuesto para expresión de proteínas con actividad anticancerígena. Esta solicitud, propone el género *Bifidobacterium* como vehículo para terapia génica
25 dirigida hacia tumores. Este trabajo difiere de la presente invención en que el vector de expresión está basado en un plásmido diferente, además del péptido señal incluido en el presente invento, el cual fue identificado previamente en una β -galactosidasa, no ha sido utilizado en otros trabajos.

La patente N° 6,887,702 de los Estados Unidos, muestra la construcción de un vector de expresión capaz de replicarse en *E. coli* y *Bifidobacterium* usando un vector originado de *Bifidobacterium* y uno originado de *E. coli*. Difiere del presente invento en que el vector originado de *Bifidobacterium* para realizar nuestra
5 construcción es diferente, además de que en la patente citada no se usó para expresión de proteínas.

La solicitud de patente N° 20030186386 de los Estados Unidos, se refiere al desarrollo de nuevos péptidos con actividad semejante a la de la interleucina -10
10 con función antiinflamatoria principalmente, es diferente del presente invento debido a que en éste, el gen IL-10 se optimizó cambiando algunos nucleótidos, pero sin cambiar los aminoácidos lo cual se muestra en las secuencias 1 y 2, la secuencia 1 es la del gen nativo, la secuencia 2 es la del gen sintético, el
alineamiento entre ambas secuencias muestra una homología del 82%. La
15 optimización del gen se realizó con la finalidad de que la producción de IL-10 por
Bifidobacterium sea más eficiente. Algunos cambios en condones para mejorar la
producción de interleucina pueden considerarse. En el caso de la presente
invención, no hubo cambio alguno de péptidos como en el de la patente
mencionada.

20

Por otro lado la patente de los Estados Unidos 6,936,586,, se refiere al uso de agonistas de IL-10, en la cual desarrollaron nonapéptidos homólogos a IL-10 con actividad semejante a esta proteína.

25

La patente de los Estados Unidos N° 5,776,451 se refiere a un método para el uso de interleucina-10 en inmunoterapia de cáncer. Para esto, administran linfocitos infiltrantes a pacientes de cáncer los cuales se expanden al administrar interleucinas 2 y 10 potenciando la toxicidad de los linfocitos hacia las células tumorales reduciendo los efectos sobre células no tumorales. No es una patente
30 que se refiera a la producción de IL-10 sino a su aplicación.

Las patentes de los Estados Unidos N° 6,410,008 y 6,403,077, se refieren al uso de proteínas quiméricas y al aumento de la vida media de la IL-10 al fusionarla a un polipéptido el cual es enzimáticamente inactivo en el humano. Lo cual
5 proporciona estabilidad a la proteína por más tiempo.

La solicitud de patente N° 20040014221 de los Estados Unidos, se refiere a la construcción de un vector de expresión el cual está basado en el plásmido de *Bifidobacterium* pMG1. El vector de la presente invención se basa en el plásmido
10 pMB1. Ambas invenciones están dirigidas a vectores grado alimenticio que puedan ser utilizados en alimentos de manera segura. Aunque el vector de expresión del presente invento, también está destinado a la aplicación industrial para la obtención de proteínas terapéuticas a gran escala.

15 La solicitud de patente de los Estados Unidos N° 20050025745, se refiere al uso de la bacteria *Bifidobacterium* como un vehículo para dirigir prodrogas hacia tumores, debido a la disminución de la tensión de oxígeno en las células tumorales lo cual crea un ambiente apto para la colonización y crecimiento de la bacteria gracias a su carácter anaerobio. Se incluyó un ADN que codifica para una proteína
20 que convierte un precursor de una sustancia antitumoral a su forma activa, causando la muerte de las células tumorales. El plásmido aislado de *Bifidobacterium* en base al cual se construyó el vector de expresión es el pTB6, el promotor y terminador empleados en esta invención al igual que en el presente invento son el promotor y terminador HU. El marcador de selección para
25 *Bifidobacterium* es diferente, y el sitio de expresión también, ya que la invención de esta solicitud de patente está destinada a la expresión de la proteína *in vivo* e *in situ*. Nuestra invención puede destinarse a este uso, pero también se puede utilizar como un sistema de producción de proteínas terapéuticas a escala industrial.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 muestra una ilustración del plásmido pDG7. La línea rayada es el replicón para *Bifidobacterium*, proveniente del plásmido pMB1. Amp^R, representa el gen de resistencia a ampicilina, Cal^R, representa el gen de resistencia a cloranfenicol y Ori, es el origen de replicación para *E. coli*.

La Figura 2 es una ilustración del plásmido pLR, conteniendo el promotor HU y el gen IL-10 fusionado al péptido BIF3. La línea rayada es el replicón para *Bifidobacterium* derivado del plásmido pMB1, la flecha negra es el gen IL-10, la línea localizada upstream del gen IL-10 pertenece al péptido señal BIF3, la línea localizada río arriba del péptido señal es la secuencia que corresponde al promotor HU y la línea localizada río abajo del gen IL-10 corresponde al terminador HU. Amp^R representa el gen de resistencia a ampicilina, Cal^R representa el gen de resistencia a cloranfenicol y Ori representa un origen de replicación.

La Figura 3 muestra el análisis de predicción de el probable sitio de corte entre el péptido señal BIF3 y el gen sintético, IL-10, mostrando que la posición en la cual se realiza el corte es entre la 32 y 33, reconociendo el péptido como un péptido señal.

La Figura 4 muestra el análisis de predicción del péptido señal, y los resultados nos dicen que la probabilidad de que sea un péptido señal es del 100%.

La Figura 5 muestra el proceso para la construcción del vector pLR-hIL-10 en el cual se integró el gen IL-10 sintético. Este vector se utiliza como vector de expresión para *Bifidobacterium longum*.

La Figura 6 es el análisis de Western Blot de IL-10 recombinante expresada por *B. longum*. El carril 1 muestra el control positivo, la banda presenta un tamaño de 18.6 kDa, carriles 2 y 3 IL-10 recombinante producida por *Bifidobacterium longum*, carril 4, es el control negativo y en el carril 5 se encuentra el marcador de peso, cuya banda mostrada corresponde a 18.4 kDa.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

10 La presente invención propone la construcción y uso de un vector de expresión para bacterias del género *Bifidobacterium*. Particularmente, la invención se refiere al plásmido pLR-hIL-10, el cual se compone de la siguiente manera: de un promotor, el cual será el iniciador de la síntesis de la proteína, un terminador que detenga la transcripción, y por último se incluye un péptido señal, al cual se
15 fusionó el gen sintético que codifica para la Interleucina 10 (IL-10), proteína que ayuda al tratamiento de enfermedades inflamatorias, como son: colitis ulcerosa, mieloma múltiple, melanoma, linfoma no-Hodking's, enfermedad de crhon, artritis reumate, esclerosis múltiple, lupus eritematoso, psoriasis, dermatitis atópica, asma, entre otras. El gen que codifica para la Interleucina-10 humana fue
20 optimizado y fusionado con el péptido señal BIF3, este péptido señal había sido identificado previamente en una β -galactosidasa exportada por *Bifidobacterium bifidum* (Moller PL, Jorgensen F, Hansen OC, Madsen SM, and Stougaard P. 2001. Intra and extracellular β -galactosidasas from *Bifidobacterium bifidum* and *B. infantis*: Molecular cloning, heterologous expression, and comparative
25 characterization. Applied and Environmental Microbiology. 67: 2276-2283). Se incluyeron un promotor y un terminador de la transcripción, ambos pertenecientes al gen HU que codifica para una proteína de unión semejante a una histona (Goshima N, Kano Y, and Imamoto F. 1990. Characterization of HU-like protein from *Bifidobacterium longum*. Biochimie. 72(4): 207-212). Se incluyeron también
30 los sitios de corte Sal I y Nco I en el extremo 5', Eco 47 III entre el péptido señal y

el gen IL-10 y los sitios Sma I y Sph I en el extremo 3'. El codón de inicio, ATG, se encuentra al inicio de la secuencia del péptido señal, y el codón de paro TGA, se encuentra al término de la secuencia del gen IL-10. La secuencia final presenta un tamaño de 796 pb, y ésta fue sintetizada por Entelechon, the synthetic genes company. (Regensburg, Germany) y clonada dentro del vector pDG7 en el sitio de clonación Eco RI, obteniendo un tamaño total del vector de expresión de 8.0 kb, a esta construcción se le dio el nombre de pLR-hIL-10 (Figura 1).

El vector pDG7 presenta pocos sitios de clonación, Eco RV, Hind III, Cla I y Eco RI. Al sintetizar la secuencia previamente mencionada, la compañía a cargo de la síntesis envía la secuencia dentro del vector PCR 2, clonada con los sitios Eco RI, por lo cual se aprovechan estos sitios para sacar la secuencia y clonarla dentro del vector pDG7. Este vector presenta los genes de resistencia a ampicilina y a cloranfenicol, los cuales son utilizados para seleccionar *E. coli* y *B. longum* respectivamente.

La transformación de *E. coli* se realizó por medio de choque térmico mientras que la de *B. longum* ATCC15707 fue mediante electroporación utilizando un protocolo previamente reportado, (Argnani A, Leer RJ, Luijk N, and Pouwels PH, 1996. A convenient and reproducible method to genetically transform bacteria of the genus *Bifidobacterium*. Microbiology. 142: 109-114) pero modificado, ya que el buffer de electroporación que usamos fue sacarosa entre 0.3 y 0.6 M preferentemente 0.5M en lugar de sacarosa 0.5M con citrato de amonio 1mM a pH 6. Las condiciones de electroporación fueron de 2 a 2.5 kV, 200 a 400 ohms, 25 µF y de 4-5 milisegundos. Después de la electroporación, las células se recuperaron agregando 800 µl de medio MRS conteniendo 0.05% de L-cisteína, e incubando de 2.5 a 3 horas a 37°C. Después de esto, se extendieron sobre agar MRS suplementado con 0.05% de L-cisteína y 7.5 µgml⁻¹ de cloranfenicol, que fue el antibiótico utilizado como marcador de selección de bacterias transformadas,

finalmente las placas se incubaron de 3 a 4 días a 37°C, en condiciones de anaerobiosis utilizando el sistema anaerobio gas pack (BBL, USA).

Para confirmar la presencia de pLR-hIL-10 dentro de *Bifidobacterium*
5 *longum* ATCC15707, se seleccionaron algunas colonias y se inocularon en medio MRS suplementado con L-cisteína y cloranfenicol a las concentraciones ya mencionadas, y éstas se incubaron a 37°C, durante 48 horas en condiciones de anaerobiosis. Posteriormente, el plásmido fue extraído de la bacteria utilizando el kit comercial qiagen para purificación de plásmidos, pero modificado para
10 *Bifidobacterium*, agregando lisozima a una concentración de 20 a 50 mgml⁻¹, preferentemente 30 mgml⁻¹ e incubando a 37°C durante 1h. La presencia del gen dentro del plásmido se confirmó mediante la técnica de PCR.

Las bacterias del género *Bifidobacterium* fueron elegidas como huésped de
15 este vector de expresión, para ser usadas como vehículo para proteínas que se produzcan en el sitio en el cual se requiere su acción, sin que esto afecte a otros sitios adyacentes. Por otro lado, si éste género de bacterias se considera solo como un sistema de producción de la proteína, también ofrece algunas ventajas debido principalmente a su carácter como Gram-positiva y su sistema de
20 transporte de proteínas al medio extracelular.

Las proteínas exportadas por bacterias Gram-positivas cruzan la membrana citoplásmica y se pueden encontrar ya sea en el medio extracelular, o ancladas a la membrana de la pared celular.

25

La estrategia básica para dirigir la secreción de proteínas en sistemas de expresión Gram-positivos, involucra la fusión de proteínas con secuencias señal en el extremo N-terminal. Por lo tanto, en la construcción de este vector de expresión, el péptido señal que se incluye, fue previamente identificado en una
30 proteína exportada por *Bifidobacterium bifidum*, y ésta es una β -galactosidasa, en

la cual se caracterizó e identificó el péptido señal que dirige la exportación de la proteína hacia el medio extracelular. Dicho péptido señal fue identificado utilizando el software disponible en línea Signal-P 3 server, el cual está disponible en Internet en la dirección <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/> especial para 5 identificar posibles péptidos líder así como los sitios de corte. La tabla 1 es un resultado de este análisis.

Tabla 1

Medida	Posición	Valor	Corta	¿Péptido señal?
Max. C	33	0.703	0.52	SI
Max. Y	33	0.742	0.32	SI
Max. S:	24	0.994	0.97	SI
media S	1-32	0.852	0.51	SI
D	1-32	0.797	0.45	SI

15 Sitio de corte entre las posiciones 32 y 33: AWA-SP

Predicción: Péptido señal

Probabilidad de que sea péptido señal: 1.000

Probabilidad de que se realice el corte: 0.999 entre la posición 32 y 33

20 Este análisis predice un posible péptido señal así como el sitio y probabilidad de que se lleve a cabo el corte entre este péptido señal y el gen IL-10.

25 Los sistemas de secreción Gram-positivos proporcionan algunas ventajas sobre los sistemas tradicionales basados en *E. coli*. Una de ellas es que la proteína conserva su conformación nativa, por lo que se pueden establecer protocolos de purificación basados en las propiedades funcionales de la proteína activa.

30 La pared celular de las bacterias Gram-positivas es un organelo complejo, ensamblado por peptidoglicanos, carbohidratos y proteínas con propiedades

biológicas diferentes. Las bacterias Gram-positivas a diferencia de las Gram-negativas, carecen de lipopolisacáridos los cuales son endotoxinas responsables de síntomas patológicos propiciados por patógenos Gram-negativos, entre ellos: pirogenicidad, hipotensión, choque letal por fallo cardiaco, actividad necrótica en tejidos, entre otros.

Una condición para la explotación comercial de la tecnología del ADN recombinante en la manufactura de cultivos genéticamente modificados, es que cada cultivo podría ser reconocido como seguro por el consumidor de alimentos que contienen bacterias recombinantes vivas.

Un riesgo potencial, que puede ser asociado con la ingestión de bacterias recombinantes vivas, es la transferencia de información genética no deseada a la microflora gastro-intestinal. Este riesgo puede disminuir tomando en cuenta algunas consideraciones como son: el uso de plásmidos específicos para la bacteria que se va a transformar, el ADN insertado se localiza en un vector de clonación que no se replica en especies diferentes a las de interés y por último, el ADN insertado en la bacteria no codifica para rasgos fenotípicos que se puedan conferir a otras bacterias.

Por lo que podemos mencionar que este sistema puede ser utilizado para la sobreproducción de proteínas recombinantes que tienen una aplicación terapéutica y biotecnológica. Así mismo la proteína expresada puede ser utilizada para la preparación de vacunas orales o sistémicas. Por otro lado, otra ventaja potencial es la posibilidad de potenciar el carácter probiótico mediante el uso de vectores de expresión.

LISTADO DE SECUENCIAS**Secuencia del gen IL-10 nativo**

5

Secuencia 1

AGCCCAGGCCAGGGCACCCAGTCTGAGAACAGCTGCACCCACTTCCCAGGCAACCTGCCTAA
 CATGCTTCGAGATCTCCGAGATGCCTTCAGCAGAGTGAAGACTTTCTTTCAAATGAAGGATCAG
 10 CTGGACAACCTTGTTGTTAAAGGAGTCCTTGCTGGAGGACTTTAAGGGTTACCTGGGTTGCCAA
 GCCTTGTCTGAGATGATCCAGTTTTACCTGGAGGAGGTGATGCCCAAGCTGAGAACCAAGAC
 CCAGACATCAAGGCGCATGTGAACTCCCTGGGGGAGAACCTGAAGACCCTCAGGCTGAGGCT
 ACGGCGCTGTCATCGATTTCTCCCTGTGAAAACAAGAGCAAGGCCGTGGAGCAGGTGAAGA
 ATGCCTTTAATAAGCTCCAAGAGAAAAGGCATCTACAAAGCCATGAGTGAGTTTGACATCTTCAT
 15 CAACTACATAGAAGCCTACATGACAATGAAGATACGAAACTGA

Secuencia del gen IL-10 sintético

20

Secuencia 2

TCGCCGGGCCAGGGCACGCAGAGCGAAAACAGCTGCACCCACTTCCGGGCAACCTGCCGA
 ACATGCTGCGCGACCTGCGCGATGCCTTCAGCCGCGTGAAGACCTTCTTCCAGATGAAGGAC
 25 CAGCTGGACAACCTGCTGCTGAAGGAGTCCCTGCTGGAAGATTTCAAGGGCTACCTGGGCTG
 CCAGGCGCTGAGCGAGATGATCCAGTTCTACCTGGAAGAGGTGATGCCGCAGGCGGAAAACC
 AGGACCCGGATATCAAGGCGCACGTGAACAGCCTGGGCGAAAACCTGAAGACGCTGCGCCTG
 CGCCTGCGCCGCTGCCATCGCTTCTGCGGTGCGAGAACAAAAGCAAAGCCGTGCAACAGGT
 GAAGAACGCCTTCAACAAGCTGCAGGAGAAAAGGCATCTATAAAGCCATGAGCGAGTTGACAT
 30 CTTTCATCAACTACATCGAGGCGTACATGACCATGAAAATCCGCAACTGA

35

**Alineamiento de secuencias de los genes nativo y sintético de IL-10
mediante el software CLUSTALW (La homología entre estas dos secuencias
es del 82%)**

```

5  1. Gen nativo   AGCCCAAGCCAGGGCACCCAGTCTGAGAACAGCTGCACCCACTTCCCAGGCAACCTGCCT 60
   2. Gen sintético TCGCCGGGCCAGGGCACCCAGAGCGAAAACAGCTGCACCCACTTTCCGGGCAACCTGCCG 60
      ** ***** ** * ** ***** ** ***** ** ***** **
      *

10  1. Gen nativo   AACATGCTTCGAGA T CTCCGAGATGCCTTCAGCAGAGTGAAGACTTTCTTTCAAATGAAG 120
   2. Gen sintético AACATGCTTCGCGACCTGCGCGATGCGTTCAAGCCCGTGAAGACCTTCTTCCAGATGAAG 120
      ***** ** ** ** * ***** * ***** ***** ** *****
      *

15  1. Gen nativo   GATCAGCTGGACAACCTTGTG TTAAGGAGTCCTTGCTGGAGGACTTTAAGGTTACCTG 180
   2. Gen sintético GACCAGCTGGACAACCTGCTGCTGAGGAGTCCCTGCTGGAAGATTCAAGGGCTACCTG 180
      ** ***** ** ** * ***** ***** ** ** ***** *****
      *

20  1. Gen nativo   GGTGCCAAGC CTGTCT GAGATGATCCAGTTTACCTGGAGGAGGTGATGCCCAAGCT 240
   2. Gen sintético GGCTGCCAGGCGCTGAGCGAGATGATCCAGTTTACCTGGAAGAGGTGATGCCCGAGGCG 240
      ** ***** ** ** ***** ***** ***** ***** ** **
      *

25  1. Gen nativo   GAGAACCAAGACCCAGACATCAAGGCGCATGTGAACTCCCTGGGGAGAACCTGAAGACC 300
   2. Gen sintético GAAAACCAAGACCCGGATATCAAGGCGCACGTGAACAGCCTGGGCGAAACCTGAAGACC 300
      ** ***** ***** ** ***** ***** ***** ***** ** *****
      *

30  1. Gen nativo   CTCAGGCTGAGGCTACGGCGCTGTATCGATTT CTTCCTGTGAA AACAAGAGCAAGGCC 360
   2. Gen sintético CTGCGCTGCGCCTGCGCGCTGCCATGCGTTCTCTGCGGTCCGAGAACAAAAGCAAGCC 360
      ** * ** * ** ** ***** ***** ** ** ** ** ** ** ** ** ***** ***** **
      *

35  1. Gen nativo   GTGGAGCAGGTGAAGAAATGCCCTTAAATAAGCT CCAAGAGAAAGGCATCTACAAAGCCATG 420
   2. Gen sintético GTCGAACAGGTGAAGAACGCCCTTCAACAAGCTGCAGGAGAAAGGCATCTATAAAGCCATG 420
      ** ** ***** ***** ***** ** ***** ** ***** ***** *****
      *

40  1. Gen nativo   AGTGAGTTTGACAT CT TCATCAACTACA TAGAAGC CTACATGACAATGAAGATACGAAAC 480
   2. Gen sintético AGCGAGTTTCGACAT CT TCATCAACTACA TCGAGGCGTACATGACCATGAAAATCCGCAAC 480
      ** ***** ***** ***** ***** ** ** ***** ***** ** ** **
      *

45  1. Gen nativo   TGA 483
   2. Gen sintético TGA 483
      ...

```

REIVINDICACIONES

1. Un plásmido pLR como vector de expresión para bacterias del género *Bifidobacterium*, caracterizado porque consiste esencialmente en:

5

a) Un promotor, que inicia la síntesis de proteínas, entre ellas la Interleucina-10 humana, este promotor pertenece al gen HU.

10

b) Un terminador, que detenga la transcripción, el cual también pertenece al gen HU.

c) Los sitios de corte Sal I y Nco I en el extremo 5'.

d) El sitio de corte Eco 47III entre el péptido líder y el gen IL-10

15

e) Los sitios de corte Sma I y Sph I en el extremo 3'.

f) Un péptido señal BIF3, para exportar la proteína al medio extracelular.

20

2. Un plásmido pLR como vector de expresión para bacterias del género *Bifidobacterium*, según la reivindicación 1, caracterizado porque el plásmido contiene el gen que se codifica para la Interleucina-10 humana, que ha sido optimizado y fusionado con el péptido señal BIF3, y esta construcción recibe el nombre del pLR-hIL-10.

25

3. Un plásmido pLR como vector de expresión para bacterias del género *Bifidobacterium*, según las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado porque contiene el codón de inicio ATG, que se encuentra al inicio de la secuencia del péptido

señal, y el codón de paro TGA, que se encuentra al término de la secuencia del gen IL-10.

4. Un plásmido pLR como vector de expresión para bacterias del género *Bifidobacterium*, según las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado porque la bacteria huésped del plásmido pLR, es de la especie *Bifidobacterium longum*, perteneciente a la cepa ATTC15707.
5. Un plásmido pLR como vector de expresión para bacterias del género *Bifidobacterium*, según la reivindicación 1, caracterizado porque el péptido señal BIF3, fue identificado en una proteína β -galatosidasa, exportada por *Bifidobacterium bifidum*.
6. Un plásmido pLR como vector de expresión para bacterias del género *Bifidobacterium*, según la reivindicación 1, caracterizado porque el plásmido pLR-hIL-10 funciona como un sistema de producción de proteínas recombinantes que tienen aplicación terapéutica para tratamiento de enfermedades de carácter inmunológico relacionadas con la alteración genética del gen IL-10.

20

25

30

RESUMEN

La presente invención se refiere a la construcción y uso de un vector de expresión para el género *Bifidobacterium*. Particularmente, se refiere plásmido pLR-hIL-10 en el cual se incluyeron un promotor, un terminador y un péptido señal BIF3, además del gen que codifica para la interleucina-10 humana. Se usa *Bifidobacterium longum*, como vehículo para la IL-10, debido a las ventajas que ofrece sobre otros sistemas de expresión como *E. coli*, entre las que destacan la ausencia de lipopolisacáridos de superficie que son causantes de patogenicidad y el contar de eficientes sistemas de exporte de proteínas hacia el medio extracelular. La IL-10, es una proteína que ayuda al tratamiento de enfermedades inflamatorias, como son: colitis ulcerosa, mieloma múltiple, melanoma, linfoma no-Hodking's, enfermedad de crhon, artritis reumatide, esclerosis múltiple, lupus eritematoso, psoriasis, dermatitis atópica, asma, entre otras.

El resultado es un producto que puede utilizarse para la producción de proteínas recombinantes para aplicación terapéutica y biotecnológica. Por otro lado, este vector puede ser utilizado para la producción de proteínas inestables debido a que la misma bacteria podría funcionar como vehículo para dirigir la proteína al sitio en que se requiere su acción, sin ser necesario pasar por un proceso de purificación de proteínas.

Figura 1

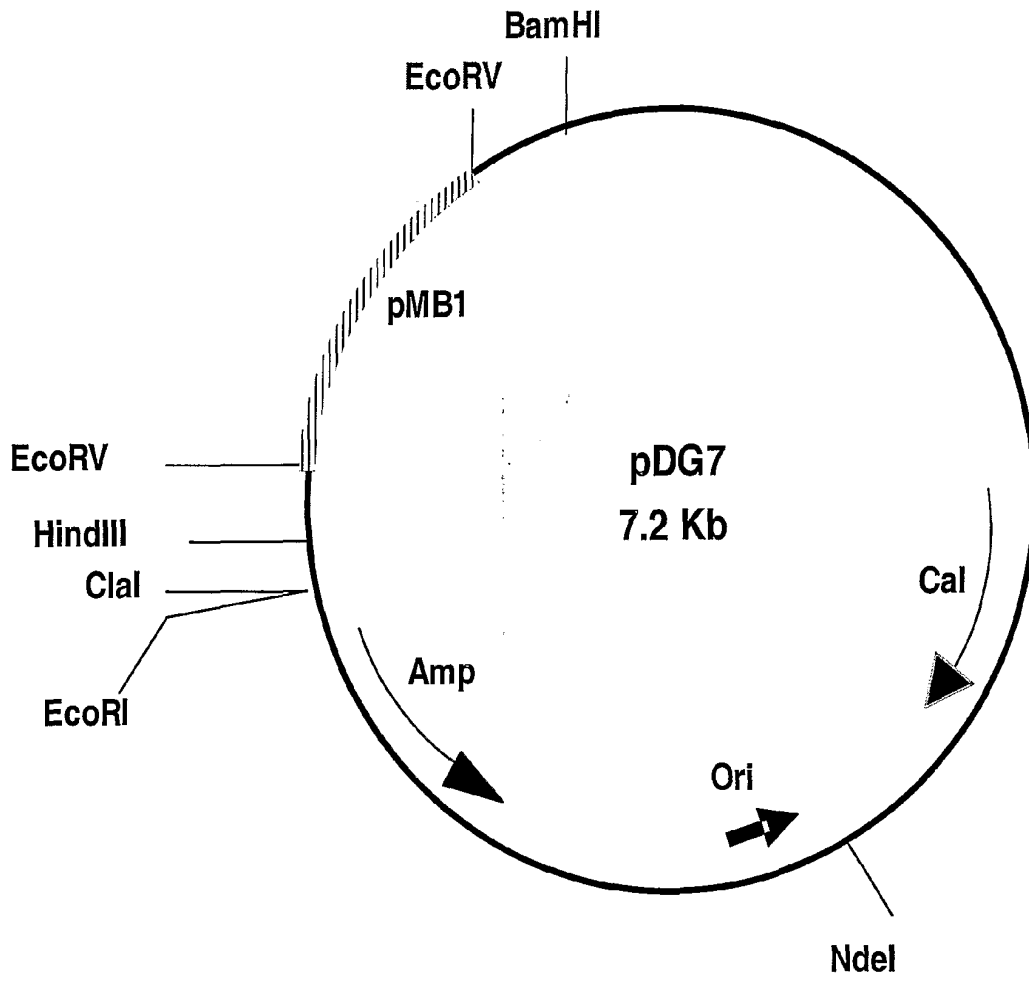


Figura 2

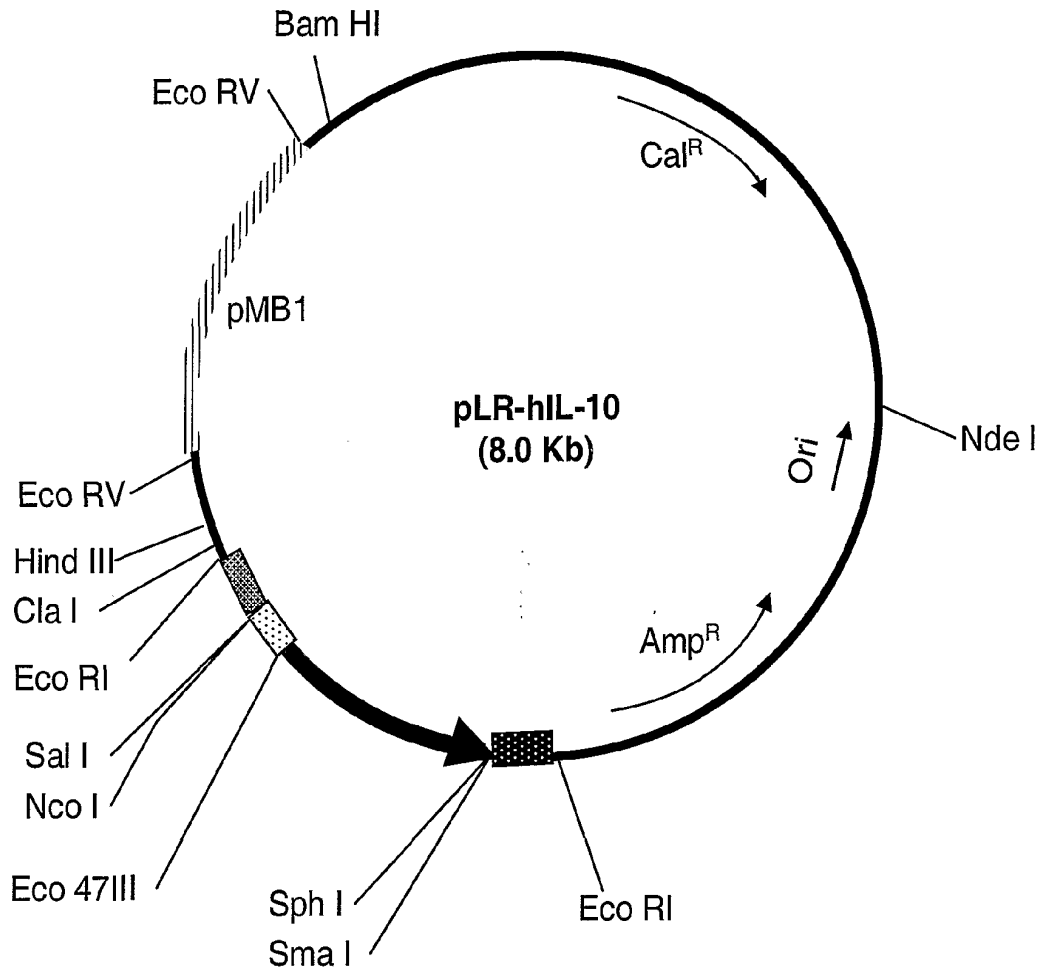


Figura 3

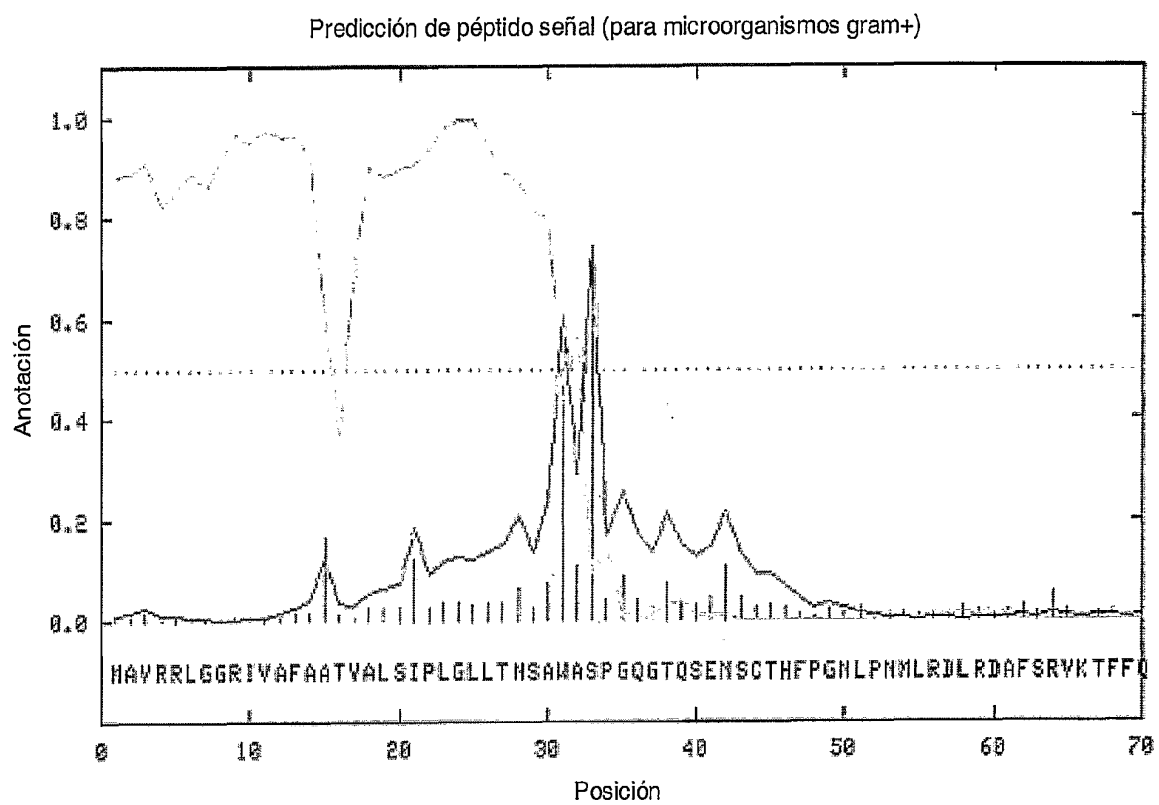


Figura 4

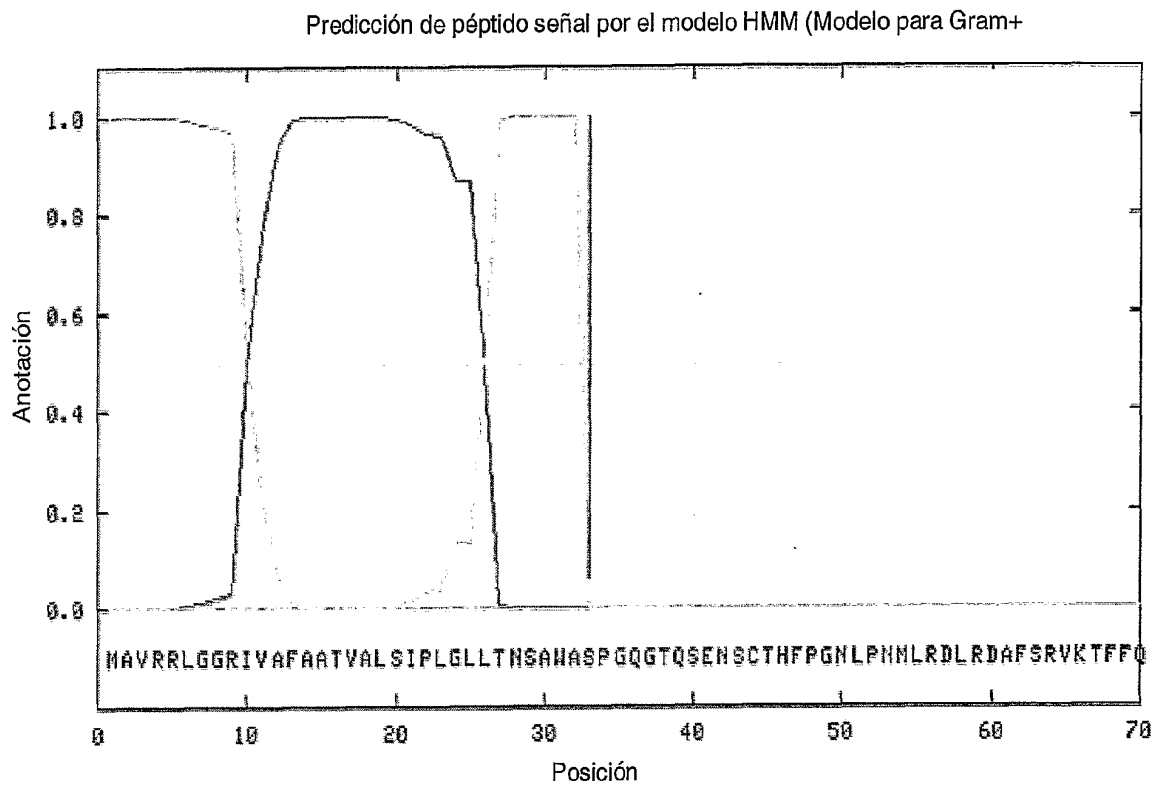


Figura 5

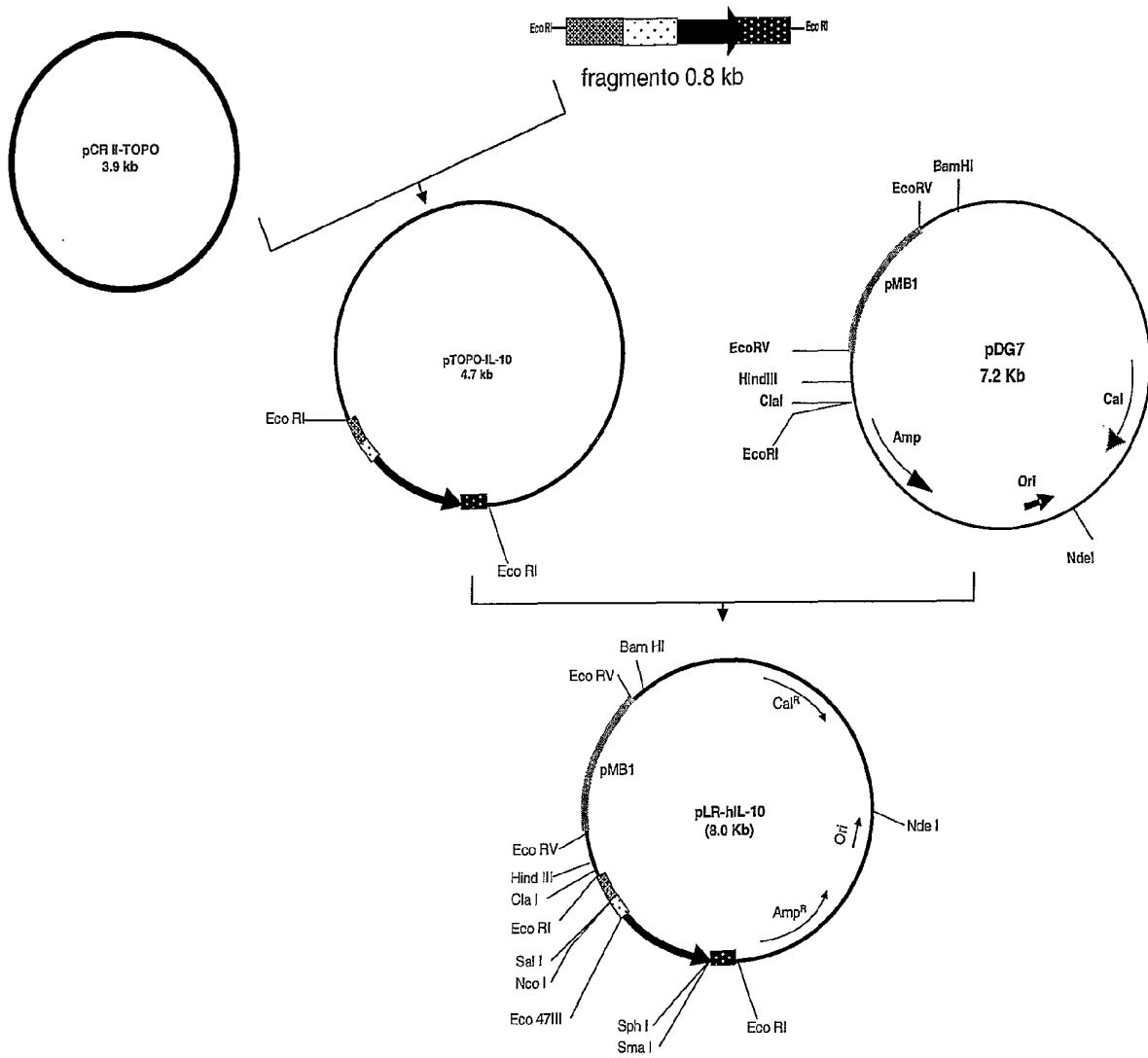


Figura 6

