



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102046791 B

(45) 授权公告日 2013. 09. 18

(21) 申请号 200980120583. 9

(22) 申请日 2009. 04. 16

(30) 优先权数据

61/124, 528 2008. 04. 17 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010. 12. 02

(86) PCT申请的申请数据

PCT/JP2009/001768 2009. 04. 16

(87) PCT申请的公布数据

W02009/128272 EN 2009. 10. 22

(83) 生物保藏信息

NITE BP-491 2008. 02. 19

(73) 专利权人 阿内罗药物科学株式会社

地址 日本东京都中央区

(72) 发明人 嶋谷 - 柴田裕子 清水瞳

米仓弘美

(74) 专利代理机构 北京高文律师事务所 11359

代理人 徐江华

(51) Int. Cl.

C12N 15/09 (2006. 01)

A61K 35/74 (2006. 01)

(56) 对比文件

US 20020054865 A, 2002. 05. 09,

W0 2007/136107 A1, 2007. 11. 29,

Corneau N等. Molecular characterization of three plasmids from Bifidobacterium longum. 《Plasmid》. 2004, 第 51 卷 (第 2 期), 87-100.

Corneau N等. Molecular characterization of three plasmids from Bifidobacterium longum. 《Plasmid》. 2004, 第 51 卷 (第 2 期), 87-100.

审查员 刘树柏

权利要求书1页 说明书43页

序列表11页 附图5页

(54) 发明名称

表达载体

(57) 摘要

通过将大肠杆菌来源的质粒和转化体来源的质粒融合而构建的常规穿梭载体在大肠杆菌和所述转化体细菌两者中发挥功能, 并且不存在仅在非大肠杆菌的转化体中发挥功能的表达载体。本发明提供了质粒表达载体, 其包含 (1) 在除了大肠杆菌的厌氧微生物中发挥功能的质粒复制单元, 和 (2) 蛋白表达单元, 其形成自编码具有靶活性的蛋白的 DNA 和含有在所述厌氧微生物中发挥功能的启动子与终止子的 DNA 片段。本发明的表达载体能够仅在转化体中复制, 这消除了所述转化体基因在其他致病或需氧细菌中复制的风险, 提供了用于治疗应用的非常安全和可靠的载体和基因转运体。

1. 用于转化双歧杆菌 (*Bifidobacterium*) 的质粒载体,其能够在所述双歧杆菌中复制,但不在大肠杆菌中复制,所述质粒载体包含至少一个在所述双歧杆菌中发挥功能但不在大肠杆菌中发挥功能的质粒复制单元,所述质粒复制单元是包含 OriV 区和 RepB 基因的 pTB6rep 单元,所述质粒载体还包含蛋白表达单元,所述蛋白表达单元包含编码胞嘧啶脱氨酶的 DNA 和包含在所述双歧杆菌中发挥功能的启动子和终止子的 DNA 片段。

2. 如权利要求 1 所述的质粒载体,其中编码包含 OriV 区和 RepB 基因的 pTB6rep 单元的基因是由 SEQ ID NO:4 的第 1796 至第 3391 核苷酸的核苷酸序列所示的 DNA。

3. 如权利要求 1 所述的质粒载体,包含 SEQ ID NO:4 的核苷酸序列所示的 DNA 序列。

4. 构建权利要求 1-3 中任意一项所述的质粒载体的方法,所述方法包括:

产生包含以下的穿梭质粒:(1) 在双歧杆菌中发挥功能的质粒复制单元和在大肠杆菌中发挥功能的质粒复制单元,和 (2) 蛋白表达单元,其包含编码具有靶活性的蛋白的 DNA 和包含在所述双歧杆菌中发挥功能的启动子和终止子的 DNA 片段,所述穿梭质粒能够在所述双歧杆菌和大肠杆菌两者中复制,并且

从所述穿梭质粒移除在大肠杆菌中发挥功能的质粒复制单元。

5. 基因转运体,包含用权利要求 1 至 3 中任一权利要求所述的质粒载体转化的双歧杆菌。

6. 如权利要求 5 所述的基因转运体,其中所述双歧杆菌选自青春双歧杆菌 (*Bifidobacterium adolescentis*)、动物双歧杆菌 (*Bifidobacterium animalis*)、婴儿双歧杆菌 (*Bifidobacterium infantis*)、嗜热双歧杆菌 (*Bifidobacterium thermophilum*)、假长双歧杆菌 (*Bifidobacterium pseudolongum*)、双歧双歧杆菌 (*Bifidobacterium bifidum*)、短双歧杆菌 (*Bifidobacterium breve*) 和长双歧杆菌 (*Bifidobacterium longum*)。

7. 如权利要求 6 所述的基因转运体,其中所述双歧杆菌是长双歧杆菌。

8. 如权利要求 5 所述的基因转运体,其中它能够在缺氧环境中的肿瘤组织中生长,并且能够表达胞嘧啶脱氨酶。

9. 如权利要求 8 所述的基因转运体,其中所述基因转运体是技术与评价专利微生物保藏国立研究所登陆号 NITEBP-491 所表示的菌株。

10. 用于实体瘤治疗剂的药物组合物或治疗剂,包含权利要求 5 所述的基因转运体。

表达载体

技术领域

[0001] 本发明涉及用于构建转化的厌氧微生物的表达载体和构建所述表达载体的方法,所述厌氧微生物用作治疗缺氧疾病的基因转运体。此外,本发明涉及包含由所述表达载体转化的厌氧微生物的基因转运体、含有所述基因转运体的药物组合物和含有所述基因转运体的缺氧疾病治疗剂。

背景技术

[0002] 在遗传改造的领域中,噬菌体、动物病毒或植物病毒、质粒等被广泛用作转化微生物的表达载体。作为被转化并使得表达基因产物的靶蛋白的转化体微生物,大肠杆菌(*E. coli*)、酵母等是被广泛使用的。这些转化的微生物是以表达靶蛋白为目的,并且所述微生物自身的利用未被考虑过。

[0003] 近些年来,关于转化的微生物自身的利用,治疗恶性肿瘤的方法已经引起了注意,其中将转化的厌氧细菌用作基因转运体;例如,已经提出了使用转化的梭菌(*Clostridium*)将基因转运至肿瘤位置的方法(参见例如专利公布1至3),此外,已经提出将转化的长双歧杆菌(*Bifidobacterium longum*)应用于治疗实体瘤(参见例如非专利公布1和2)。

[0004] 此外,关于作为用于治疗实体瘤的基因转运体的转化的双歧杆菌(*Bifidobacterium*),已有报道被转化以表达胞嘧啶脱氨酶(下文称为CD)的长双歧杆菌可以预期在酶-前药疗法中具有应用(参见例如专利公布4和非专利公布3和4)。CD是将5-氟胞嘧啶(下文称为5-FC)转变为5-FU的酶,5-氟胞嘧啶是具有抗肿瘤活性的5-氟尿嘧啶(下文称为5-FU)的前药(前体)。

[0005] 这样的转化的细菌的构建需要表达载体。但是,因为在遗传改造领域中常规用于转化大肠杆菌的大肠杆菌来源的质粒载体不能天然地在除了大肠杆菌的细菌中复制,所以在转化的细菌的构建中必须修饰质粒载体,以便其能够在转化的细菌中复制。

[0006] 在以上公布中,也报道了用于构建用于治疗恶性肿瘤的这些转化的细菌的表达载体,并且专利公布1至3报道了在大肠杆菌和梭菌两者中复制的穿梭质粒pNTR500F、pCD540FT等。

[0007] 此外,专利公布4报道了在大肠杆菌和双歧杆菌两者中复制的穿梭质粒pBLES100-S-eCD和用于构建穿梭质粒pBLES100-S-eCD的穿梭质粒pBLES100。

[0008] 此外,还已经报道了穿梭质粒pAV001-HU-eCD,其可以以大于100倍的穿梭质粒pBLES100-S-eCD的效率的高效率转化长双歧杆菌(参见例如专利公布5)。

[0009] 此外,已经报道了穿梭质粒pAV001-HU-eCD-M968,其是穿梭质粒pAV001-HU-eCD的质粒单核苷酸变体,其中插入穿梭质粒pAV001中的靶基因的DNA已被部分改变(参见例如专利公布6)。

[0010] 此外,例如,已经报道了在大肠杆菌和双歧杆菌两者中复制的穿梭质粒pDG7、在大肠杆菌和梭菌两者中复制的穿梭质粒pEBM3和pECM2、在大肠杆菌和乳酸杆菌

(*Lactobacillus*) 两者中复制的穿梭质粒 pLP825 等 (参见例如非专利公布 5)。

[0011] 如上文所述,已经报道了用于构建除了大肠杆菌的转化体的各种质粒载体,它们都是在大肠杆菌和除了大肠杆菌的转化体细菌两者中复制的穿梭载体,并且没有已知的能够仅在非大肠杆菌转化体细菌中复制的质粒载体。

[0012] 引用列表

[0013] 专利文献

[0014] [专利公布 1] 美国专利第 6416754 号

[0015] [专利公布 2] 美国专利第 6652849 号

[0016] [专利公布 3] 美国提前公开第 2003/0103952 号

[0017] [专利公布 4] JP, A, 2002-97144

[0018] [专利公布 5] WO 2006-57289

[0019] [专利公布 6] WO 2007-136107

[0020] 非专利文献

[0021] [非专利公布 1] Yazawa et al., *Cancer Gene Ther.*, 7, 269-274 (2000)

[0022] [非专利公布 2] Yazawa et al., *Breast Cancer Res. Treat.*, 66, 165-170 (2001)

[0023] [非专利公布 3] Nakamura et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 66, 2362-2366 (2002)

[0024] [非专利公布 4] Fujimori et al., *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.*, 5, 200-203 (2002)

[0025] [非专利公布 5] Alessandra Argnani et al., *Microbiology.* ;142: 109-114 (1996)

[0026] 发明概述

[0027] 技术问题

[0028] 在利用转化体基因转运体治疗缺氧环境中的疾病 (下文称为缺氧疾病) 的方法中,例如实体瘤或缺血性疾病,所使用的基因转运体需要非致病的专性厌氧菌,其仅在缺氧状态中的疾病组织中存活和增殖,并且不在非缺氧状态中的正常组织中存活或增殖。

[0029] 此外,非常重要是基因转运体中的转化基因不会被横向转移到除了所述基因转运体的致病细菌、需氧细菌或兼性厌氧菌,并且即使所述转化基因被横向转移,其不会在该细菌中复制。因为这点,用于构建转化体基因转运体的表达载体期望地仅在所述转化体中复制并且不在除了所述转化体的细菌中复制,特别是不在致病或需氧细菌或兼性厌氧菌中复制。

[0030] 至今报道的大部分表达载体是在转化体细菌和例如大肠杆菌的除了所述转化体细菌的细菌两者中复制的穿梭载体,并且它们不是仅在非大肠杆菌转化体中复制的表达载体。

[0031] 本发明的目的是提供这样的表达载体,其仅在非大肠杆菌转化体中复制,但是不在除了所述转化体的细菌中复制,特别是,不在致病或者需氧细菌或兼性厌氧菌中复制,例如大肠杆菌。

[0032] 此外,本发明的另一目的是提供由表达载体所转化的厌氧微生物构成的基因转运体、含有所述基因转运体的药物组合物和含有转化体细菌的用于治疗缺氧疾病的试剂。

[0033] 问题解决方法

[0034] 本发明人之前在具有将抗肿瘤物质前体转变为抗肿瘤物质的活性的蛋白中选择了表达 CD 的基因作为靶基因；然后构建了穿梭质粒 pBLES100-S-eCD 作为质粒载体，所述靶基因被插入所述质粒载体，其中携带表达 CD 的基因的大肠杆菌的质粒和长双歧杆菌来源的质粒被融合。本发明人已发现并报道通过使用以上来重组长双歧杆菌 105A 而生成的长双歧杆菌 105A/pBLES100-S-eCD 作为用于治疗恶性肿瘤的基因转运体是有前途的（专利公布 4）。

[0035] 为了进一步改进融合质粒，本发明人已报道了长双歧杆菌 105A/pAV001-HU-eCD-M968 及其构建方法，其中作为质粒 pAV001-HU-eCD 的质粒单核苷酸变体的质粒 pAV001-HU-eCD-M968 是通过部分地改变插入的靶基因的 DNA 而产生的，并且使用以上来重组长双歧杆菌 105A（专利公布 6）。

[0036] 因为所有这些质粒都是在双歧杆菌和大肠杆菌两者中复制的穿梭质粒，所以当它们以任何原因被横向转移到大肠杆菌时，它们在大肠杆菌中复制。

[0037] 本发明人为了解决以上问题已进行了深入的研究，并且通过从以上质粒 pAV001-HU-eCD-M968 中移除 pUC ori 而构建了质粒 pBifiCD，pUC ori 是含有大肠杆菌复制起点的片段。已经证实大肠杆菌 JM109 感受态细胞（Takara Bio Inc.）未被使用本发明的质粒 pBifiCD 通过热休克所转化，并且没有横向转移的可能性。

[0038] 用本发明的质粒转化的细菌表现出良好的 CD 表达活性，并且当其与前药 5-FC 联合使用时表现出显著的肿瘤生长抑制作用，这表明其作为用于实体瘤的出色的治疗剂是有前途的，所述用本发明的质粒转化的细菌例如长双歧杆菌 105-A/pBifiCD（技术与评价专利微生物保藏国立研究所（National Institute of Technology and Evaluation Patent Microorganisms Depositary）(NPMD)， 292-0818 日本千叶县木更津市かずさ 鎌足 2-5-8，保藏日期：2008 年 2 月 19 日，登录号 NITE BP-491），其是重组长双歧杆菌 105-A，所述前药 5-FC 由所述 CD 转变为抗肿瘤物质 5-FU。

[0039] 出人意料的是，还发现这些重组双歧杆菌具有高质粒保留稳定性，此外，因为它们不含有大肠杆菌复制起点，所以即使发生了向大肠杆菌的横向转移，它们在大肠杆菌中的复制也是不可能的。因此，该重组细菌作为非常安全和高质量的基因转运体是有前途的。

[0040] 因此，本发明涉及

[0041] <1> 表达载体，其是在厌氧微生物中发挥功能的质粒载体，所述表达载体不含有在大肠杆菌中发挥功能的质粒复制单元，

[0042] <2> 如 <1> 所述的表达载体，其中所述厌氧微生物是除了大肠杆菌的肠细菌，

[0043] <3> 如 <2> 所述的表达载体，其中所述除了大肠杆菌的肠细菌是选自以下的肠细菌：双歧杆菌、乳酸杆菌、肠球菌（Enterococcus）、链球菌（Streptococcus）和梭菌，

[0044] <4> 如 <1> 至 <3> 中任一项所述的表达载体，其中所述表达载体包含（1）在除了大肠杆菌的厌氧微生物中发挥功能的质粒复制单元和（2）蛋白表达单元，其包括编码具有靶活性的蛋白的 DNA 和包含在所述厌氧微生物中发挥功能的启动子和终止子的 DNA 片段，

[0045] <5> 如 <4> 所述的表达载体，其中所述在除了大肠杆菌的厌氧微生物中发挥功能的质粒复制单元是在选自以下的厌氧微生物中发挥功能的质粒复制单元：双歧杆菌、乳酸杆菌、肠球菌、链球菌和梭菌，

[0046] <6> 如 <5> 所述的表达载体,其中所述在除了大肠杆菌的厌氧微生物中发挥功能的质粒复制单元是在双歧杆菌中发挥功能的质粒复制单元,

[0047] <7> 如 <6> 所述的表达载体,其中所述在双歧杆菌中发挥功能的质粒复制单元是包含 OriV 区和 RepB 基因的 pTB6 rep 单元,

[0048] <8> 如 <7> 所述的表达载体,其中编码所述包含 OriV 区和 RepB 基因的 pTB6rep 单元的基因是由来自 SEQ ID NO:4 的第 1796 至第 3391 核苷酸的核苷酸序列所示的 DNA 或其单核苷酸多态性,

[0049] <9> 如 <4> 至 <8> 中任一项所述的表达载体,其中所述在厌氧微生物中发挥功能的启动子和终止子是在选自以下的细菌中发挥功能的启动子和终止子:双歧杆菌、乳酸杆菌、肠球菌、链球菌和梭菌,

[0050] <10> 如 <9> 所述的表达载体,其中所述在厌氧微生物中发挥功能的启动子和终止子是在双歧杆菌中发挥功能的启动子和终止子,

[0051] <11> 如 <10> 所述的表达载体,其中所述在双歧杆菌中发挥功能的启动子和终止子是编码在双歧杆菌中发挥功能的组蛋白样 DNA- 结合蛋白的基因的启动子和终止子,

[0052] <12> 如 <11> 所述的表达载体,其中所述编码在双歧杆菌中发挥功能的组蛋白样 DNA- 结合蛋白的基因的启动子和终止子是编码双歧杆菌来源的组蛋白样 DNA- 结合蛋白的基因的启动子和终止子,

[0053] <13> 如 <12> 所述的表达载体,其中所述编码组蛋白样 DNA- 结合蛋白的基因的启动子和终止子的基因是由分别来自 SEQ ID NO:4 的第 7 至第 367 和第 1676 至第 1789 核苷酸的核苷酸序列所示的 DNA,或其单核苷酸多态性,

[0054] <14> 如 <4> 至 <13> 所述的表达载体,其中所述具有靶活性的蛋白是对缺氧环境中的疾病具有治疗活性的蛋白,

[0055] <15> 如 <14> 所述的表达载体,其中所述对缺氧环境中的疾病具有治疗活性的蛋白是 (a) 具有抗肿瘤活性的蛋白,或 (b) 具有将抗肿瘤物质前体转变为抗肿瘤物质的活性的蛋白,

[0056] <16> 如 <15> 所述的表达载体,其中所述对缺氧环境中的疾病具有治疗活性的蛋白是具有将抗肿瘤物质前体转变为抗肿瘤物质的活性的蛋白,

[0057] <17> 如 <16> 所述的表达载体,其中所述具有将抗肿瘤物质前体转变为抗肿瘤物质的活性的蛋白选自胞嘧啶脱氨酶、硝基还原酶和 β - 葡糖醛酸糖苷酶,

[0058] <18> 如 <17> 所述的表达载体,其中所述具有将抗肿瘤物质前体转变为抗肿瘤物质的活性的蛋白是胞嘧啶脱氨酶,

[0059] <19> 如 <18> 所述的表达载体,其中编码胞嘧啶脱氨酶的基因是由来自 SEQ ID NO:4 的第 395 至第 1675 核苷酸的核苷酸序列所示的 DNA 或其单核苷酸多态性,

[0060] <20> 如 <4> 至 <29> 中任一项所述的表达载体,其还包含 (3) 选择标记活性基因单元,其中所述选择标记活性选自抗药性、营养缺陷型和培养基选择性,

[0061] <21> 如 <20> 所述的表达载体,其中所述选择标记活性是选自以下的抗药性:壮观霉素抗性、氨苄西林抗性、四环素抗性、新霉素抗性和卡那霉素抗性,

[0062] <22> 如 <21> 所述的表达载体,其中所述选择标记活性是壮观霉素抗性,

[0063] <23> 如 <22> 所述的表达载体,其中编码表现选择标记活性的蛋白的 DNA 是编码壮

观霉素腺苷酸转移酶 (adenyltransferase) 的 DNA,

[0064] <24> 如 <23> 所述的表达载体,其中包含编码壮观霉素腺苷酸转移酶的 DNA 及其启动子序列的 DNA 是由来自 SEQ ID NO:4 的第 3398 至第 4476 核苷酸的核苷酸序列所示的 DNA 或其单核苷酸多态性,以及

[0065] <25> 如 <24> 所述的表达载体,其包含由 SEQ ID NO:4 (pBifiCD) 的核苷酸序列所示的 DNA 序列。

[0066] 此外,本发明涉及

[0067] <26> 构建表达载体的过程,所述过程包括产生包含以下的穿梭质粒:(1) 在除了大肠杆菌的厌氧微生物中发挥功能的质粒复制单元和 (2) 蛋白表达单元,其包含编码具有靶活性的蛋白的 DNA 和包含在所述厌氧微生物中发挥功能的启动子和终止子的 DNA 片段,并且所述穿梭质粒在大肠杆菌和除了大肠杆菌的宿主细菌两者中复制,

[0068] 并且从所述穿梭质粒移除在大肠杆菌中发挥功能的质粒复制单元。

[0069] 此外,本发明涉及

[0070] <27> 基因转运体,其包含由 <1> 至 <25> 中任一项所述的表达载体转化的厌氧微生物,

[0071] <28> 如 <27> 所述的基因转运体,其中所述厌氧微生物是除了大肠杆菌的肠细菌,

[0072] <29> 如 <28> 所述的基因转运体,其中所述除了大肠杆菌的肠细菌选自双歧杆菌、乳酸杆菌、肠球菌、链球菌和梭菌,

[0073] <30> 如 <29> 所述的基因转运体,其中所述除了大肠杆菌的肠细菌是双歧杆菌,

[0074] <31> 如 <30> 所述的基因转运体,其中所述双歧杆菌选自青春双歧杆菌 (*Bifidobacterium adolescentis*)、动物双歧杆菌 (*Bifidobacterium animalis*)、婴儿双歧杆菌 (*Bifidobacterium infantis*)、嗜热双歧杆菌 (*Bifidobacterium thermophilum*)、假长双歧杆菌 (*Bifidobacterium pseudolongum*)、双歧双歧杆菌 (*Bifidobacterium bifidum*)、短双歧杆菌 (*Bifidobacterium breve*) 和长双歧杆菌 (*Bifidobacterium longum*),

[0075] <32> 如 <30> 所述的基因转运体,其中所述双歧杆菌是长双歧杆菌,

[0076] <33> 如 <27> 至 <32> 中任一项所述的基因转运体,其中它能够在缺氧环境中的肿瘤组织中生长,并且能够表达对缺氧环境中的疾病具有治疗活性的蛋白,

[0077] <34> 如 <33> 所述的基因转运体,其中它能够在缺氧环境中的肿瘤组织中生长,并且所述对缺氧环境中的疾病具有治疗活性的蛋白是 (a) 具有抗肿瘤活性的蛋白或 (b) 具有将抗肿瘤物质前体转变为抗肿瘤物质的活性的蛋白,

[0078] <35> 如 <34> 所述的基因转运体,其中它能够在缺氧环境中的肿瘤组织中生长,并且所述对缺氧环境中的疾病具有治疗活性的蛋白是具有将抗肿瘤物质前体转变为抗肿瘤物质的活性的蛋白,

[0079] <36> 如 <35> 所述的基因转运体,其中所述具有将抗肿瘤物质前体转变为抗肿瘤物质的活性的蛋白选自胞嘧啶脱氨酶、硝基还原酶和 β -葡萄糖醛酸糖苷酶,

[0080] <37> 如 <36> 所述的基因转运体,其中所述具有将抗肿瘤物质前体转变为抗肿瘤物质的活性的蛋白是胞嘧啶脱氨酶,以及

[0081] <38> 如 <37> 所述的基因转运体,其中所述基因转运体是长双歧杆菌 105-A/

pBifiCD(技术与评价专利微生物保藏国立研究所(NPMD)登录号 NITE BP-491)。

[0082] 此外,本发明涉及

[0083] <39> 药物组合物,其包含<27>至<38>中任一项所述的基因转运体,

[0084] <40> 药物组合物,其包含<34>至<38>中任一项所述的基因转运体和通过蛋白被转变为抗肿瘤物质的抗肿瘤物质前体的组合,所述基因转运体能够表达所述蛋白并且所述蛋白具有将抗肿瘤物质前体转变为抗肿瘤物质的活性,以及

[0085] <41> 如<40>所述的药物组合物,其中所述具有将抗肿瘤物质前体转变为抗肿瘤物质的活性的蛋白是胞嘧啶脱氨酶,并且所述抗肿瘤物质前体是 5- 氟胞嘧啶。

[0086] 此外,本发明涉及

[0087] <42> 用于实体瘤的治疗剂,其包含<34>至<38>中任一项所述的足以表达有效治疗剂量的具有抗肿瘤活性的蛋白的量的基因转运体,

[0088] <43> 用于实体瘤的治疗剂,其包含以下的组合:<34>至<38>中任一项所述的足以表达具有将抗肿瘤物质前体转变为有效治疗剂量的抗肿瘤物质的活性的蛋白和可以被转变为有效治疗剂量的抗肿瘤物质的量的抗肿瘤物质前体,所述抗肿瘤物质前体被所述基因转运体能够表达的蛋白所转变,以及

[0089] <44> 如<43>所述的实体瘤治疗剂,其中所述具有将抗肿瘤物质前体转变为抗肿瘤物质的活性的蛋白是胞嘧啶脱氨酶,并且所述抗肿瘤物质前体是 5- 氟胞嘧啶。

[0090] 在本申请中,编码(a)具有抗肿瘤活性的蛋白的 DNA 或编码(b)具有将抗肿瘤物质前体转变为抗肿瘤物质的活性的蛋白的 DNA 下文可以称为“编码靶蛋白的 DNA”。

[0091] 发明的有利效果

[0092] 本发明的表达载体不包含在除了转化体细菌的细菌中,特别是在大肠杆菌中发挥功能的复制起点,并且它是非常安全的载体,不存在在除了所述转化的细菌的细菌中复制的可能性,特别是不在致病或需氧或兼性厌氧细菌中复制,例如大肠杆菌。

[0093] 使用本发明的表达载体转化的基因转运体具有高质粒保留稳定性;并且如上文所述,即使所述载体被横向转移到除了所述转化体的细菌,特别是转移到致病或者需氧或兼性厌氧细菌,例如大肠杆菌,也不存在在这些其他细菌中复制的风险。因此,本发明的基因转运体作为高度安全的、高质量的基因转运体是有前途的。

[0094] 附图简述

[0095] [图 1] 展示构建选择标记质粒(pSPCM-pUC ori)的步骤的图(步骤 1)。

[0096] [图 2] 展示构建选择标记活性蛋白质粒(pHU-eCDm-SPCM-pUC ori)的步骤的图(步骤 2)。

[0097] [图 3] 展示构建穿梭质粒(pCD 穿梭(pCDshuttle))的步骤的图(步骤 3)。

[0098] [图 4] 展示构建质粒“pBifiCD”的步骤的图(步骤 4)。

[0099] [图 5] 展示长双歧杆菌 Re-105A/pBifiCD 克隆菌株的抗肿瘤效果的图。

[0100] 实施方案描述

[0101] 本发明的表达载体是这样的质粒载体,其在厌氧细菌中并且特别是除了大肠杆菌的肠细菌中发挥功能,例如双歧杆菌、乳酸杆菌、肠球菌、链球菌或梭菌,并且本发明的表达载体是不含有在除了转化的细菌的细菌中,特别是大肠杆菌中发挥功能的质粒复制单元的表达载体。更具体地,本发明的表达载体是例如包含以下的表达载体:(1) 在除了大肠杆菌

的厌氧微生物中发挥功能的质粒复制单元,和(2)蛋白表达单元,其包含编码具有靶活性的蛋白的 DNA 和包含在所述厌氧微生物中发挥功能的启动子和终止子的 DNA 片段,并且所述表达载体不含有在除了所述转化体细菌的细菌中,特别是在大肠杆菌中发挥功能的质粒复制单元。

[0102] 至今已报道的大部分质粒载体是通过将大肠杆菌来源的质粒和转化体细菌来源的质粒融合而构建的,这是因为基因转染技术的积累信息和转染的确保。它们是在大肠杆菌和转化体细菌两者中发挥功能的穿梭载体,并且不是仅在非大肠杆菌的转化体细菌中发挥功能的表达载体。

[0103] 本发明的表达载体特征在于,例如,其基本上由以下组成(1)在除了大肠杆菌的厌氧微生物中发挥功能的质粒复制单元和(2)蛋白表达单元,其基本上由编码具有靶活性的蛋白的 DNA 和包含在所述厌氧微生物中发挥功能的启动子和终止子的 DNA 片段组成。并且所述表达载体不含有在除了所述转化体细菌的细菌中,特别是在大肠杆菌中发挥功能的质粒复制单元。

[0104] 在除了大肠杆菌的厌氧微生物中发挥功能的本发明的表达载体的质粒复制单元可以是任何质粒复制单元,只要其在除了大肠杆菌的厌氧微生物中发挥功能,例如在诸如双歧杆菌、乳酸杆菌、肠球菌、链球菌或梭菌的肠细菌中发挥功能,并且只要其在除了转化体细菌的厌氧微生物中不发挥功能;在除了大肠杆菌的厌氧微生物中发挥功能的本发明的表达载体的质粒复制单元的实例包括在除了大肠杆菌的厌氧微生物中发挥功能的质粒复制单元,例如,在双歧杆菌中发挥功能。具体实例包括基本上由在双歧杆菌中发挥功能的 OriV 区和 RepB 基因组成的 pTB6 rep 单元,或其单核苷酸多态性。更多具体实例包括由来自 SEQ ID NO:4 的第 1796 至第 3391 核苷酸的核苷酸序列所示的 DNA 或其单核苷酸多态性。

[0105] 此外,本发明的表达载体的蛋白表达单元的启动子和终止子可以是任何启动子和终止子,只要它们在厌氧微生物中发挥功能,例如,在诸如双歧杆菌、乳酸杆菌、肠球菌、链球菌或梭菌的肠细菌中发挥功能;本发明的表达载体的蛋白表达单元的启动子和终止子的实例包括编码在厌氧微生物中发挥功能的组蛋白样 DNA-结合蛋白的基因的启动子和终止子,例如,编码双歧杆菌来源的组蛋白样 DNA-结合蛋白的基因的启动子和终止子 DNA,或其单核苷酸多态性。具体实例包括由分别来自 SEQ ID NO:4 的第 7 至第 367 和第 1676 至第 1786 核苷酸的核苷酸序列所示的 DNA,或其单核苷酸多态性。

[0106] 此外,本发明的表达载体还可以包含(3)选择标记活性基因单元。本发明的表达载体所具有的选择标记活性不是特殊限定的,只要其能够选择由本发明的质粒载体转化的厌氧微生物;本发明的表达载体所具有的选择标记活性的实例包括抗药性标记和营养缺陷型,所述抗药性标记例如壮观霉素抗性、氨苄西林抗性、四环素抗性、新霉素抗性 or 卡那霉素抗性,并且壮观霉素抗性是优选的。

[0107] 选择标记活性基因单元的实例包括,例如含有编码表现壮观霉素抗性活性的蛋白的 DNA 或其单核苷酸变体的 DNA 及其启动子序列;例如,编码粪肠球菌 (*Enterococcus faecalis*) 来源的壮观霉素腺苷酸转移酶(下文称为 AAD9 盒)的 DNA 或其单核苷酸多态性。具体实例包括由来自 SEQ ID NO:4 的第 3398 至第 4476 核苷酸的核苷酸序列所示的 DNA 或其单核苷酸多态性。

[0108] 本发明涉及的“单核苷酸变体”表示单核苷酸多态性,其中至少一个位点的核苷酸已被改变(下文称为 SNP),并且不仅包括在仅一个位点的 SNP 还包括在许多位点的 SNP。

[0109] 例如当本发明的缺氧疾病的治疗剂被用作恶性肿瘤的治疗剂时,被并入本发明的表达载体的蛋白表达单元的基因可以是任何基因,只要其表达具有抗肿瘤活性的蛋白或具有将抗肿瘤物质前体转变为抗肿瘤物质的活性的蛋白,并且只要其不是例如巨大 DNA(至少约 10kb)的抑制转化的 DNA 或对于接受体细胞有毒的 DNA。

[0110] 由所述基因表达的具有抗肿瘤活性的蛋白包括,例如细胞因子,细胞因子的具体实例包括干扰素 (IFN)- α 、 β 和 γ ,粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF)、白介素 (IL)-1 α 、1 β 、2、3、4、6、7、10、12、13、15 和 18、肿瘤坏死因子 (TNF)- α 、淋巴毒素 (LT)- β 、粒细胞集落刺激因子 (G-CSF)、巨噬细胞集落刺激因子 (M-CSF)、巨噬细胞移动抑制因子 (MIF)、白血病抑制因子 (LIF)、T-细胞活化共刺激因子 B7 (CD80) 和 B7-2 (CD86)、KIT 配体和制瘤素 M。此外,实例包括血管发生抑制物质,例如内皮抑制素、血管抑制素 (angiostatin) 和三环 (kringle)1、2、3、4 和 5。

[0111] 这些蛋白的序列对于不同生物是已知的,并且本发明中使用的编码具有抗肿瘤活性的蛋白的 DNA 可以通过利用例如基于所述序列信息的 PCR 方法的已知技术来获得。

[0112] 此外,具有将抗肿瘤物质前体转变为抗肿瘤物质的活性的蛋白的实例包括:胞嘧啶脱氨酶(下文称为 CD),其是将 5-氟胞嘧啶(下文称为 5-FC)转变为抗肿瘤活性物质 5-氟尿嘧啶(下文称为 5-FU)的酶;硝基还原酶,其是将 5-氮杂环丙基-2,4-二硝基苯甲酰胺(下文称为 CB1945)转变为抗肿瘤活性烷化剂的酶;1 型单纯疱疹病毒胸苷激酶(下文称为 HSV1-TK),其是将更昔洛韦转变为抗肿瘤活性代谢产物的酶;以及 β -葡糖醛酸糖苷酶,其是将葡糖醛酸化的抗肿瘤活性物质转变为抗肿瘤活性物质的酶。优选的实例包括 CD,其是将 5-FC 转变为 5-FU 的酶。

[0113] 编码 CD 的 DNA 可以是,例如,质粒 pAdex 1 CSCD (Riken Gene Bank RDB No. 1591),其含有编码大肠杆菌来源的 CD 的 DNA,或分离自质粒 pMK116 的 DNA,其类似地含有编码大肠杆菌来源的 CD 的 DNA (D. A. Mead et al., Protein Engineering 1:67-74 (1986))。

[0114] 编码大肠杆菌来源的 CD 的 DNA 的实例包括由 SEQ ID NO:4 的第 395 至第 1675 核苷酸的核苷酸序列所示的 DNA 或其单核苷酸多态性。

[0115] 此外,当本发明的缺氧疾病的治疗剂被用作缺血性疾病的治疗剂时,具有血管生成促进活性的蛋白可以被用作并入本发明的表达载体的蛋白表达单元的基因,所述血管生成促进活性对于治疗缺血性疾病是有用的。具体实例包括成纤维细胞生长因子 2 (FGF2)、内皮细胞生长因子 (ECGF)、血管内皮生长因子 (VEGF) 和肝细胞生长因子 (HGF)。

[0116] 类似地,这些蛋白的序列对于不同生物是已知的,并且本发明中使用的编码具有血管生成促进活性的蛋白的 DNA 可以通过利用例如基于所述序列信息的 PCR 方法的已知技术来获得。

[0117] 本发明的载体包括任何载体,只要其是包含以下的质粒,例如,在除了大肠杆菌的厌氧微生物中发挥功能的质粒复制单元;蛋白表达单元,其包含编码具有靶活性的蛋白的 DNA 和含有在所述厌氧微生物中发挥功能的启动子和终止子的 DNA 片段;以及选择标记活性基因单元。并且只要当所述质粒被转化入厌氧微生物时能在所述厌氧微生物中发挥功能。以及只要所述质粒不含有在除了所述转化体细菌的细菌中,特别是在大肠杆菌中发挥

功能的质粒复制单元。

[0118] 实例包括通过以下方法构建的质粒：将包含编码具有靶活性的给定蛋白的 DNA 和包含在厌氧微生物中发挥功能的启动子和终止子的 DNA 片段的蛋白表达单元并入以下穿梭质粒，并且移除在大肠杆菌中发挥功能的质粒复制单元：pBLES100（专利公布 4）、pAV001（专利公布 5）、pBRASTA101（Tanaka et al., 2005, Biosci. Biotechnol. Biochem., 69(2):422-425）、pDG7、pEBM3、pECM2、pLP825 等（非专利公布 5），以上在公布中已有报道。

[0119] 本发明的载体的其他实例包括通过将被并入质粒的蛋白表达单元与另一给定的蛋白表达单元重组并且还移除了在大肠杆菌中发挥功能的质粒复制单元而构建的那些，所述被并入的质粒例如 pNTR500F、pCD540FT 等（专利公布 1 至 3）、pBLES100-S-eCD（专利公布 4）、pAV001-HU-eCD（专利公布 5）、pAV001-HU-eCD-M968（专利公布 6）等。

[0120] 本发明的表达载体的具体实例包括，例如这样的载体，其具有：作为在除了大肠杆菌的厌氧微生物中发挥功能的质粒复制单元的 pTB6 rep 单元，其包含在双歧杆菌中发挥功能的 RepB 基因和 OriV 区，和作为含有在厌氧微生物中发挥功能的启动子和终止子的 DNA 片段的编码双歧杆菌来源的组蛋白样 DNA- 结合蛋白的基因的启动子和终止子；和作为编码具有靶活性的蛋白的 DNA 的编码将 5-FC 转变为 5-FU 的 CD 酶的 DNA；以及作为选择标记活性基因单元的编码粪肠球菌来源的壮观霉素腺苷酸转移酶的 DNA（AAD9 盒），。

[0121] 更多具体实例包括 pBifiCD，其由 SEQ ID NO:4 的核苷酸序列所示。

[0122] 本发明的载体可以通过例如以下的方法构建。

[0123] 例如，本发明的载体可以通过以下构建

[0124] (1) 构建质粒，其包含例如 pUC ori 的大肠杆菌的复制起点和例如 AAD9 盒的选择标记活性基因单元（下文称为选择标记质粒）（下文称为步骤 1），

[0125] (2) 制备选择标记质粒的线性质粒，将其与例如编码双歧杆菌来源的组蛋白样 DNA- 结合蛋白的基因的启动子和终止子的启动子和终止子以及 (a) 具有抗肿瘤活性的蛋白或 (b) 例如包含 CD 的片段的具有将抗肿瘤物质前体转变为抗肿瘤物质的活性的蛋白（下文称为蛋白表达单元）连接，以构建具有选择标记活性基因单元和蛋白表达单元的质粒（下文称为选择标记活性蛋白质质粒）（下文称为步骤 2），

[0126] (3) 制备该选择标记活性蛋白质质粒的线性质粒，将其与例如包含在双歧杆菌中发挥功能的 RepB 基因和 OriV 区的 pTB6 rep 单元的 DNA 片段的在除了大肠杆菌的厌氧微生物中发挥功能的质粒复制单元（下文称为质粒复制单元）连接，以构建具有大肠杆菌复制起点和选择标记活性基因单元、蛋白表达单元和质粒复制单元的质粒（下文称为穿梭质粒）（下文称为步骤 3），并且

[0127] (4) 从该穿梭质粒移除大肠杆菌复制起点（下文称为步骤 4）。

[0128] 每个步骤的操作可以按照文献中描述的已知方法实施。

[0129] 载体也可以通过将蛋白表达单元通过标准方法并入上文提及的不同穿梭质粒，然后通过标准方法类似地移除在大肠杆菌中发挥功能的质粒复制单元而构建，所述穿梭质粒例如穿梭质粒 pBLES100（专利公布 4）、pAV001（专利公布 5）、pBRASTA101（Tanaka et al., 2005, Biosci. Biotechnol. Biochem., 69(2):422-425）、pDG7、pEBM3、pECM2、pLP825 等（非专利公布 5）、pNTR500F、pCD540FT 等（专利公布 1 至 3），所述蛋白表达单元包含编码具有靶活性的给定蛋白的 DNA 和含有在厌氧微生物中发挥功能的启动子和终止子的 DNA 片段。

[0130] 此外, 以与上文本发明的质粒 pBifiCD 相同的方式, 其中含有大肠杆菌复制起点的片段的 pUC ori 从质粒 pAV001-HU-eCD-M968 (专利公布 6) 被移除, 本发明的载体也可以通过将在大肠杆菌中发挥功能的质粒复制单元从质粒 pNTR500F、pCD540FT (专利公布 1 至 3)、pBLES100-S-eCD (专利公布 4)、pAV001-HU-eCD (专利公布 5) 等移除来构建。

[0131] 此外, 本发明的载体也可以通过将被并入质粒 pNTR500F、pCD540FT (专利公布 1 至 3)、pBLES100-S-eCD (专利公布 4)、pAV001-HU-eCD (专利公布 5)、pAV001-HU-eCD-M968 (专利公布 6) 等的蛋白表达单元与另一给定蛋白表达单元重组, 然后从其中移除在大肠杆菌中发挥功能的质粒复制单元来构建。

[0132] 本发明的用于治疗缺氧疾病的基因转运体可以通过转化给定厌氧微生物来构建, 所述给定厌氧微生物按照已知遗传改造方法使用本发明的表达载体进行转化。

[0133] 因为通过本发明的表达载体转化的厌氧微生物是在用于治疗例如实体瘤的缺氧疾病的试剂中使用, 所以该厌氧微生物必须是专性厌氧且非致病的; 可以使用例如梭菌或沙门氏菌 (*Salmonella*) 的致病细菌, 如果它们成为非致病的, 并且可以使用例如乳酸杆菌的兼性厌氧菌, 如果它已突变为专性厌氧的。

[0134] 优选的实例包括非致病厌氧细菌; 非致病肠细菌是更优选的, 并且在它们中双歧杆菌是最优选的。

[0135] 双歧杆菌的实例包括青春双歧杆菌、动物双歧杆菌、婴儿双歧杆菌、嗜热双歧杆菌、假长双歧杆菌、双歧双歧杆菌、短双歧杆菌和长双歧杆菌, 并且长双歧杆菌是最优选的。

[0136] 这些细菌是商业上可获得的或容易地从保藏机构获得的。例如, 长双歧杆菌 ATCC-15707、双歧双歧杆菌 ATCC-11863、婴儿双歧杆菌 ATCC-15697 等可以容易地从 ATCC (美国模式培养物保藏中心 (The American Type Culture Collection)) 获得。

[0137] 每种细菌的菌株不是特殊限定的, 并且长双歧杆菌的菌株的实例包括长双歧杆菌 105-A 菌株、长双歧杆菌 aE-194b 菌株、长双歧杆菌 bs-601 菌株和长双歧杆菌 M101-2 菌株, 并且在它们中长双歧杆菌 105-A 菌株是优选的。

[0138] 短双歧杆菌的菌株的实例包括短双歧杆菌标准菌株 (JCM1192)、短双歧杆菌 aS-1 菌株和短双歧杆菌 I-53-8W 菌株, 并且在它们中短双歧杆菌标准菌株和短双歧杆菌 aS-1 菌株是优选的。

[0139] 婴儿双歧杆菌的菌株的实例包括婴儿双歧杆菌标准菌株 (JCM1222) 和婴儿双歧杆菌 I-10-5 菌株, 并且在它们中婴儿双歧杆菌标准菌株和婴儿双歧杆菌 I-10-5 菌株是优选的。

[0140] 此外, 乳双歧杆菌 (*Bifidobacterium lactentis*) 的菌株的实例包括乳双歧杆菌标准菌株 (JCM1220)。

[0141] 本发明的基因转运体是包含通过本发明的表达载体转化的厌氧微生物的基因转运体, 并且不是特殊限定的, 只要其能够在缺氧环境中的组织中生长并且能表达具有靶活性的蛋白, 此外, 具有很小的或没有被横向转移到除了所述转化体的细菌, 特别是横向转移到致病或需氧或兼性厌氧微生物的可能性。

[0142] 本发明的基因转运体的优选的实例包括这样的基因转运体, 其能够在缺氧环境中的肿瘤组织中生长, 并且能够表达具有将抗肿瘤物质前体转变为抗肿瘤物质的活性的蛋白。更优选的实例包括包含能够在缺氧环境中的肿瘤组织中生长的并且能够表

达将 5-FC 转变为 5-FU 的 CD 酶的双歧杆菌的基因转运体。特别优选的实例包括通过 pBifiCD 转化的长双歧杆菌 105-A 菌株 (长双歧杆菌 105-A/pBifiCD; NPMD 参考号 NITE ABP-491), 其在 2008 年 2 月 19 日保藏于独立行政法人技术与评价专利微生物保藏国立研究所 (Incorporated Administrative Agency National Institute of Technology and Evaluation Patent Microorganisms Depositary (NPMD)) (〒292-0818 日本千叶县木更津市かずさ鎌足 2-5-8), 登录号为 NITE BP-491。

[0143] 本发明的基因转运体可以按照商业实验教科书中描述的方法来构建, 例如 Gene Manual (基因手册) (Kodansha), Gene Manipulation Experimental Method (基因操作实验方法), Ed. 作者 Yasuyuki Takagi (Kodansha), Molecular Cloning (分子克隆), Cold Spring Harbor Laboratory (1982), Molecular Cloning 2nd Edition (分子克隆第 2 版), Cold Spring Harbor Laboratory (1989) 或 Methods in Enzymol. (酶学方法), 194 (1991)。

[0144] 本发明的药物组合物不是特殊限定的, 只要其含有本发明的基因转运体。此外, 本发明的缺氧疾病的治疗剂不是特殊限定的, 只要其含有本发明的基因转运体。

[0145] 此外, 本发明的用于缺氧疾病的药物组合物或治疗剂可以含有两种或更种的本发明的基因转运体。

[0146] 此外, 本发明的用于缺氧疾病的药物组合物或治疗剂可以与含有除了本发明的基因转运体的表现出缺氧疾病治疗效果的化合物的用于缺氧疾病药物组合物或治疗剂联合使用。

[0147] 此外, 本发明的用于缺氧疾病的药物组合物或治疗剂可以含有除了本发明的基因转运体的其他组分, 只要本发明的效果不受影响。这些其他组分的实例包括药学上可接受的支持物、赋形剂和稀释剂。

[0148] 本发明的药物组合物或缺氧疾病治疗剂的剂型不是特殊限定的, 并且其实例包括含有本发明的基因转运体的液体试剂或固体制剂。液体试剂可以通过纯化本发明的基因转运体的厌氧细菌的培养液, 按照要求向其添加适当的生理盐水、液体替换品或医药添加剂, 并用其填装安瓿、小瓶等而产生。固体制剂可以通过向液体试剂添加合适的保护剂, 用其填装安瓿、小瓶等, 并且然后冻干或 L-干燥而产生, 或通过向液体试剂添加合适的保护剂, 将其冻干或 L-干燥, 并且然后用其填装安瓿、小瓶等而产生。对于本发明药物组合物或缺氧疾病治疗剂的给药方法, 口服给药和肠胃外给药两者都是可以的, 但肠胃外给药是优选的, 例如可以进行静脉内注射、皮下注射、局部输注或脑室内给药, 并且静脉内注射是最优选的。

[0149] 本发明的药物组合物或缺氧疾病治疗剂的基因转运体的剂量不是特殊限定的, 只要其对于在疾病位置生长和表达有效治疗剂量的活性蛋白是足够的量。但是, 从经济观点和降低副作用的目的而言, 剂量优选地在能获得所需的治疗效果的范围内尽可能地小。

[0150] 本发明的用于缺氧疾病的药物组合物或治疗剂中的基因转运体的剂量根据疾病的严重程度和患者的体重、年龄或性别适当选择, 并且可以根据改善程度适当增加或减少。

[0151] 例如, 当将本发明的缺氧疾病治疗剂用作实体瘤治疗剂时, 根据厌氧微生物自身表现出的抗肿瘤活性、具有所使用的厌氧微生物产生的抗肿瘤活性的蛋白的类型、转变自抗肿瘤物质前体的抗肿瘤物质的有效治疗剂量、所使用的厌氧微生物产生的活性蛋白的量等来适当地确定剂量。

[0152] 具体地,在静脉内给药的情况下,因为降低例如由于大量细菌的栓塞风险是特别必需的,所以优选使用以尽可能低的浓度的注射,将注射分为多次注射或用适当的液体代替品稀释注射并且通过连续输注给药。例如,在成人的情况下,将每天 10^6 cfu 至 10^{12} cfu 每千克体重的本发明的厌氧微生物的细胞分为 1 至多次、视情况连续或间隔地进行给药,并且持续 1 天至多天。更具体地,每成人直接给予 1mL 至 1000mL 含有 10^4 cfu/mL 至 10^{10} cfu/mL 的本发明的厌氧微生物细胞的制剂,或用适当的液体代替品稀释,分为每天一次至多次进行给药,并且持续 1 天至连续几天。

[0153] 此外,在涉及直接对疾病组织直接给药的局部给药的情况下,因为需要细菌细胞在整个疾病组织中尽可能多地建群和增殖,所以在疾病组织的多个位置给予高浓度注射是可取得。例如,在成人的情况下,每天一次或多次给予 10^6 cfu 至 10^{12} cfu 每千克体重的本发明的厌氧微生物的细胞,视情况连续或间隔地进行给药,并且按照需要持续 1 天至多天。更具体地,每成人直接地给予 1mL 至 1000mL 含有 10^4 cfu/mL 至 10^{10} cfu/mL 的本发明的厌氧微生物的细胞的制剂直接地,优选每天一次至多次,并且按照需要连续地持续 1 天至几天。

[0154] 当在治疗期间观察到疾病组织中的细菌已消失,则首先暂停治疗,然后以如以上相似的方式给予细菌。

[0155] 当本发明的基因转运体或缺氧疾病治疗剂是厌氧细菌,其中插入了能够表达具有将抗肿瘤物质前体转变为抗肿瘤物质的活性的蛋白的基因时,将含有作为活性组分的基因转运体的本发明的药物组合物或用于实体瘤的治疗剂与一定量的可以通过所述基因转运体表达的蛋白转变为有效量的抗肿瘤物质的抗肿瘤物质前体联合使用。该抗肿瘤物质前体可以作为活性组分包含在含有本发明的基因转运体的药物组合物或用于实体瘤的治疗剂中,但是其优选用作含有抗肿瘤物质前体的药物组合物,该含有抗肿瘤物质前体的药物组合物与含有作为活性组分的本发明的基因转运体的药物组合物或用于实体瘤的治疗剂组合。

[0156] 用于本发明的抗肿瘤物质前体不是特殊限定的,只要其在前体(前药)状态时对于正常组织具有较少的副作用的抗肿瘤物质前体,并且在转变为抗肿瘤物质后对于作为治疗靶标的实体瘤具有高治疗效果。实例包括 5-FC,其是 5-FU 的前药;CB1945,其被转变为抗肿瘤活性烷化剂;更昔洛韦,其被转变为抗肿瘤活性代谢产物;以及葡糖醛酸化的抗肿瘤活物质。

[0157] 以这种方式,当将本发明的药物组合物或用于实体瘤的治疗剂与抗肿瘤物质前体联合使用时,给予本发明的药物组合物或用于实体瘤的治疗剂的方法可以与给予含有抗肿瘤物质前体的药物组合物的方法相同或不同,并且这些给药可以同时或在分别的时间进行;含有抗肿瘤物质前体的药物组合物的给药优选地在给予本发明的药物组合物或实体瘤治疗剂后,允许足够的时间以使本发明的基因转运体在肿瘤细胞上生长之后进行。

[0158] 此外,当将本发明的药物组合物或用于实体瘤的治疗剂与抗肿瘤物质前体联合使用时,因为基因转运体仅在缺氧环境中的肿瘤细胞组织中建群和增殖,并且在那里局部地产生活性蛋白,所以与使用普通抗肿瘤物质前体治疗实体瘤的方法相比,可以显著地抑制副作用,并且可以将抗肿瘤物质前体的剂量设定在宽范围内。

[0159] 含有抗肿瘤物质前体的药物组合物的形式不是特殊限定的,并且其可以是任何普通口服制剂,例如粉剂、片剂或胶囊剂;或肠胃外制剂,例如栓剂或注射剂。这样的药物组合

物可以通过普通药物方法生产。

[0160] 抗肿瘤物质前体的剂量可以根据联合使用的基因转运体在肿瘤组织中的生长速率和抗肿瘤物质前体转变为抗肿瘤物质的效率适当进行选择。以与基因转运体的剂量相同的方式,抗肿瘤物质前体的剂量可以根据疾病的严重程度和患者的体重、年龄或性别视情况进行选择,并且可以根据改善的程度视情况增加或减少。

[0161] 例如,在实际治疗中,剂量根据使用的抗肿瘤物质前体和转变的抗肿瘤物质的类型、转变自抗肿瘤物质前体的抗肿瘤物质的有效治疗剂量、具有将抗肿瘤物质前体转变为抗肿瘤物质的活性的厌氧微生物所产生的活性蛋白的类型以及使用的厌氧微生物所产生的活性蛋白的量等来适当设定。

[0162] 具体地,例如,当将含有作为活性组分的长双歧杆菌 105-A/pBifiCD(NITE BP-491) 的药物组合物和含有作为活性组分的抗肿瘤物质前体 5-FC 的药物组合物联合给药时,所述长双歧杆菌 105-A/pBifiCD 具有被引入其中的 CD 基因并且是本发明的基因转运体,在确认细菌已经在肿瘤组织中建群和增殖,并且细菌已经从血液和正常组织消失后,以 1mg/ 天至 100mg/ 天每成人千克体重、每天一次或多次、在治疗期间连续给予 5-FC。给药方法优选为口服给药,但是可以进行例如静脉内给药或肝门给药的肠胃外给药。

[0163] 本发明涉及的“X 和 Y 的组合”包括 X 和 Y 在不同配置(configuration) 的情况以及 X 和 Y 在相同配置的情况(例如含有 X 和 Y 的配置)。当 X 和 Y 在不同配置时,X 和 Y 可以各自另外含有另一组分。

[0164] 本发明的用于缺氧疾病的药物组合物或治疗剂可以应用于缺氧环境中的疾病,并且优选地应用于不同类型的实体癌。实体癌的实例包括大肠癌、脑瘤、头颈癌、乳腺癌、肺癌、食道癌、胃癌、肝癌、胆囊癌、胆管癌、胰腺癌、胰岛细胞癌、绒毛膜癌、结肠癌、肾细胞癌、肾上腺皮质癌、膀胱癌、睾丸癌、前列腺癌、睾丸肿瘤、卵巢癌、子宫癌、甲状腺癌、恶性类癌瘤、皮肤癌、恶性黑色素瘤、骨肉瘤、软组织肉瘤、成神经细胞瘤、维尔姆斯肿瘤(Wilm's tumor)、成视网膜细胞瘤、黑色素瘤和鳞癌。

[0165] 此外,在缺氧环境中的其他疾病的实例包括缺血性疾病,例如心肌梗死或闭塞性动脉硬化,以及下肢缺血性疾病,例如伯格病(Buerger's disease)。

实施例

[0166] 结合参考实施例和实施例,本发明在下文更具体地进行解释,但是本发明的技术范围不局限于这些实施例。

[0167] < 参考实施例 1>

[0168] DNA 模板的制备

[0169] 将在每个实施例中用作模板的质粒 DNA 的浓度使用 0.1×TE 调整至 10pg/ 微升并且贮存在 -30℃ 的冷冻柜中直到使用。用作模板的每个质粒 DNA 显示在下文表 1 中。

[0170] [表 1]

[0171] 表 1 质粒组分和这些组分在新质粒中的作用

[0172]

名称	质粒 组分	在新质粒中的作用
pBLES100	AAD 9 盒	SPCM 抗性基因(含有壮观霉素腺苷酸转移酶 CDS、其启动子、核糖体结合区、终止子)
pBLES100	pTB6 (OriV 和 RepB)	长双歧杆菌中的复制单元
pBluescript II SK+	pUC ori	大肠杆菌中的复制起点
pAV001-HU-eCD-M968	从 HU 启动子至 HU 终止子	CD 基因(含有 HU 启动子、核糖体结合区、HU-eCD-M968 CDS、终止子)

[0173] < 参考实施例 2>

[0174] 引物的制备

[0175] 将用于 PCR 扩增和用于检查的每个引物使用 0.1×TE 溶解以得到 100 μM 的储备液。将该储备液用 0.1×TE 进一步稀释以得到 20 μM 的引物溶液。将其贮存在 -30℃ 的冷冻柜中直到使用。使用的引物显示在下文表 2 中。

[0176] [表 2]

[0177] 表 2 用于质粒的构建和检查的引物

[0178]

引物名称	序列 (5'→3')	目的
pUCori_F1	AGAGAGATCTTGAGCAAAAGGCCAG <i>Bgl II</i>	扩增 pUC ori
pUCori_R1	GAGACTAGTGACTCGAGAAGGATCCGTAGAAAAGATCAAAG G <i>Bcu I Xho I BamH I</i>	
AAD9_F1	AGAACTAGTAGAAAGCTTAGAGTCGACTCGATTTTCGTTCC TG <i>Bcu I Hind III Sal I</i>	扩增 AAD9 盒
AAD9_R1	GAGAGATCTAAAAAATTGAAAAAGTGTTCACC <i>Bgl II</i>	
HUeCD_F3	AAGAGGATCCGTCTTCCTGCTGGCCTATGC <i>BamHI</i>	扩增 HU-eCD-M968
HUeCD_R1	AGAACTAGTCCGGAATAATACGGTTGGAC <i>Bcu I</i>	
HUeCD_内部R1	GCTACGAGCAGAAGGTCAACGTTTGTAATCGATGG	8
HUeCD_内部F1	CGATTACAAACGTTGACCTTCTGCTCGTAGCGATTACTTCG	
OriV-Rep_外部_F1	AGAACTAGTCTCCAGGACCTCGTCTACG <i>Bcu I</i>	扩增 OriV-Rep
OriV-Rep_外部_R1	AGAGTCGACAAGCCCCGAACAGGTGAAGGC <i>Sal I</i>	
OriV-Rep_内部_F1	CCGTTGAAGCCGGGAGTGCCGTTTCTGCGGTTTGAC	*1
OriV-Rep_内部_R1	GAAACGGCACTCCCCGGCTTCAACGGTGCCGTCGAAGTG	*1
Check 引物 F1	TGACTTAGAGGAATTACTACCTG	
Check 引物 R2	AAAGTGGCGGAAAGCGCCAC	

[0179] *1:破坏 memb B 的推定的核糖体结合位点和推定的翻译起始密码子

[0180] < 参考实施例 3>

[0181] 琼脂糖凝胶电泳

[0182] 每个下文实施例中的琼脂糖凝胶电泳按照以下进行。

[0183] 按照需要将样品使用 $0.1 \times \text{TE}$ 以 10 倍的级别稀释,并且对样品进行使用用于分析的 0.8%或 2%的琼脂糖凝胶和 $1 \times \text{TBE}$ 缓冲液(含有 $0.5 \mu\text{g/mL}$ 的溴化乙锭)的电泳。琼脂糖凝胶的浓度根据 DNA 样品的大小来确定。通过同时在不同泳道中将 DNA 分子量标记进行电泳来检查样品的 DNA 大小。

[0184] 当必须定量地测量样品时,使用例如 FastRuler DNA 梯、低范围 (Low Range) (Fermentas) 或 FastRuler DNA 梯、中等范围 (Middle Range) (Fermentas) 的定量标记。每个定量标记的条带的量为 5ng 至 50ng 的级别。

[0185] 电泳后,将凝胶用 UV 照射,并且通过比较定量标记的 DNA 浓度和样品的 DNA 浓度来估计样品的 DNA 浓度。

[0186] < 实施例 1>

[0187] 选择标记质粒 (pSPCM-pUC ori) 的构建 (步骤 1)

[0188] 质粒 pSPCM-pUC ori 按照下文操作构建。

[0189] (1)pUC ori 片段的制备 (约 700bp)

[0190] 用于 pUC ori 的 PCR 扩增条件的检查

[0191] 使用 pBluescript II SK+ 作为模板,通过向灭菌的 0.2mL PCR 管 (Bio-BIK) 中添加 $5 \mu\text{l}$ 的 $10\text{pg}/\mu\text{l}$ pBluescript II SK+、 $10 \mu\text{l}$ 的 $5 \times \text{PrimeStar}^{\text{TM}}$ 缓冲液、 $4 \mu\text{l}$ 的 dNTP 混合物 (每种 2.5mM)、 $0.5 \mu\text{l}$ 的 $20 \mu\text{M}$ pUC ori-F1 引物、 $0.5 \mu\text{l}$ 的 $20 \mu\text{M}$ pUC ori-R1 引物、 $0.5 \mu\text{l}$ 的 PrimeSTAR^{HS} DNA 聚合酶和 $29.5 \mu\text{l}$ 的无菌纯净水来在冰上制备 PCR 混合物。

[0192] 热循环仪按照下文条件设定,在块温度 (block temperature) 达到 98°C 后,将管置于其上,并且进行 PCR。

[0193] [Math. 1]

[0194]

变性	98°C 10 秒	} ×30 循环
退火	45°C 5 秒	
延伸	72°C 40 秒	

[0195] 72°C 60 秒

[0196] 4°C ∞

[0197] PCR 完成后,将 $1 \mu\text{l}$ 和 $3 \mu\text{l}$ 的反应混合物进行参考实施例 3 中所示的琼脂糖凝胶电泳,从而检查 PCR 产物。作为凝胶,使用 2%分析琼脂糖凝胶。

[0198] 根据琼脂糖凝胶分析的结果,确认了存在约 700bp 的靶单一条带的扩增,并且产量为约 $1 \mu\text{g}$ 。

[0199] 另外的 PCR

[0200] 按照上文设定的条件进行 5 管另外的 PCR,并且总计获得约 $10 \mu\text{g}$ 的 PCR 产物。

[0201] 纯化 (蛋白去除和浓缩)

[0202] 将所有的 PCR 反应混合物合并后,使用 QIA 快速 PCR 纯化试剂盒 (Qiagen) 将它们纯化,并且通过标准方法去除引物和蛋白。对于 DNA 洗脱,使用 $50 \mu\text{l}$ 的 $0.1 \times \text{TE}$ 。

[0203] 将纯化的 PCR 产物用 $0.1 \times \text{TE}$ 稀释 10 倍,并且使用琼脂糖凝胶电泳来定量。作为

凝胶,使用 2%分析琼脂糖凝胶。

[0204] 用限制性酶处理 PCR 产物

[0205] 按照以下使用限制性酶 Bcu I 和 Bgl II 切割纯化的 PCR 产物。

[0206] 将 10 μ l 的 10 $\times$ 0 缓冲液(酶附带的缓冲液)和 55 单位的 Bgl II 加入 5 μ g 的纯化的 PCR 产物,并且使用 0.1 $\times$ TE 将总量补足为 100 μ l。37 $^{\circ}$ C 下孵育 2 小时后,按照参考实施例 4 中所述的方法去除蛋白。将 30 μ l 的 10 $\times$ Tango 缓冲液(酶附带的缓冲液)和 255 单位的 Bcu I 加入其中,并且使用 0.1 $\times$ TE 将总量补足为 300 μ l。37 $^{\circ}$ C 下孵育 2 小时后,使用 QIA 快速 PCR 纯化试剂盒(Qiagen)将混合物纯化,并且用 50 μ l 的 0.1 $\times$ TE 洗脱。

[0207] 通过琼脂糖凝胶分级和切除

[0208] 将由限制性酶所切割的 PCR 产物及其 1/10 的量的 10 $\times$ 上样缓冲液(loading buffer)(Takara Bio Inc.)充分混合以得到用于电泳的样品。将用于纯化的 2%琼脂糖凝胶放置在装有 1 $\times$ TAE 缓冲液(具有 0.5 μ g/mL 的溴化乙锭)的电泳槽中(Mupid,Cosmo Bio Co.,Ltd.),将电泳样品置于其上,并且在低温房间中(设定为 4 $^{\circ}$ C)以 50V 进行电泳。分子量标记(FastRuler DNA 梯,低范围,Fermentas)在单独的泳道中同时行进。

[0209] 通过 UV 手持监测器(UVP),用 365nm 的 UV 照射琼脂糖凝胶来确定 DNA 迁移。开始电泳后 130 分钟,当约 700bp 的靶条带达到约 1/2 凝胶长度的位置时,停止电泳,并且将凝胶从电泳槽中取出。

[0210] 在用 365nm 的 UV 照射凝胶的同时,使用灭菌的刀片(无菌手术刀片(Sterile Surgical Blades),Ruettgers HmbH&Co.KG)切下靶 DNA 条带。精细地将切下的凝胶切片,并且置于灭菌的 2mL 微型管中,预先测量了所述微型管的重量。

[0211] 从琼脂糖凝胶洗脱 DNA

[0212] 测量装有切下的凝胶的 2mL 微型管的重量,并且通过从其中减去预先测量的空管的重量来计算凝胶重量。使用 QIA 快速凝胶提取试剂盒,按照产品说明书从凝胶中提取 DNA。最终步骤中的 DNA 的洗脱使用 50 μ l 的 0.1 $\times$ TE。

[0213] 将部分的纯化的 PCR 产物用 0.1 $\times$ TE 稀释 10 倍,并且使用分光光度计定量分析纯化的 PCR 产物。使用 2%分析琼脂糖凝胶进行琼脂糖凝胶电泳。

[0214] 对于进行了 PCR 产物限制性酶处理、DNA 片段从琼脂糖凝胶的切除和纯化的 DNA 片段,确认了在琼脂糖凝胶分析中得到了单一条带。此外,根据通过使用吸收比色计的 DNA 测量的浓度测量结果,浓度为 66ng/ μ l。此外,表明纯度的 A260/280 比值为 1.911。

[0215] (2)AAD9 片段(约 1.1kbp)的制备

[0216] 用于 AAD9 基因的 PCR 扩增条件的检查

[0217] 使用 pBLES100 作为模板,通过向灭菌的 0.2mL PCR 管(Bio-BIK)中添加 5 μ l 的 10pg/ μ l pBLES100、10 μ l 的 5 $\times$ PrimeStarTM 缓冲液、4 μ l 的 dNTP 混合物(每种 2.5mM)、0.5 μ l 的 20 μ M AAD9-F1 引物、0.5 μ l 的 20 μ M AAD9-R1 引物、0.5 μ l 的 PrimeSTAR^{HS} DNA 聚合酶和 29.5 μ l 的无菌纯净水在冰上制备 PCR 混合物。

[0218] 热循环仪按照下文条件设定,在块温度达到 98 $^{\circ}$ C 后,将管置于其上,并且进行 PCR。

[0219] [Math. 2]

[0220]

变性	98°C 10 秒	} ×30 循环
退火	45°C 5 秒	
延伸	72°C 60 秒	

[0221] 72°C 60 秒

[0222] 4°C ∞

[0223] PCR 完成后,将 1 μl 和 3 μl 的反应混合物进行琼脂糖凝胶电泳,从而检查 PCR 产物。作为凝胶,使用 2% 分析琼脂糖凝胶。

[0224] 根据琼脂糖凝胶分析的结果,确认了存在约 1.1 kbp 的靶单一条带的扩增。产量为约 1 μg。

[0225] 另外的 PCR

[0226] 以如上文相同的方式,进行 5 管的另外的 PCR,并且总计获得约 10 μg 的 PCR 产物。

[0227] 纯化(蛋白去除和浓缩)

[0228] 将所有的 PCR 反应混合物合并后,使用 QIA 快速 PCR 纯化试剂盒将它们纯化,并且通过标准方法去除引物和蛋白。对于 DNA 洗脱,使用 50 μl 的 0.1×TE。

[0229] 将纯化的 PCR 产物用 0.1×TE 稀释 10 倍,并且使用琼脂糖凝胶电泳来定量。作为凝胶,使用 2% 分析琼脂糖凝胶。

[0230] 用限制性酶处理 PCR 产物

[0231] 按照以下使用限制性酶 Bcu I 和 Bgl II 切割纯化的 PCR 产物。

[0232] 将 10 μl 的 10×0 缓冲液(酶附带的缓冲液)和 36 单位的 Bgl II 加入 5 μg 的纯化的 PCR 产物,并且使用 0.1×TE 将总量补足为 100 μl。37°C 下孵育 2 小时后,去除蛋白。将 30 μl 的 10×Tango 缓冲液(酶附带的缓冲液)和 165 单位的 Bcu I 加入其中,并且使用 0.1×TE 将总量补足为 300 μl。37°C 下孵育 2 小时后,使用 QIA 快速 PCR 纯化试剂盒将混合物纯化,并且用 50 μl 的 0.1×TE 洗脱。

[0233] 通过琼脂糖凝胶分级和切除

[0234] 通过与上文提及的“通过琼脂糖凝胶分级和切除”中相同的方法,将由限制性酶切割的 PCR 产物通过将其进行电泳 130 分钟来分级,并且切下约 1.1 kbp 的靶条带。作为凝胶,使用 0.8% 琼脂糖凝胶用于纯化。

[0235] 从琼脂糖凝胶洗脱 DNA

[0236] 测量装有切下的凝胶的 2mL 微型管的重量,并且通过从其中减去预先测量的空管的重量来计算凝胶重量。使用 QIA 快速凝胶提取试剂盒,按照产品说明书从凝胶中提取 DNA。最终步骤中的 DNA 的洗脱使用 50 μl 的 0.1×TE。

[0237] 将部分的纯化的 PCR 产物用 0.1×TE 稀释 10 倍,并且使用分光光度计定量分析纯化的 PCR 产物。使用 2% 分析琼脂糖凝胶进行电泳。

[0238] 对于进行了 PCR 产物限制性酶处理、DNA 片段从琼脂糖凝胶的切除和纯化的 DNA 片段,确认了在琼脂糖凝胶分析中得到了单一条带。此外,根据通过使用吸收比色计的 DNA 测量的浓度测量结果中,浓度为 40ng/μl。此外,表明纯度的 A260/280 比值为 1.927。

[0239] (3)pUC ori 片段和 AAD9 片段的连接

[0240] 连接反应混合物(反应混合物 1)通过在冰上,于灭菌的 0.2mL PCR 管(Bio-BIK)

中,混合以下进行制备:4 μ l 的 5 $\times$ 快速连接缓冲液、0.75 μ l (50ng) 的 pUC ori 片段 (66ng/ μ l)、6.25 μ l (250ng) 的 AAD9 片段 (40ng/ μ l)、1 μ l 的 5u/ μ l T4 DNA 连接酶和 8 μ l 的 0.1 $\times$ TE,从而纯化的 pUC ori 片段 (约 700bp) 与纯化的 AAD9 片段 (约 1.1kbp) 的摩尔比为 1 : 3,并且其重量比为 1 : 5。

[0241] 作为对照,反应混合物 (反应混合物 2) 仅用纯化的 AAD9 片段来制备。即,将 4 μ l 的 5 $\times$ 快速连接缓冲液、6.25 μ l (250ng) 的 AAD9 片段 (40ng/ μ l)、1 μ l 的 5u/ μ l T4 DNA 连接酶和 8.75 μ l 的 0.1 $\times$ TE 在冰上混合,从而得到连接反应混合物 (反应混合物 2)。

[0242] 因为 AAD9 片段使用质粒 pBLES 100 (专利公布 4:JP,A,2002-97144) 作为模板,所以即使添加了少量的质粒 pBLES 100,在转化大肠杆菌的后续步骤后,其形成作为背景的菌落 (colony)。将反应混合物 2 用作用于检查该背景的对照。

[0243] 热循环仪按照下文条件设定,在块温度达到 22 $^{\circ}$ C 后,将管置于其上,并且进行连接。

[0244] [Math. 3]

[0245] 22 $^{\circ}$ C 5 分钟 (连接反应)

[0246] 65 $^{\circ}$ C 5 分钟 (反应停止)

[0247] 4 $^{\circ}$ C ∞

[0248] (4) 大肠杆菌的转化

[0249] 连接反应后,使用 1 μ l 的溶液通过热休克来转化大肠杆菌 JM109。用于转化的操作过程按照 Takara 大肠杆菌 JM109 感受态细胞 (Takara Bio Inc.) 的产品说明书中所述的方法进行。对于转化后的 SOC 悬液,将 100 μ l 的原始液体和 100 μ l 用 SOC 稀释的 10 倍稀释液涂板于两块 LB 琼脂培养基上 (含有 75 μ g/mL SPCM)。将用使用连接反应混合物 1 和 2 转化的大肠杆菌接种的平板分别定义为平板 1 和 2。将这些平板置于设定为 37 $^{\circ}$ C 的培养箱中并过夜培养。计数了平板上形成的菌落数。

[0250] 当使用纯化的 pUC ori 片段和纯化的 AAD9 片段 (连接反应混合物 1) 的连接产物进行转化时,每 100 μ l 的 10 倍稀释的细菌液体在选择培养基上形成了 28 和 37 个菌落,但是当使用对照的反应混合物 2 进行转化时,未形成菌落。背景非常低,这表明良好地进行了连接和转化。

[0251] (5) 检查质粒

[0252] 重组大肠杆菌的培养

[0253] 随机选择了上文平板 1 上的 6 个菌落,并且使用它们进行培养。用 20mL 的 2 $\times$ LB 填充灭菌的 100mL 玻璃锥形瓶,并且向其中添加 20 μ l 的 75mg/mL 壮观霉素并充分混合。使用铂环钓起 (fish) 每个菌落,并且在上文提及的培养基中悬浮。将它们置于设定为 37 $^{\circ}$ C 的摇动培养箱中,并且于 37 $^{\circ}$ C 下在摇动的同时培养 19.5 小时。

[0254] 质粒 DNA 的提取

[0255] 将 1.5mL 的每种培养液置于两个灭菌的 2mL 微型管中。将剩余的培养液留在冰上直到完成质粒的提取。使用 GeneEluteTM 质粒 Miniprep 试剂盒 (GeneEluteTM Plasmid Miniprep Kit),按照试剂盒的产品说明书,从分配的培养液提取质粒 DNA。对于最终步骤中质粒 DNA 的洗脱,使用 50 μ l 的 0.1 $\times$ TE。

[0256] 质粒 DNA 浓度的测量

[0257] 将上文提取的质粒用 $0.1 \times \text{TE}$ 稀释 20 倍,通过分光光度计测量 DNA 浓度,并且通过 A260/280 比值检查质量。

[0258] 根据进行两次从重组大肠杆菌提取质粒的结果,表明 DNA 纯度的 A260/280 比值为 1.944 至 1.972,并且质粒 DNA 的纯度良好。当合并两种提取物时,产量为至少 $5 \mu\text{g}$ 。

[0259] 限制性酶切割

[0260] 使用 100ng 的质粒 DNA 进行 Bcu I 独自的切割、Bgl II 独自的切割以及 Bcu I 和 Bgl II 两者的切割。反应条件按照酶的产品说明书。反应体积为 $20 \mu\text{l}$ 。

[0261] 对于所有 6 个菌落菌株,当进行两种类型的酶 Bcu I 和 Bgl II 的切割时,检测到约 700bp 和约 1.1kbp 的两个条带。

[0262] 此外,当进行 Bcu I 或 Bgl II 中单一酶的切割时,检测到约 1.8kbp 的一个条带。这表明对于所有菌株,质粒大小和组成正如所设计的。

[0263] 检查质粒 DNA 序列

[0264] 将 $20 \mu\text{l}$ 的由上文的限制性酶切割的质粒 DNA 溶液与 $2 \mu\text{l}$ 的 $10 \times$ 上样缓冲液充分混合,并且将该混合物通过标准方法进行电泳。

[0265] 利用 BigDye Terminator v3.1 循环测序试剂盒 (BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit),使用通过上文的电泳提取的质粒,进行测序反应。作为测序引物,使用了显示在下文表 3 中的引物对 1 和 2。

[0266] 使用 GENETY(R)ATSQ 分析软件 (Genetyx 公司) 进行序列的比对。将比对后的质粒核苷酸序列与设计的序列 (SEQ ID NO:1) 进行比较。

[0267] 在 6 个菌株中,4 个菌株的质粒序列与设计的 SEQ ID NO:1 的序列匹配,但是剩余的 2 个质粒菌株分别具有核苷酸取代和缺失。

[0268] 从与 SEQ ID NO:1 匹配的 4 个菌株中选择一个菌株,并且将从该菌株提取的质粒定义为“pSPCM-pUC ori”。

[0269] [表 3]

[0270] 表 3 测序引物

[0271]

引物名称	序列 (5'→3')	对
37_R_5181	AAA TAT CTC TTG CCA GTC AC	对 1
060723-spmsec	CAT GTT TGG ATC AGG AGT TGA G	对 1
41_F-seq13	AGC AAG AAA TGG TAC CGT GG	对 1
060219-pAV001-2	TTT GCT TGG TAA AGC ATT ATG G	对 1
42_F-seq_28 下游	GAC TTA GAG GAA TTA CTA CC	对 1
38_F_5980	ATA CCA AAA GAT ATT GCG GG	对 1
060723-spmsec	AAT GGA GAA GAT TCA GCC ACT G	对 1
pUC ori-1	AAG GCC AGC AAA AGG C	对 2
060219-pAV001-3	GAC GAT AGT TAC CGG ATA AGG C	对 2
060219-pAV001-3	GCC TTA TCC GGT AAC TAT CGT C	对 2
40_R-seq_16 下游	ATT AGC AGA GCG AGG TAT GT	对 2
39_R_6495	GCA AGC AGC AGA TTA CGC GC	对 2
HU IV (F)	AGT GCC GCA GGG CGT	对 3
HU IV (R)	ACG CCC TGC GGC ACT	对 3
060403_HU 上游 克隆	TTT GCT TAG TCC ATG TTG TCA TCA	对 3
pAVeCD1482_atg	ATG GCA TAC AAC AAG TCT GAC CTC	对 3
CD seq (F)	GCG CAT GGC AAA CGC TGA AAT GGC AGA TTG	对 3
CD seq (R)	GTG ATG CCG CGA CGT TTT GGA TAC GTA TCG	对 3
CD892_D314A	CGC GTT AAA GAG ATG CTG GAG T	对 3
R-pTB6 R7	GTC TGG GGA GTC CTG CGT TC	对 4
pBLES100 F3	TAT GCT GAG GCC ATG TCC AAT GAG A	对 4
R-pTB6 R6	GTC AGG TCG TTG AGC AGG AAC	对 4
pTB6 F5 (pBLES100 F5)	GAA GAT CGA GCG CCA GTA CGT GAA	对 4
060219-pAV001-1	GTG AAC ACC TCG CCG TAC C	对 4
36_F_4754	CAA CCG CGA ACA TCA TGC GC	对 4

[0272] < 实施例 2>

[0273] 选择标记活性蛋白质粒 (pHU-eCDm-SPCM-pUC ori) 的构建 (步骤 2)

[0274] (1) 线性质粒 pSPCM-pUC ori 的制备

[0275] 质粒的切割

[0276] 使用限制性酶 Bcu I、Xho I 和 Bam HI, 按下文所述, 切割 pSPCM-pUC ori。进行 Xho I 的切割是为了抑制在未切割的质粒转化时的背景。

[0277] 将 25 μ l 的 10 $\times$ Tango 缓冲液（酶附带的缓冲液）和 100 单位的 Bcu I 添加到 5 μ g 的 pSPCM-pUC ori, 并且使用 0.1 $\times$ TE 将总量补足为 250 μ l。37 $^{\circ}$ C 下孵育 2 小时后, 取出其中 100ng, 并使用 0.8% 分析琼脂糖凝胶确认了已完成分解。

[0278] 在等待确认时, 将含有酶反应混合物的管在冰上保存。确认切割后, 从酶反应混合物中去除蛋白。

[0279] 将 20 μ l 的 10 $\times$ Bam HI 缓冲液（酶附带的缓冲液）和 80 单位的 Bam HI 添加到其中, 并使用 0.1 $\times$ TE 将总量补足到 200 μ l。37 $^{\circ}$ C 下孵育 2 小时后, 取出其中 100ng, 并使用 0.8% 分析琼脂糖凝胶确认了 DNA 未经历内部分解。

[0280] 在等待确认时, 将含有酶反应混合物的管在冰上保存。确认切割后, 从酶反应混合物中去除蛋白。

[0281] 将 50 μ l 的 10 $\times$ R 缓冲液（酶附带的缓冲液）和 400 单位的 Xho I 添加到其中, 并使用 0.1 $\times$ TE 将总量补足到 500 μ l。37 $^{\circ}$ C 下孵育 2 小时后, 从酶反应混合物中去除蛋白。

[0282] 通过琼脂糖凝胶分级和切除

[0283] 通过与实施例 1 中描述的“通过琼脂糖凝胶分级和切除”中相同的方法, 将由限制性酶切割的载体通过将其电泳 75 分钟来进行分级, 并且切下约 1.8kbp 的靶条带。作为凝胶, 使用 0.8% 琼脂糖凝胶用于纯化。作为分子量标记, 使用了 FastRuler DNA 梯, 中等范围 (Fermentas)。

[0284] 从琼脂糖凝胶洗脱 DNA

[0285] 通过与实施例 1 中描述的“从琼脂糖凝胶洗脱 DNA”中相同的方法, 从上文切下的凝胶洗脱 DNA。

[0286] 将部分的进行了琼脂糖凝胶纯化的载体使用 0.1 $\times$ TE 稀释 3 倍, 并通过分光光度计进行定量分析。对于制备的载体是否为约 1.8kbp 的单一一条带, 使用 0.8% 分析琼脂糖凝胶进行了确认。

[0287] 对于进行了质粒 pSPCM-pUC ori 限制性酶处理、从琼脂糖凝胶的 DNA 片段切除和纯化的 DNA 片段, 确认了在琼脂糖凝胶分析中得到了单一一条带。在使用吸收比色计的 DNA 测量中, 浓度为 21ng/ μ l。此外, 表明纯度的 A260/280 比值为 2.049。

[0288] (2) 插入物 (HU-eCD 片段) 的制备

[0289] 使用质粒 pAV001-HU-eCD-M968 (专利公布 5:WO 2007/136107), 通过 PCR 扩增了含有 HU-eCD-M968 (双歧杆菌的 HU 蛋白的 N-末端 9 个氨基酸和大肠杆菌来源的 CD 被融合, 并且为了增强对底物 5-FC 的亲合力在其中引入变异的蛋白)、HU 启动子和 HU 终止子的 DNA 片段。

[0290] 按照以下进行两个阶段的 PCR (第一 PCR 和第二 PCR), 并制备了 HU-eCD 片段。

[0291] 第一 PCR

[0292] 用于 PCR 扩增的条件检查

[0293] 检查两种类型片段 (HU-eCD 片段 1 和 HU-eCD 片段 2) 的 PCR 扩增条件。

[0294] 使用 pAV001-HU-eCD-M968 作为模板, 通过向灭菌的 0.2mL PCR 管 (Bio-BIK) 中添加 5 μ l 的 10pg/mL pAV001-HU-eCD-M968、10 μ l 的 5 $\times$ PrimeStarTM 缓冲液、4 μ l 的 dNTP 混合物 (每种 2.5mM)、0.5 μ l 的 20 μ M HUeCD F3 引物、0.5 μ l 的 20 μ M HUeCD 内部 R1 引物、0.5 μ l 的 PrimeSTAR^{HS} DNA 聚合酶和 29.5 μ l 的 0.1 $\times$ TE 来在冰上制备 PCR 混合物 (HU-eCD

片段 1)。以相同方式制备 3 管该混合物。

[0295] 热循环仪按照下文条件设定,在块温度达到 98℃后,将管置于其上,并且进行 PCR。

[0296] [Math. 4]

[0297]

变性	98℃ 10 秒	} ×30 循环
退火	55℃ 5 秒	
延伸	72℃ 100 秒	

[0298] 72℃ 60 秒

[0299] 4℃ ∞

[0300] 以相同方式,使用 pAV001-HU-eCD-M968 作为模板,通过向灭菌的 0.2mLPCR 管 (Bio-BIK) 中添加 5 μl 的 10pg/mL pAV001-HU-eCD-M968、10 μl 的 5×PrimeStar™ 缓冲液、4 μl 的 dNTP 混合物 (每种 2.5mM)、0.5 μl 的 20 μM HUeCD 内部 F1 引物、0.5 μl 的 20 μM HUeCD R1 引物、0.5 μl 的 PrimeSTAR^{HS} DNA 聚合酶和 29.5 μl 的 0.1×TE 来在冰上制备 PCR 混合物 (HU-eCD 片段 2)。以相同方式制备 8 管该混合物。

[0301] 以相同方式,热循环仪按照下文条件设定,在块温度达到 98℃后,将管置于其上,并且进行 PCR。

[0302] [Math. 5]

[0303]

变性	98℃ 10 秒	} ×30 循环
退火	55℃ 5 秒	
延伸	72℃ 6 秒	

[0304] 72℃ 60 秒

[0305] 4℃ ∞

[0306] PCR 完成后,将反应混合物合并于一管中。

[0307] PCR 完成后,使用 1 μl 和 3 μl 的反应混合物检查 PCR 产物。为检查 HU-eCD 片段 1 和 2,分别使用 0.8% 分析琼脂糖凝胶和 2% 分析琼脂糖凝胶。

[0308] 根据 HUeCD 片段 1 的 PCR 产物的琼脂糖凝胶分析的结果,确认了存在约 1.7kbp 的靶单一条带的扩增。产量为至少 4.5 μg。

[0309] 此外,在 HUeCD 片段 2 的 PCR 产物的琼脂糖凝胶分析中,确认了存在约 150bp 的靶单一条带的扩增。产量为约 8 μg。

[0310] 通过 PCR 纯化试剂盒的纯化

[0311] 按照 QIA 快速 PCR 纯化试剂盒的操作手册,将 PCR 产物进行纯化,从而去除引物。纯化的最终步骤中的 DNA 的洗脱使用 50 μl 的 0.1×TE。

[0312] PCR 产物通过琼脂糖凝胶分级和切除

[0313] 通过与上文提及的“通过琼脂糖凝胶分级和切除”中相同的方法将纯化的 PCR 产物分级。HU-eCD 片段 1 使用用于纯化的 0.8% 琼脂糖凝胶进行电泳 65 分钟,并且切下约

1.7kbp 的靶条带。HU-eCD 片段 2 使用用于纯化的 2% 琼脂糖凝胶进行电泳 65 分钟,并且切下约 150bp 的靶条带。

[0314] 从琼脂糖凝胶洗脱 DNA

[0315] 通过与上文“从琼脂糖凝胶洗脱 DNA”中相同的方法,从上文切下的凝胶洗脱 DNA。

[0316] 纯化的 PCR 产物的定量分析

[0317] 将部分的纯化的 PCR 产物使用 $0.1 \times \text{TE}$ 稀释 3 倍,并且通过分光光度计定量分析。HU-eCD 片段 1 的浓度和 HU-eCD 片段 2 的浓度都为 $47\text{ng}/\mu\text{l}$,并且产量为约 $2.3\mu\text{g}$ 。

[0318] 第二 PCR

[0319] 用于 PCR 扩增的条件检查

[0320] 将纯化的 HU-eCD 片段 1 和纯化的 HU-eCD 片段 2 用作模板,并且检查了用于连接它们的 PCR 条件。

[0321] 模板的制备

[0322] 将 517ng 纯化的 HU-eCD 片段 1 (约 1.7kbp) 和 47ng 纯化的 HU-eCD 片段 2 (约 150bp) 混合,并且使用 $0.1 \times \text{TE}$ 将浓度调整为 $1\text{ng}/\mu\text{l}$ 。两种片段的摩尔比为 1 : 1。

[0323] 引物混合物的制备

[0324] 将 $10\mu\text{l}$ 的 $20\mu\text{M}$ HUeCD F3 引物和 $10\mu\text{l}$ 的 $20\mu\text{M}$ HUeCD R1 引物等量混合。

[0325] PCR 混合物的制备

[0326] 将 $1\mu\text{l}$ 的 $1\text{ng}/\mu\text{l}$ HU-eCD 片段 1 和 2 混合物、 $10\mu\text{l}$ 的 $5 \times \text{PrimeStar}^{\text{TM}}$ 缓冲液、 $4\mu\text{l}$ 的 dNTP 混合物 (每种 2.5mM)、 $0.5\mu\text{l}$ 的 $\text{PrimeSTAR}^{\text{HS}}$ DNA 聚合酶和 $32.5\mu\text{l}$ 的 $0.1 \times \text{TE}$ 添加到灭菌的 0.2mL PCR 管 (Bio-BIK),并且在冰上进行混合,从而得到 PCR 反应混合物。以相同方式制备装有该反应混合物的 3 个管。

[0327] 热循环仪按照下文条件设定,在块温度达到 98°C 后,将管置于其上,将 98°C 持续 10 秒和 72°C 持续 100 秒的循环进行 5 个循环,然后在 72°C 下添加 $2\mu\text{l}$ 的上文制备的引物混合物并且与其混合,并且在热循环仪中进行下文的反应。反应完成后,将三个 PCR 管中的反应混合物合并到一管中。

[0328] [Math. 6]

[0329]

变性	98°C 10 秒	} $\times 30$ 循环
退火	60°C 5 秒	
延伸	72°C 100 秒	

[0330] 72°C 60 秒

[0331] 4°C ∞

[0332] PCR 完成后,将 $1\mu\text{l}$ 和 $3\mu\text{l}$ 的反应混合物使用 0.8% 分析琼脂糖凝胶和 $1 \times \text{TBE}$ 缓冲液 ($0.5\mu\text{g}/\text{mL}$ 溴化乙锭) 进行电泳。

[0333] 第二 PCR 片段的琼脂糖凝胶分析确认了存在约 1.8kbp 的靶单一条带的扩增。产量为约 $13\mu\text{g}$ 。

[0334] 通过 PCR 纯化试剂盒的纯化

[0335] 按照 QIA 快速 PCR 纯化试剂盒的操作手册,将 PCR 产物进行纯化,从而去除引物。

纯化的最终步骤中的 DNA 的洗脱使用 50 μ l 的 0.1 $\times$ TE。

[0336] 将部分的去除了引物的 PCR 产物用 0.1 $\times$ TE 稀释 50 倍,并通过分光光度计定量分析。

[0337] 用限制性酶处理 PCR 产物

[0338] 使用限制性酶 Bcu I 和 Bam HI 切割纯化的 PCR 产物。

[0339] 将 25 μ l 的 10 $\times$ Tango 缓冲液(酶附带的缓冲液)和 100 单位的 Bcu I 添加到 5 μ g 的纯化的 PCR 产物,并且使用 0.1 $\times$ TE 将总量补足为 250 μ l。37 $^{\circ}$ C 下孵育 2 小时后,取出其中 100ng,并使用 0.8% 分析琼脂糖凝胶确认 DNA 未经历内部分解。

[0340] 在等待确认时,将含有酶反应混合物的管在冰上保存。通过电泳进行确认后,从酶反应混合物中去除蛋白。

[0341] 将 20 μ l 的 10 $\times$ Bam HI 缓冲液(酶附带的缓冲液)和 80 单位的 Bam HI 添加到其中,并使用 0.1 $\times$ TE 将总量补足到 200 μ l。37 $^{\circ}$ C 下孵育 2 小时后,取出其中 100ng,并使用 0.8% 分析琼脂糖凝胶确认 DNA 未经历内部分解。

[0342] 在等待确认时,将含有酶反应混合物的管在冰上保存。通过电泳进行确认后,使用 QIA 快速 PCR 纯化试剂盒来纯化该酶反应混合物。

[0343] 通过琼脂糖凝胶分级和切除

[0344] 通过与上文提及的“通过琼脂糖凝胶分级和切除”中相同的方法将由限制性酶切割的 PCR 产物分级,并且切下约 1.8kbp 的靶条带。作为凝胶,使用了用于纯化的 0.8% 琼脂糖凝胶,并且开始电泳后 75 分钟,当约 1.8kbp 的靶条带达到约 1/3 凝胶长度的位置时,停止电泳。作为 DNA 分子量标记,使用了 FastRuler DNA 梯,中等范围 (Fermentas)。

[0345] 从琼脂糖凝胶洗脱 DNA

[0346] 通过与上文“从琼脂糖凝胶洗脱 DNA”中相同的方法,从上文切下的凝胶洗脱 DNA。

[0347] 将部分的进行了琼脂糖凝胶纯化的 PCR 产物使用 0.1 $\times$ TE 稀释 3 倍,并通过分光光度计定量分析。使用 0.8% 分析琼脂糖凝胶通过电泳进行确认。在 PCR 产物进行限制性酶处理和琼脂糖凝胶纯化后,通过吸收比色计测量 DNA 浓度,并且结果为 41ng/ μ l。此外,表明纯度的 A260/280 比值为 1.932。此外,在使用琼脂糖凝胶的电泳分析中,存在约 1.8kbp 的单一条带。

[0348] (3) 线性 pSPCM-pUC ori 和 HU-eCD 片段的连接

[0349] 按照以下制备连接反应混合物(反应混合物 1)和对照反应混合物(反应混合物 2 和反应混合物 3)。

[0350] 反应混合物 1

[0351] 将 4 μ l 的 5 $\times$ 快速连接缓冲液、2.4 μ l (50ng) 的 pSPCM-pUC ori (21ng/ μ l)、3.7 μ l (150ng) 的 HU-eCD 片段 (41ng/ μ l)、1 μ l 的 5u/ μ l T4 DNA 连接酶和 8.9 μ l 的 0.1 $\times$ TE 添加到 0.2mL PCR 管 (Bio-BIK),这样线性 pSPCM-pUC ori (约 1.8kbp) 和 HU-eCD 片段 (约 1.8kbp) 的摩尔比为 1 : 3 (重量比也是 1 : 3),并在冰上进行混合,从而得到连接反应混合物 (反应混合物 1)。

[0352] 反应混合物 2

[0353] 类似地,将 4 μ l 的 5 $\times$ 快速连接缓冲液、2.4 μ l (50ng) 的 pSPCM-pUC ori (21ng/ μ l)、1 μ l 的 5u/ μ l T4 DNA 连接酶和 12.6 μ l 的 0.1 $\times$ TE 添加到 0.2mL PCR 管 (Bio-BIK),

并在冰上进行混合,从而得到仅具有 pSPCM-pUC ori 的反应混合物(反应混合物 2)。

[0354] 反应混合物 3

[0355] 类似地,将 4 μ l 的 5 $\times$ 快速连接缓冲液、3.7 μ l (150ng) 的 HU-eCD 片段 (41ng/ μ l)、1 μ l 的 5u/ μ l T4 DNA 连接酶和 11.3 μ l 的 0.1 $\times$ TE 添加到 0.2mL PCR 管 (Bio-BIK),并在冰上进行混合,从而得到仅具有 HU-eCD 片段的反应混合物(反应混合物 3)。

[0356] 热循环仪按照下文条件设定,在块温度达到 22 $^{\circ}$ C 后,将管置于其上,并且进行连接。

[0357] [Math. 7]

[0358] 22 $^{\circ}$ C 5 分钟 (连接反应)

[0359] 65 $^{\circ}$ C 5 分钟 (反应停止)

[0360] 4 $^{\circ}$ C ∞

[0361] 使用反应混合物 2 和反应混合物 3 来估计由于切割后剩余的质粒的背景的比例。

[0362] (4) 大肠杆菌的转化

[0363] 通过与实施例 1 中所述的“大肠杆菌的转化”相同的方法,使用 1 μ l 的连接反应后的溶液,进行大肠杆菌 JM109 的转化。

[0364] 在使用载体和插入物的连接产物(连接反应混合物 1)的转化中,每 100 μ l 的 10 倍稀释细菌液体在选择培养基上形成了 34 至 38 个菌落,然而在使用对照反应混合物 2(其中仅载体被连接)和对照反应混合物 3(其中仅插入物被连接)的转化中,存在 0 至 1 个菌落。背景非常低,这表明良好地进行了连接和转化。

[0365] (5) 质粒的检查

[0366] 重组大肠杆菌的培养

[0367] 按照实施例 1 中所述的“重组大肠杆菌的培养”部分中所述的方法进行。培养进行 20.5 小时。

[0368] 质粒 DNA 的提取

[0369] 按照实施例 1 中所述的“质粒 DNA 的提取”部分中所述的方法进行。

[0370] 质粒 DNA 浓度的测量

[0371] 按照实施例 1 中所述的“质粒 DNA 浓度的测量”部分中所述的方法进行。

[0372] 当测量从所有 6 个克隆菌株的重组大肠杆菌提取的 DNA 的浓度时,表明 DNA 纯度的 A260/280 比值为 1.904 至 1.916,并且质粒 DNA 的纯度良好。产量为至少 5 μ g。

[0373] 限制性酶切割

[0374] 使用 100ng 的质粒 DNA 进行 Bcu I 独自的切割、Bam HI 独自的切割以及 Bcu I 和 Bam HI 两者的切割。反应条件按照酶的产品说明书。反应体积为 20 μ l。

[0375] 琼脂糖凝胶电泳

[0376] 使用 0.8% 分析琼脂糖凝胶进行琼脂糖凝胶电泳。

[0377] 对于所有 6 个克隆菌株,从用两种类型的酶 Bcu I 和 Bam HI 的切割中检测到约 1.8kbp 的一个条带。此外,从用酶 Bcu I 独自或 Bam HI 独自的切割中检测到约 3.6kbp 的一个条带。这表明对于所有克隆菌株,质粒大小和组成正如所设计的。

[0378] 检查质粒 DNA 序列

[0379] 通过与实施例 1 中所述的“检查质粒 DNA 序列”部分中相同的方法,使用上文提取

的质粒进行测序。作为引物,使用实施例 1 中所述的表 3 中的引物对 1、2 和 3。将比对后的质粒核苷酸序列与设计的序列 (SEQ ID NO :2) 进行比较。

[0380] 所有 6 个克隆菌株的质粒序列与 SEQ ID NO :2 匹配,并且确认了在所有情况下获得了靶菌株。从所有的克隆菌株中选择一个菌株,并且将从该菌株提取的质粒定义为“pHU-eCDm-SPCM-pUC ori”。

[0381] < 实施例 3>

[0382] 穿梭质粒 (pCD 穿梭) 的构建 (步骤 3)

[0383] (1) 线性质粒 pHU-eCDm-SPCM-pUC ori 的制备

[0384] 质粒的切割

[0385] 使用限制性酶 Bcu I、Hind III 和 Sal I 按照以下来切割 pHU-eCDm-SPCM-pUC ori。进行 Hind III 切割是为了抑制后续步骤中转化时的背景。

[0386] 将 10 μ l 的 10 $\times$ O 缓冲液 (酶附带的缓冲液) 和 34 单位的 Sal I 添加到 5 μ g 的 pHU-eCDm-SPCM-pUC ori,并且使用 0.1 $\times$ TE 将总量补足为 100 μ l。37 $^{\circ}$ C 下孵育 6 小时后,从其中取出 50ng,并且使用 0.8% 分析琼脂糖凝胶确认了分解已完成。

[0387] 在等待确认时,将含有酶反应混合物的管在冰上保存。确认 Sal I 的切割后,使用 QIA 快速 PCR 纯化试剂盒来纯化该酶反应混合物。

[0388] 将 20 μ l 的 10 $\times$ Tango 缓冲液 (酶附带的缓冲液) 和 50 单位的 Bcu I 添加到其中,并且使用 0.1 $\times$ TE 将总量补足为 200 μ l。37 $^{\circ}$ C 下孵育 2 小时后,去除蛋白。

[0389] 将 10 μ l 的 10 $\times$ R 缓冲液 (酶附带的缓冲液) 和 29 单位的 Hind III 添加到其中,并且使用 0.1 $\times$ TE 将总量补足为 100 μ l。37 $^{\circ}$ C 下孵育 2 小时后,使用 QIA 快速 PCR 纯化试剂盒将 DNA 溶液纯化并浓缩。

[0390] 通过琼脂糖凝胶分级和切除

[0391] 通过与实施例 1 中所述的“通过琼脂糖凝胶分级和切除”相同的方法,将由限制性酶切割的载体分级,并切下约 3.6kbp 的靶条带。使用 0.8% 琼脂糖凝胶用于纯化,以 50V 进行电泳 90 分钟。作为分子量标记,使用快速上样 1kbp DNA 梯 (Quick-Load 1kbp DNA ladder) (NEB)。

[0392] 从琼脂糖凝胶洗脱 DNA

[0393] 通过与实施例 1 中所述的“从琼脂糖凝胶洗脱 DNA”中相同的方法,从上文切下的凝胶洗脱 DNA。

[0394] 将部分的进行了琼脂糖凝胶纯化的载体使用 0.1 $\times$ TE 稀释 3 倍,并通过分光光度计定量分析。

[0395] 当测量用限制性酶处理质粒 pHU-eCDm-SPCM-pUC ori 并通过琼脂糖凝胶纯化之后的 DNA 片段的吸光度时,浓度为 13ng/ μ l。此外,表明纯度的 A260/280 比值为 1.961。

[0396] (2) OriV-RepB 基因 (插入物) 的制备

[0397] 在作为 PCR 模板的 pBLES100 中,RepB 基因的 ORF 的 C-末端区和假定的 membB 基因的 ORF 的 N-末端区是重复的。为了防止 membB 的 ORF 被转录,将 membB 的假定的核糖体结合位点和翻译起始密码子 ATG 被改变为其他核苷酸。在这种情况下,这样的设计使得 RepB 的氨基酸没有改变。按照以下进行两个阶段的 PCR (第一 PCR 和第二 PCR),从而得到 OriV-RepB 基因。

[0398] 第一 PCR

[0399] 用于 PCR 扩增的条件检查

[0400] 检查两种类型的片段 (OriV-RepB 基因 1 和 OriV-RepB 基因 2) 的 PCR 扩增条件。

[0401] OriV-RepB 基因 1

[0402] 使用 pBLES100 作为模板,通过向灭菌的 0.2mL PCR 管 (Bio-BIK) 中添加 5 μ l 的 10pg/mL pBLES100、10 μ l 的 5 $\times$ PrimeStarTM 缓冲液、4 μ l 的 dNTP 混合物 (每种 2.5mM)、0.5 μ l 的 20 μ M OriV-rep 外部 F1 引物、0.5 μ l 的 20 μ M OriV-rep 内部 R1 引物、0.5 μ l 的 PrimeSTAR^{HS} DNA 聚合酶和 29.5 μ l 的 0.1 $\times$ TE 来在冰上制备 PCR 混合物。以相同方式制备 3 管该混合物。

[0403] 热循环仪按照下文条件设定,在块温度达到 98 $^{\circ}$ C 后,将管置于其上,并且进行 PCR。

[0404] [Math. 8]

[0405]

变性	98 $^{\circ}$ C 10 秒	}	$\times 30$ 循环
退火	55 $^{\circ}$ C 5 秒		
延伸	72 $^{\circ}$ C 60 秒		

[0406] 72 $^{\circ}$ C 60 秒

[0407] 4 $^{\circ}$ C ∞

[0408] OriV-RepB 基因 2

[0409] 以相同方式,使用 pBLES100 作为模板,通过向灭菌的 0.2mL PCR 管 (Bio-BIK) 中添加 5 μ l 的 10pg/mL pBLES100、10 μ l 的 5 $\times$ PrimeStarTM 缓冲液、4 μ l 的 dNTP 混合物 (每种 2.5mM)、0.5 μ l 的 20 μ M OriV-rep 内部 F1 引物、0.5 μ l 的 20 μ M OriV-rep 外部 R1 引物、0.5 μ l 的 PrimeSTAR^{HS} DNA 聚合酶和 29.5 μ l 的 0.1 $\times$ TE 来在冰上制备 PCR 混合物。以相同方式制备 3 管该混合物。

[0410] 热循环仪按照下文条件设定,在块温度达到 98 $^{\circ}$ C 后,将管置于其上,并且进行 PCR。

[0411] [Math. 9]

[0412]

变性	98 $^{\circ}$ C 10 秒	}	$\times 30$ 循环
退火	60 $^{\circ}$ C 5 秒		
延伸	72 $^{\circ}$ C 25 秒		

[0413] 72 $^{\circ}$ C 60 秒

[0414] 4 $^{\circ}$ C ∞

[0415] PCR 完成后,使用 1 μ l 的每种反应混合物检查 PCR 产物并估计其产量。作为凝胶,使用 2% 分析琼脂糖凝胶。

[0416] 根据 OriV-RepB 基因 1 的 PCR 产物的琼脂糖凝胶分析的结果,确认了存在约 1.3kbp 的靶单一条带的扩增。产量为约 4.5 μ g。

[0417] 此外,在 OriV-RepB 基因 2 的 PCR 产物的琼脂糖凝胶分析中,确认了存在约 400bp 的靶单一条带的扩增,并且产量为约 4.5 μ g。

[0418] 通过 PCR 纯化试剂盒的纯化

[0419] 按照标准方法(QIA 快速 PCR 纯化试剂盒的操作过程)纯化并浓缩 PCR 产物。

[0420] PCR 产物通过琼脂糖凝胶分级和切除

[0421] 通过与实施例 1 中所述的“通过琼脂糖凝胶分级和切除”相同的方法,将上文纯化并浓缩的 PCR 产物分级。对于 OriV-RepB 基因 1,使用用于纯化的 0.8% 琼脂糖凝胶进行电泳 80 分钟。当约 1.3kbp 的靶条带达到约 1/2 凝胶长度的位置,停止电泳。作为分子量标记,使用 FastRuler DNA 梯,中等范围。另一方面,对于 OriV-RepB 基因 2,使用用于纯化的 2% 琼脂糖凝胶进行电泳 80 分钟。当约 400bp 的靶条带达到约 1/2 凝胶长度的位置,停止电泳。作为分子量标记,使用 FastRulerDNA 梯,低范围。

[0422] 从琼脂糖凝胶洗脱 DNA

[0423] 通过与实施例 1 中所述的“从琼脂糖凝胶洗脱 DNA”中相同的方法,从上文切除的凝胶洗脱 DNA。

[0424] 纯化的 PCR 产物的定量分析

[0425] 将部分的纯化的 PCR 产物用 0.1 $\times$ TE 稀释 4 倍,并使用分光光度计定量分析。

[0426] 当琼脂糖凝胶纯化后的 PCR 产物使用吸收比色计进行测量时,OriV-RepB 基因 1 和 OriV-RepB 基因 2 的浓度分别为 37ng/ μ l 和 67ng/ μ l。

[0427] 第二 PCR

[0428] 用于 PCR 扩增的条件检查

[0429] 将纯化的 OriV-RepB 片段 1 和纯化的 OriV-RepB 片段 2 用作模板,并且检查用于连接它们的 PCR 条件。

[0430] 模板的制备

[0431] 将 325ng 纯化的 OriV-RepB 片段 1(约 1.3kbp)和 100ng 纯化的 OriV-RepB 片段 2(约 400bp)混合,并且使用 0.1 $\times$ TE 将浓度调整为 1ng/ μ l。纯化的 OriV-RepB 片段 1 和纯化的 OriV-RepB 片段 2 的摩尔混合比例为 1 : 1。

[0432] 引物混合物的制备

[0433] 将 20 μ M OriV-rep 外部 F1 引物和 20 μ M OriV-rep 外部 R1 引物以等量混合。

[0434] PCR 混合物的制备

[0435] 通过向灭菌的 0.2mL PCR 管(Bio-BIK)中添加 1 μ l 的 1ng/ μ l OriV-RepB 1 和 2 混合物,10 μ l 的 5 $\times$ PrimeStar™ 缓冲液、4 μ l 的 dNTP 混合物(每种 2.5mM)、0.5 μ l 的 PrimeSTAR^{HS} DNA 聚合酶和 32.5 μ l 的 0.1 $\times$ TE 来制备反应混合物,并在冰上混合。以相同方式制备 3 管该混合物。

[0436] 热循环仪按照下文条件设定,并在块温度达到 98 $^{\circ}$ C 后,将管置于其上。

[0437] 98 $^{\circ}$ C 持续 10 秒和 72 $^{\circ}$ C 持续 70 秒的循环进行 5 个循环,然后添加 2 μ l 上文制备的引物混合物并在 72 $^{\circ}$ C 下与其混合,并且在热循环仪中进行下文的反应。

[0438] [Math. 10]

[0439]

变性	98°C 10 秒	} ×30 循环
退火	60°C 5 秒	
延伸	72°C 90 秒	

[0440] 72°C 60 秒

[0441] 4°C ∞

[0442] PCR 完成后,将 0.5 μl 和 1 μl 反应混合物使用 0.8% 分析琼脂糖凝胶和 1×TBE 缓冲液 (0.5 μg/mL 溴化乙锭) 进行电泳。

[0443] 在第二 PCR 片段的琼脂糖凝胶分析中,确认了存在约 1.6kbp 的靶单一条带的扩增。产量为至少 6 μg。

[0444] 通过 PCR 纯化试剂盒的纯化

[0445] 按照 QIA 快速 PCR 纯化试剂盒的过程手册,将 PCR 产物纯化,从而去除引物。纯化的最终步骤中 DNA 的洗脱使用 50 μl 的 0.1×TE。

[0446] 将部分的去除了引物的 PCR 产物用 0.1×TE 稀释 20 倍,并通过分光光度计定量分析。

[0447] 用限制性酶处理 PCR 产物

[0448] 使用限制性酶 Bcu I 和 Sal I 切割纯化的 PCR 产物。

[0449] 将 10 μl 的 10×0 缓冲液 (酶附带的缓冲液) 和 25 单位的 Sal I 添加到 5 μg 纯化的 PCR 产物,并且使用 0.1×TE 将总量补足为 100 μl。37°C 下孵育 6 小时后,取出其中 50ng,并使用 0.8% 分析琼脂糖凝胶确认了 DNA 未经历内部分解。

[0450] 等待确认时,将含有酶反应混合物的管在冰上保存。确认后,通过进行电泳,使用 QIA 快速 PCR 纯化试剂盒纯化 DNA。

[0451] 将 20 μl 的 10×Tango 缓冲液 (酶附带的缓冲液) 和 110 单位的 Bcu I 添加到其中,并且使用 0.1×TE 将总量补足为 200 μl。37°C 下孵育 2 小时后,去除蛋白。

[0452] PCR 产物通过琼脂糖凝胶分级和切除

[0453] 通过与实施例 1 中所述的“通过琼脂糖凝胶分级和切除”相同的方法,将由限制性酶切割的 PCR 产物分级,并切下约 1.6kbp 的靶条带。作为凝胶,使用用于纯化的 0.8% 琼脂糖凝胶,开始电泳后 90 分钟,当约 1.6kbp 的靶条带达到约 1/3 凝胶长度的位置,停止电泳。作为分子量标记,使用快速上样 1kb DNA 梯 (NEB)。

[0454] 从琼脂糖凝胶洗脱 DNA

[0455] 通过与实施例 1 中所述的“从琼脂糖凝胶洗脱 DNA”中相同的方法,从上文切下的凝胶洗脱 DNA。

[0456] 将部分的纯化的 PCR 产物使用 0.1×TE 稀释 3 倍,并使用分光光度计定量分析。

[0457] 当限制性酶处理和琼脂糖凝胶纯化后的 PCR 产物使用吸收比色计进行测量时, DNA 的浓度为 16ng/μl。此外,表明纯度的 A260/280 比值为 2.041。

[0458] (3) 线性 pHU-eCDm-SPCM-pUC ori 和 OriV-RepB 基因的连接

[0459] 按照以下制备连接反应混合物 (反应混合物 1) 和对照反应混合物 (反应混合物 2 和反应混合物 3)。

[0460] 反应混合物 1

[0461] 在冰上向灭菌的 0.2mL PCR 管 (Bio-BIK) 添加 4 μ l 的 5 $\times$ 快速连接缓冲液、3.8 μ l (50ng) 的 pHU-eCDm-SPCM-pUC ori (13ng/ μ l)、3.9 μ l (65ng) 的 OriV-RepB 片段 (16.5ng/ μ l)、1 μ l 的 5u/ μ l T4 DNA 连接酶和 7.3 μ l 的 0.1 $\times$ TE 并混合, 这样线性 pHU-eCDm-SPCM-pUC ori (约 3.6kbp) 与 OriV-RepB 基因 (约 1.6kbp) 的摩尔比为 1 : 3 (重量比为 1 : 1.3), 从而得到连接反应混合物 (反应混合物 1)。

[0462] 反应混合物 2

[0463] 以相同方式, 在冰上向灭菌的 0.2mL PCR 管 (Bio-BIK) 添加 4 μ l 的 5 $\times$ 快速连接缓冲液、3.8 μ l (50ng) 的 pHU-eCDm-SPCM-pUC ori (13ng/ μ l)、1 μ l 的 5u/ μ l T4 DNA 连接酶和 11.2 μ l 的 0.1 $\times$ TE 并混合, 从而得到仅具有 pHU-eCDm-SPCM-pUC ori 的反应混合物 (反应混合物 2)。

[0464] 反应混合物 3

[0465] 以相同方式, 在冰上向灭菌的 0.2mL PCR 管 (Bio-BIK) 添加 4 μ l 的 5 $\times$ 快速连接缓冲液、3.9 μ l (65ng) 的 OriV-RepB 片段 (16.5ng/ μ l)、1 μ l 的 5u/ μ l T4 DNA 连接酶和 11.1 μ l 的 0.1 $\times$ TE 并混合, 从而得到仅具有 OriV-RepB 基因的反应混合物 (反应混合物 3)。

[0466] 热循环仪按照下文条件设定, 在块温度达到 22 $^{\circ}$ C 后, 将管置于其上, 并且进行连接。

[0467] [Math. 11]

[0468] 22 $^{\circ}$ C 5 分钟 (连接反应)

[0469] 65 $^{\circ}$ C 5 分钟 (反应停止)

[0470] 4 $^{\circ}$ C ∞

[0471] 从反应混合物 2 估计由于未切割的质粒的背景的比例, 并且从反应混合物 3 估计由于用作模板的质粒 DNA 存在的背景的比例。

[0472] (4) 大肠杆菌的转化

[0473] 通过与实施例 1 中所述的“大肠杆菌的转化”相同的方法, 使用 1 μ l 的连接反应后的溶液, 进行大肠杆菌 JM109 的转化。

[0474] 在使用载体和插入物的连接产物 (连接反应混合物 1) 的转化中, 每 100 μ l 的转化后原始细菌悬液在选择培养基上形成了 238 和 216 个菌落, 然而对于对照反应混合物 2 (其中仅载体被连接), 没有检测到菌落, 并且在使用对照反应混合物 3 (其中仅插入物被连接) 的转化中, 存在 8 和 6 个菌落。背景非常低, 这表明良好地进行了连接和转化。

[0475] (5) 质粒的检查

[0476] 重组大肠杆菌的培养

[0477] 按照实施例 1 中所述的“重组大肠杆菌的培养”部分中所述的方法进行。进行培养 22.5 小时。

[0478] 质粒 DNA 的提取

[0479] 按照实施例 1 中所述的“质粒 DNA 的提取”部分中所述的方法进行。

[0480] 质粒 DNA 浓度的测量

[0481] 按照实施例 1 中所述的“质粒 DNA 浓度的测量”部分中所述的方法进行。

[0482] 表明 DNA 纯度的 A260/280 比值为从 1.951 至 1.958, 并且质粒 DNA 的纯度良好。

产量为至少 10 μ g。

[0483] 限制性酶切割

[0484] 使用 100ng 的质粒 DNA 进行 Bcu I 独自の切割、Sal I 独自の切割以及 Bcu I 和 Sal I 两者的切割。反应条件按照酶的产品说明书。反应体积为 20 μ l。

[0485] 琼脂糖凝胶电泳

[0486] 按照实施例 1 中所述的“琼脂糖凝胶电泳”部分中所述的方法进行。使用 0.8% 分析琼脂糖凝胶。

[0487] 对于所有 6 个候选菌株,用两种类型的酶 Bcu I 和 Sal I 的切割,检测到约 3.6kbp 和 1.6kbp 的两个条带。此外,从用酶 Bcu I 独自或 Sal I 独自の切割中检测到约 5.2kbp 的一个条带。这表明对于所有候选菌株,质粒大小和组成正如所设计的。

[0488] 检查质粒 DNA 序列

[0489] 通过与实施例 1 中所述的“检查质粒 DNA 序列”部分中相同的方法,使用上文提取的质粒进行测序。作为引物,使用实施例 1 中所述的表 3 中的引物对 1、2、3 和 4。将比对后的质粒核苷酸序列与设计的序列 (SEQ ID NO :3) 进行比较。

[0490] 6 个克隆菌株中的 4 个菌株的质粒序列与 SEQ ID NO :3 匹配,并且确认获得了靶菌株。对于剩余的两个菌株,在 pTB6 rep 单元中存在单核苷酸缺失。从 4 个与 SEQ ID NO :3 匹配的菌株中选择一个菌株,并且将从该菌株提取的质粒定义为“pCD 穿梭”。

[0491] (6) 双歧杆菌的转化

[0492] 感受态细胞的制备

[0493] 将长双歧杆菌 Re-105A 甘油储备在室温解冻并充分摇动。将 10mL 的 IMR 条件培养基装入灭菌的玻璃试管,并且将 100 μ l 的解冻的细菌液体添加到其中并充分混合。将其与去氧/二氧化碳生成剂共同置于密封的容器中,并且通过将其在 37℃ 下保持 24 小时来进行培养(第一培养液)。

[0494] 在充分摇动第一培养液后,将其中 100 μ l 进行测量并用于接种装有 10mL 的 IMR 条件培养基的试管,将其与去氧/二氧化碳生成剂共同置于密封的容器中,并且将其在 37℃ 下保持 18 小时进行培养(第二培养液)。

[0495] 将 30mL 的 IMR 条件培养基分配到 4 个 50mL 容积灭菌塑料管 (BD Falcon™ 管, Becton, Dickinson and Company, Japan) 中的每一个。将这些管在 37℃ 的培养箱中预热,并且将 1.5mL 的第二培养液添加到每个管并充分摇动。轻轻闭合瓶盖,将管与去氧/二氧化碳生成剂共同置于密封的容器中,并在 37℃ 下进行培养。当 1 小时 35 分钟过去后混浊度(波长 600nm) 变为 0.213 时,停止培养,并且将含有培养液的管转移到冰上。在 4℃ 下,将它们以 8000rpm 离心 5 分钟。在清洁的工作台上弃去上清,将 5mL 冰中预冷的 PBS 缓冲液添加到每个含有细菌细胞的管,并且温和地将细菌细胞悬浮。将 4 个含有细菌悬液的管合并到一管,并且在 4℃ 下将其以 8000rpm 离心 5 分钟。在清洁的工作台上弃去上清,并且将 360 μ l 冰中预冷的 KMR 缓冲液添加到细菌细胞,以将细胞重悬浮。细菌悬液约为 720 μ l。将其保持在冰上过夜,从而得到感受态细胞。通过将细菌悬液的部分用等量的 KMR 缓冲液稀释 2 倍来制备细菌悬液,并将其定义为二倍稀释的感受态细胞。

[0496] 转化

[0497] 将 80 μ l 感受态细胞置于事先冰冷的 1.5mL 容积灭菌微型管中。将 578ng (1 μ l)

的 pCD 穿梭添加到其中,用移液管温和地混合,然后将其保持在冰上 5 分钟。作为阳性对照,将 498ng (2 μ l) 已被证实在双歧杆菌长双歧杆菌 Re-105A 中复制的 pAV001-HU-eCD-M968 与感受态细胞通过与上文相同的操作进行混合。以相同方式,将二倍稀释的感受态细胞和 578ng (1 μ l) 的 pCD 穿梭进行混合。将以上混合物中的每一个转移到事先冰冷的小杯中 (BM 小杯, BM Equipment Co., Ltd.)。在该过程中,将没有添加 DNA 的感受态细胞也添加到另一个小杯中 (阴性对照)。

[0498] 使用电穿孔系统 (Gene Pulser II, Bio-Rad Laboratories, Inc.) 进行转化 (电穿孔)。将电穿孔仪设定为 2.0kV 的电压、25 微 F 的电容器和 200 Ω 的电阻器,并按照系统说明书手册操作。

[0499] 电击后,将 800 μ l 的 IMR 液体培养基和 50 μ l 包含维生素 C 的液体的混合物立刻添加到小杯,并使其在灭菌 2mL 微型管中恢复。每个管进行相同的操作,并且将这些 2mL 管开盖并置于干燥器中。使用真空泵去除干燥器中的空气,并将干燥器充入二氧化碳。重复该操作 3 次,以使用二氧化碳代替干燥器中的空气,并然后将干燥器置于设定为 37 $^{\circ}$ C 的培养箱中并孵育 3 小时。

[0500] 孵育后,充分摇动每个细菌悬液,将其中 100 μ l 进行测量,并在 2 块 IMR 琼脂培养基 (含有 75 μ g/mL SPCM) 上涂板。将这些平板与去氧 / 二氧化碳生成剂 (AnaeroPack(R)-Anaero, Mitsubishi Gas Chemical Company) 共同置于密封容器内,并在设定为 37 $^{\circ}$ C 的培养箱中进行培养 3 天。

[0501] 菌落的培养

[0502] 随机选择 6 个由 pCD 穿梭转化的菌落,并用于接种装有 10mL 的 APS-2S-2.5R 条件培养基的试管。作为对照,在室温解冻 APS001C 主细胞库甘油储备 (2007 年 3 月 22 日制造,系列号:004-0127),并且将其中 100 μ l 用于接种装有 10mL 的 APS-2S-2.5R 条件培养基的试管。将这些接种的试管与去氧 / 二氧化碳生成剂共同置于密封的容器中,并且通过将它们在 37 $^{\circ}$ C 下保持 24 小时来进行培养 (第一培养液)。

[0503] 在充分摇动第一培养液后,将其中 100 μ l 进行测量并用于接种装有 10mL 的 APS-2S-2.5R 条件培养基的试管。将它们与去氧 / 二氧化碳生成剂共同置于密封的容器中,并且通过将它们在 37 $^{\circ}$ C 下保持 24 小时来进行培养 (第二培养液)。

[0504] 质粒的提取

[0505] 除了 APS001C 以外,使用 2mL 的第一培养液,通过 QIAprep Spin Miniprep 试剂盒,进行质粒提取和纯化。细节按照试剂盒的产品说明书。

[0506] 质粒的检查 (PCR)

[0507] 使用这样提取的质粒 DNA 作为模板,进行 PCR,并检查质粒的有 / 无。通过向灭菌的 0.2mL PCR 管 (Bio-BIK) 中添加 5 μ l 质粒 DNA、10 μ l 的 5 $\times$ PrimeStarTM 缓冲液、4 μ l 的 dNTP 混合物 (每种 2.5mM)、0.5 μ l 的 20 μ M 检查 F1 引物、0.5 μ l 的 20 μ M 检查 R2 引物、0.5 μ l 的 PrimeSTAR^{HS} DNA 聚合酶和 29.5 μ l 的 0.1 $\times$ TE 来在冰上制备 PCR 混合物。

[0508] 以相同方式,使用通过将从大肠杆菌提取的质粒 pCD 穿梭的浓度调整至 10pg/mL 而制备的溶液作为模板,制备作为阳性对照的 PCR 混合物。

[0509] 热循环仪按照下文条件设定,在块温度达到 98 $^{\circ}$ C 后,将管置于其上。

[0510] [Math. 12]

[0511]

变性	98°C 10 秒	} ×30 循环
退火	58°C 5 秒	
延伸	72°C 60 秒	

[0512] 72°C 60 秒

[0513] 4°C ∞

[0514] PCR 完成后,使用 1 μl 的反应混合物进行 PCR 产物的检查。作为凝胶,使用 0.8% 分析琼脂糖凝胶。

[0515] < 实施例 4>

[0516] 质粒“pBifiCD”的构建(步骤 4)

[0517] (1) 无 pUC ori 片段的制备

[0518] 通过限制性酶的质粒的切割

[0519] 按照以下由限制性酶 Bgl II 和 Bam HI 切割 pCD 穿梭。

[0520] 将 20 μl 的 10×Bam HI 缓冲液(酶附带的缓冲液)和 69 单位的 Bam HI 添加到 10 μg 的 pCD 穿梭,使用 0.1×TE 将总量补足为 200 μl,并充分混合。37°C 下孵育 3 小时 10 分钟后,取出其中 50ng,并使用 0.8% 分析琼脂糖凝胶确认了解已完成。

[0521] 等待确认时,将含有酶反应混合物的管在冰上保存。确认 Bam HI 的切割后,从酶反应溶液中去蛋白。

[0522] 将 10 μl 的 10×Bgl II 缓冲液(酶附带的缓冲液)和 45 单位的 Bgl II 添加到其中,使用 0.1×TE 将总量补足为 100 μl,并充分混合。37°C 下孵育 2 小时后,取出其中 100ng,并使用 0.8% 分析琼脂糖凝胶确认分解已完成。

[0523] 等待确认时,将含有酶反应混合物的管在冰上保存。

[0524] 将 0.1×TE 添加到 100ng 由限制性酶切割的质粒 DNA 溶液,以使总量成为 10 μl,将 1 μl 的 10× 上样缓冲液添加其中,并充分混合。将此用作电泳样品。作为凝胶,使用 0.8% 分析琼脂糖凝胶。

[0525] 通过琼脂糖凝胶分级和切除

[0526] 通过与实施例 1 中所述的“通过琼脂糖凝胶分级和切除”相同的方法,将由限制性酶切割的载体进行电泳 120 分钟,并当确认了约 4.5kbp 的靶条带已充分地脱离约 650bp 的不需要的条带时,切下约 4.5kbp 的 DNA 条带。作为分子量标记,使用快速上样 1kbp DNA 梯。

[0527] 从琼脂糖凝胶洗脱 DNA

[0528] 通过与实施例 1 中所述的“从琼脂糖凝胶洗脱 DNA”中相同的方法,从上文切下的凝胶洗脱 DNA。

[0529] 将部分的通过琼脂糖凝胶纯化的载体使用 0.1×TE 稀释 15 倍,并使用分光光度计定量分析。

[0530] 当将由限制性酶切割并通过琼脂糖凝胶纯化的 pCD 穿梭使用吸收比色计进行测量时, DNA 的浓度为 47ng/μl,并且表明纯度的 A260/280 比值为 1.937。

[0531] (2) 纯化的无 pUC ori 片段的自我连接

[0532] 连接反应

[0533] 将纯化的无 pUC ori 片段 (约 4.5 kbp) 进行自我连接。向灭菌的 0.2 mL PCR 管 (Bio-BIK) 添加 4 μ l 的 5 $\times$ 快速连接缓冲液、1 μ l (47 ng) 的无 pUC ori 片段 (47 ng/ μ l)、1 μ l 的 5u/ μ l T4 DNA 连接酶和 14 μ l 的 0.1 $\times$ TE, 并在冰上混合, 从而得到连接反应混合物。制备 20 管该反应混合物。

[0534] 热循环仪按照下文条件设定, 在块温度达到 22 $^{\circ}$ C 后, 将管置于其上。

[0535] [Math. 13]

[0536] 22 $^{\circ}$ C 5 分钟 (连接反应)

[0537] 65 $^{\circ}$ C 5 分钟 (反应停止)

[0538] 4 $^{\circ}$ C ∞

[0539] 纯化 (蛋白去除和浓缩)

[0540] 将 20 管连接反应混合物合并到 1 个灭菌的微型管中, 然后去除蛋白。使用 10 μ l 的 0.1 $\times$ TE 进行 DNA 的溶解。

[0541] (3) 双歧杆菌的转化

[0542] 转化

[0543] 使用 500 ng (5 μ l) 纯化的连接反应产物, 进行长双歧杆菌 Re-105A 感受态细胞的转化 (电穿孔)。作为背景对照, 将 500 ng (10 μ l) 未进行连接反应的无 pUCori 片段与感受态细胞以相同方式在单独的管中混合。通过与实施例 3 中所述的“转化”中相同的方法进行电穿孔操作。

[0544] 菌落的培养

[0545] 随机选择 8 个由纯化的连接反应产物转化的菌落, 通过与实施例 3 中所述的“菌落的培养”中相同的方法进行培养。

[0546] 质粒的提取

[0547] 使用 1.5 mL 的第一培养液, 通过与实施例 1 中所述的“质粒 DNA 的提取”中相同的方法进行质粒提取和纯化。

[0548] 质粒的检查 (PCR)

[0549] 使用上文提取的质粒 DNA 作为模板, 通过与实施例 3 中所述的“质粒的检查”中相同的方法进行 PCR。

[0550] PCR 完成后, 使用 1 μ l 的反应混合物来检查 PCR 产物。作为凝胶, 使用两种类型, 即 0.8% 和 2% 分析琼脂糖凝胶。

[0551] (4) 质粒序列的验证

[0552] 培养

[0553] 将长双歧杆菌 Re-105A/pBifiCD 克隆菌株甘油储备解冻并充分摇动, 并且将其中 100 μ l 用于接种装有 10 mL 的 APS-2S-2.5R 条件培养基的试管。将该试管与去氧 / 二氧化碳生成剂共同置于密封的容器中, 并且通过将其在 37 $^{\circ}$ C 下保持 24 小时来进行培养 (第一培养液)。在充分摇动第一培养液后, 将其中 100 μ l 进行测量并用于接种 2 个装有 10 mL 的 APS-2S-2.5R 条件培养基的试管的每一个。将这些试管与去氧 / 二氧化碳生成剂共同置于密封的容器中, 并且通过将它们 37 $^{\circ}$ C 下保持 24 小时来进行培养 (第二培养液)。

[0554] 质粒的提取

[0555] 按照以下使用适量的第二培养液, 通过 QIAprep Spin Miniprep 试剂盒, 进行质粒

提取和纯化。

[0556] 将 4 个 15mL 容积灭菌的塑料管 (BD Falcon™, Becton, Dickinson and Company, Japan) 每个都装入 2.5mL 第二培养液, 并且将 7.5mL 的 30mM GTA 缓冲液添加到每个管。将其摇动并然后在 25℃ 下以 12000rpm 离心 15 分钟, 并通过移液管弃去上清。将 10mL 的 30mM GTA 缓冲液添加到管中的细菌细胞后, 将它们在 25℃ 下以 12000rpm 离心 15 分钟, 并通过移液管弃去上清。将 2 个含有细菌细胞的管合并到 1 个管后, 将 1mL 的 N-乙酰胞壁酸酶溶液 (通过将 30mM GTA 缓冲液添加到由 Seikagaku 公司生产的冻干的 N-乙酰胞壁酸酶产品而制备为 3000 单位/mL) 添加到每个管并充分混合。将这些管在设定为 50℃ 的水浴中孵育 3 小时后, 将 250 μL 的 20mg/mL 蛋白酶 K (QIAGEN) 添加到其中, 充分混合, 并在设定为 60℃ 的水浴中孵育 30 分钟。将 2 个管合并到 1 个管中。

[0557] 将等量的 P1 缓冲液 (试剂盒附带) 添加到其中并混合 (A)。将该混合物分到 4 个 15mL 容积塑料管, 将与 A 等量的溶解溶液 (0.2M NaOH/2% SDS) 添加到其中并颠倒混合, 然后将 1.4 倍于 A 的体积的 N3 缓冲液 (试剂盒附带) 添加到其中并颠倒混合, 并且将细菌细胞进行溶菌与中和。在 25℃ 下以 12000rpm 离心 15 分钟后, 将上清收集到 15mL 容积塑料管中。使用 QIA 快速 Spin Column (QIAquick Spin Column) (试剂盒附带) 的 8 个柱来纯化这样收集的液体。纯化方法按照试剂盒的操作手册。使用 50 μL 的 0.1×TE 进行最终步骤中的 DNA 洗脱, 从而得到约 400 μL 的质粒溶液。

[0558] 检查质粒 DNA 序列

[0559] 通过与实施例 1 中所述的“检查质粒 DNA 序列”部分中相同的方法, 使用上文提取的质粒进行测序。作为引物, 使用实施例 1 中所述的表 3 中的引物对 1、3 和 4。将比对后的质粒核苷酸序列与设计的序列 (SEQ ID NO:4) 进行比较。

[0560] 测定从克隆菌株中提取的质粒的全序列的结果为, 长双歧杆菌 Re-105A/pBifiCD 质粒序列与 SEQ ID NO:4 匹配。将从该克隆菌株中提取的质粒定义为“pBifiCD”。

[0561] <测试实施例 1>

[0562] 检查双歧杆菌的转化及基本性质

[0563] (1) 检查长双歧杆菌 Re-105A 的转化

[0564] 检查通过从 pCD 穿梭移除 pUC ori 位点并闭环形成的自我连接产物和使用 pCD 穿梭的长双歧杆菌 Re-105A 的转化结果。

[0565] 将相同的感受态细胞用于 1 至 5 号平板。对于未添加质粒的阴性对照 (1 号平板), 菌落数为 1 和 0。

[0566] 但是, 即使对于使用已被证实在双歧杆菌中复制的穿梭质粒 pAV001-HU-eCD-M968 (专利公布 5;WO 2007-136107) 转化的阳性对照 (5 号平板), 菌落数为 5 和 2, 并且与阴性对照的数量上的差异小。这表明 1 至 5 号平板中使用的感受态细胞的转化效率低。

[0567] 另一方面, 对于 6 号平板, 将使用的感受态细胞的浓度稀释 2 倍, 并且当使用 pCD 穿梭进行转化时, 每个平板形成至少 500 个菌落。没有进行 6 号平板的阴性对照, 但是推测 6 号平板上的菌落很可能已被质粒 pCD 穿梭所转化。此外, 发现感受态细胞的浓度对转化效率贡献很大。此外, 比较了进行片段连接的情况和未进行片段连接的情况, 所述片段中 pUC ori 已从 pCD 穿梭中移除, 作为由此转化的结果 (分别为 3 号和 4 号平板), 3 号平板菌落数

为 3 和 8, 4 号平板菌落数为 1 和 2, 并且在两种情况中菌落数都少。

[0568] 结果在表 4 中给出。

[0569] [表 4]

[0570] 表 4 长双歧杆菌 Re-105A 的转化

[0571]

(cfu/平板)			
平板编号	感受态细胞	DNA	平板接种 (100 μ L)
1	长双歧杆菌 Re-105A (x1)	-	1
			0
2	长双歧杆菌 Re-105A (x1)	pCD 穿梭	2
			6
3	长双歧杆菌 Re-105A (x1)	无 pUC ori 的 pCD 穿梭 连接 +	3
			8
4	长双歧杆菌 Re-105A (x1)	无 pUC ori 的 pCD 穿梭 连接 -	1
			2
5	长双歧杆菌 Re-105A (x1)	pAV001-HU-eCD-M968	5
			2
6	长双歧杆菌 Re-105A (2倍稀释)	pCD 穿梭	>500
			>500

[0572] (2) 检查转化的长双歧杆菌 Re-105A 的质粒

[0573] 当使用从 8 个长双歧杆菌 Re-105A/pBifiCD 克隆菌株和 6 个长双歧杆菌 Re-105A/pCD 穿梭克隆菌株提取的质粒作为模板, 利用检查引物进行 PCR 时, 对于长双歧杆菌 Re-105A/pBifiCD 克隆菌株, 检测到约 500bp 的扩增产物。对于长双歧杆菌 Re-105A/pCD 穿梭克隆菌株, 检测到 1.1kbp 的扩增产物。因而确认了所有的克隆菌株具有质粒。还显示出 pBifiCD 不含有 pUC ori 片段。

[0574] <测试实施例 2>

[0575] 检查胞嘧啶脱氨酶活性

[0576] 使用 8 个长双歧杆菌 Re-105A/pBifiCD 克隆菌株和 6 个长双歧杆菌 Re-105A/pCD 穿梭克隆菌株来检查胞嘧啶脱氨酶 (CD) 活性。

[0577] 将 1mL 的每个 APS-2S-2.5R 条件培养基中的第二培养液用 Tris 缓冲液 (pH 8.4) 洗涤 3 次, 然后超声破碎, 从而提取总蛋白。通过改良的 Lowry 方法来定量测量总蛋白的量, 并且使用 5 μ g 的总蛋白进行使用 5- 氟胞嘧啶 (5-FC) 作为底物的酶反应。通过液相色谱法来定量测量通过酶反应形成的 5- 氟尿嘧啶 (5-FU) 和剩余的 5-FC 的量, 并计算 CD 酶活性。

[0578] 根据测量长双歧杆菌 Re-105A/pBifiCD 克隆菌株和长双歧杆菌 Re-105A/pCD 穿梭克隆菌株的 CD 活性的结果, 8 个长双歧杆菌 Re-105A/pBifiCD 克隆菌株的 CD 活性为 8.07-10.29 (平均: 8.74) 单位 / μ g 总蛋白, 并且细菌菌株之间几乎没有任何差异。

[0579] 此外, 6 个长双歧杆菌 Re-105A/pCD 穿梭克隆菌株的 CD 活性为 8.13-9.66 (平均:

8.69) 单位 / μg 总蛋白, 并且类似地细菌菌株之间几乎没有任何差异。

[0580] 两种克隆菌株的 CD 活性几乎相同, 但是对于平均值, 长双歧杆菌 Re-105A/pBifiCD 克隆菌株的 CD 活性稍高; CD 活性没有由于 pUC ori 片段被移除而减少, 反而表明其作用良好。

[0581] 通过该测试证实 pCD 穿梭和 pBifiCD 在双歧杆菌中复制并具有充分的 CD 活性。表 5 中显示测量结果。

[0582] [表 5]

[0583] 表 5 使用总蛋白的 CD 活性

[0584]

菌株	峰面积		转变率 (%)	蛋白浓度 (mg/mL)	CD活性 (单位/mg 总 蛋白)	
	S-FU	S-FC				
长双歧杆菌 Rc-105A /pCD 穿梭	#1	83317	874312	9.40	0.2556	9.4
	#2	85159	867227	9.66	0.2985	9.66
	#3	71781	843867	8.47	0.3572	8.47
	#4	68331	840645	8.13	0.3662	8.13
	#5	69681	837294	8.31	0.3798	8.31
	#6	68460	841469	8.14	0.3775	8.14
长双歧杆菌 Rc-105A /pBifiCD	#1	75600	829106	9.03	0.2805	9.03
	#2	72268	838034	8.58	0.303	8.58
	#3	67964	843275	8.07	0.3188	8.07
	#4	68377	837315	8.16	0.3324	8.16
	#5	71344	835183	8.51	0.3753	8.51
	#6	77285	870090	8.82	0.2805	8.82
	#7	85810	814454	10.29	0.3053	10.29
	#8	70636	832980	8.45	0.373	8.45

[0585] < 测试实施例 3>

[0586] 检查质粒保留稳定性

[0587] 当将通过在含有壮观霉素的培养基中培养而充分活化的培养液在不添加壮观霉素的培养基中进行培养时, 按照以下检查质粒保留稳定性。

[0588] 在添加 SPCM 的培养基中的选择培养

[0589] 将 2 个长双歧杆菌 Re-105A/pBifiCD 克隆菌株的甘油储备和 1 个长双歧杆菌 Re-105A/pCD 穿梭克隆菌株的甘油储备解冻并充分摇动后, 将其中 100 μL 进行测量并用于接种装有 10mL 的 APS-2S-2.5R 条件培养基的试管。通过相同操作进行 APS001C MCB (系列号: 004-0116) 的接种。将这些试管与去氧 / 二氧化碳生成剂共同置于密封的容器中, 并且

通过将它们在 37℃ 下保持 24 小时来进行培养（第一培养液）。在充分摇动第一培养液后，将其中 100 μ l 进行测量并用于接种 2 个装有 10mL 的 APS-2S-2.5R 条件培养基的试管。将这些试管与去氧 / 二氧化碳生成剂共同置于密封的容器中，并且通过将它们在 37℃ 下保持 24 小时进行培养（第二培养液）。

[0590] 在不添加 SPCM 的培养基中的非选择培养

[0591] 将装有非选择 APS-2S-2.5R 条件培养基的 10mL 试管在设定为 37℃ 的水浴中事先加热，并且在清洁的工作台中，用添加 SPCM 的培养基中的 10 μ l 每个第二培养液接种该培养基（0.1% 细菌接种）。接种后，将每个试管与去氧 / 二氧化碳生成剂共同置于密封的容器中，并置于设定为 37℃ 的培养箱中。快速进行系列的这些操作，以减少培养基的温度变化。将这些试管培养 24 小时后，使用每个培养液作为接种物，通过相同方法重复传代至非选择 APS-2S-2.5R 条件培养基上。

[0592] 在将非选择 APS-2S-2.5R 条件培养基中的第三代培养液通过充分振荡而摇动后，将其中 100 μ l 进行测量并添加到 9.9mL 厌氧稀释剂（ 10^2 倍稀释液体）并充分混合。通过相同方法稀释 10^2 倍稀释液体以得到 10^4 倍稀释液体，然后得到 10^6 倍稀释液体。将 100 μ l 的 10^6 倍稀释液体置于 5 块 BL 琼脂培养基的每一个上。将这些平板与去氧 / 二氧化碳生成剂共同置于密封的容器中，并在设定为 37℃ 的培养箱中厌氧培养 2 天。

[0593] BL-bS 琼脂培养基复制

[0594] 从 BL 琼脂培养基随机选择 300 个充分分离的菌落并进行使用。使用灭菌牙签勾起菌落并且按顺序用于接种 BL-bS 琼脂培养基和 BL 琼脂培养基。在总共 6 块琼脂培养基上以每块 50 个进行接种。根据容器的容积，将接种后的琼脂培养基与去氧 / 二氧化碳生成剂共同置于密封的容器中，以保持缺氧状态，并在 37℃ 下培养 1 天。

[0595] 培养结束后，通过标记没有明显细菌增殖的牙签的穿刺痕迹，并计数除了这些可以见到细菌增殖的穿刺痕迹来进行计数。因为保留质粒的细菌是 SPCM 抗性的，所以保留质粒的细菌的百分比以 SPCM 抗性细菌的百分比给出。根据下文的公式确定保留质粒的细菌的百分比。

[0596] [Math. 14]

[0597] 公式 1

[0598]

保留质粒的细菌的百分比=

[0599]

$$\frac{\text{BL-bS 琼脂培养基上的细菌增殖穿刺标记数}}{\text{BL 琼脂培养基上的细菌增殖穿刺标记数}} \times 100$$

[0600] 根据测量质粒保留稳定性的结果，长双歧杆菌 Re-105A/pBifiCD 克隆菌株 #1 和 #5 中壮观霉素抗性细菌的百分比，即保留质粒的细菌的百分比，对于两个菌株都是非常高的值，为 87.7%。

[0601] 此外，长双歧杆菌 Re-105A/pCD 穿梭中保留质粒的细菌的百分比为 80.3%。

[0602] 另一方面，由穿梭质粒 pAV001-HU-eCD-M968 (APS001C：专利公布 6；WO 2007-136107) 转化的长双歧杆菌 Re-105A/pAV001-HU-eCD-M968 中保留质粒的细菌的百分

比为 71.7%，这显著低于本发明的长双歧杆菌 Re-105A/pBifiCD 中保留质粒的细菌的百分比。

[0603] 确认了本发明的质粒 pBifiCD 在双歧杆菌长双歧杆菌 Re-105A 中被稳定地保留，并且由本发明的质粒 pBifiCD 转化的长双歧杆菌 Re-105A/pBifiCD 显示出非常高的质粒保留稳定性。

[0604] 此外，与长双歧杆菌 Re-105A/pAV001-HU-eCD-M968 相比，两个克隆菌株显示出非常好的保留质粒的细菌的百分比，此外，长双歧杆菌 Re-105A/pBifiCD 克隆菌株比长双歧杆菌 Re-105A/pCD 穿梭克隆菌株给出了更高的保留质粒的细菌的百分比，从而确认移除 pUC ori 片段改善了保留质粒的细菌的百分比。

[0605] 表 6 中显示出测量结果。

[0606] [表 6]

[0607] 表 6 质粒分离的稳定性

[0608]

	BL-bS 上的 生长	BL 上的 生长	SPCM 抗性 (%)
长双歧杆菌 Re-105A/pBifi CD #1	263	300	87.7
长双歧杆菌 Re-105A/pBifi CD #5	263	300	87.7
长双歧杆菌 Re-105A/pCD 穿梭 #1	240	299	80.3
APS001C MCB	215	300	71.7

[0609] <测试实施例 4>

[0610] 检查质粒“pBifiCD”转化大肠杆菌的能力

[0611] 使用穿梭质粒“pCD 穿梭”作为对照，按照以下进行大肠杆菌未被本发明的质粒“pBifiCD”所转化的检查。

[0612] (1) 质粒的制备

[0613] 按照以下制备本发明的质粒“pBifiCD”和对照质粒“pCD 穿梭”。

[0614] 培养

[0615] 用由实施例 4 中制备的质粒“pBifiCD”所转化的双歧杆菌（长双歧杆菌 Re-105A/pBifiCD），以 1% 接种 APS-2S-2.5R 条件培养基，与去氧 / 二氧化碳生成剂置于密封的容器中，并在 37℃ 下培养 24 小时。充分摇动后，用其中 1% 接种 APS-2S-2.5R 条件培养基，并且以相同方式培养 24 小时。

[0616] 类似地，用由实施例 3 中制备的穿梭质粒“pCD 穿梭”所转化的双歧杆菌（长双歧杆菌 Re-105A/pCD 穿梭），以 1% 接种 APS-2S-2.5R 条件培养基，与去氧 / 二氧化碳生成剂置于密封的容器中，并在 37℃ 下培养 24 小时。充分摇动后，用其中 1% 接种 APS-2S-2.5R 条件培养基，并且以相同方式培养 24 小时。

[0617] 质粒的提取

[0618] 将 2mL 每种上文的培养液用 30mM GTA 缓冲液 (pH5.5) 洗涤两次, 并且进行 N-乙酰胞壁酸酶处理, 然后进行蛋白酶 K 处理。通过 QIAprep Spin MiniPrep 试剂盒进行纯化从而提取质粒 DNA, 并且每种情况中获得约 9 μ g 的质粒 DNA。

[0619] (2) 大肠杆菌的转化

[0620] 使用 50ng (1 μ l) 每种上文制备的质粒“pCD 穿梭”和“pBifiCD”, 通过热休克进行大肠杆菌 JM109 感受态细胞 (Takara Bio Inc.) (100 μ l) 的转化。转化方法按照感受态细胞提供的产品说明书。

[0621] 将 100 μ l 的每种热休克并用添加 SOC 的培养基孵育后的细菌悬液在 2 块 LB 琼脂培养基 (含有 75 μ g/mL 壮观霉素) 上涂板, 并在 37°C 下培养过夜。

[0622] 根据检查每个培养后的平板上菌落存在或不存在的结果, 仅在使用对照质粒“pCD 穿梭”转化的大肠杆菌中检测到菌落。

[0623] 另一方面, 由阴性对照或本发明的质粒“pBifiCD”转化后, 未检测到菌落, 所述阴性对照中添加 0.1 $\times$ TE 而不是质粒。

[0624] 确认了即使当本发明的质粒“pBifiCD”被强行引入大肠杆菌中时, 其也不会在大肠杆菌中复制。

[0625] 表 7 中给出结果。

[0626] [表 7]

[0627] 表 7 用 pCD 穿梭或 pBifiCD 转化大肠杆菌 JM109

[0628]

样品名称	每平板的 菌落数
pCD 穿梭	35, 53
pBifiCD	0, 0
0.1xTE (阴性对照)	0, 0

[0629] <测试实施例 5>

[0630] 长双歧杆菌 Re-105A/pBifiCD 克隆菌株的抗肿瘤效果的检查

[0631] (1) 长双歧杆菌 Re-105A/pBifiCD 克隆菌株的培养的成活细胞的制备 (测试药物)

[0632] 通过以下进行活化培养, 将长双歧杆菌 Re-105A/pBifiCD 克隆菌株的甘油储备在常温下解冻, 用其中的适量接种装有添加了碳酸钙的液体培养基的试管, 将其与去氧 / 二氧化碳生成剂共同置于密封的容器中, 并在 37°C 的培养箱中厌氧培养 24 小时。随后, 用适量的该液体培养物接种装有未添加碳酸钙的液体培养基的试管, 并且在相同厌氧条件下培养 18 小时 (主要培养物)。

[0633] 将液体培养物转移到 50mL 容积聚丙烯锥形管 (Becton, Dickinson and Company, Japan), 并且将 5mL 的该混合液体培养物与 4 倍量 (20mL) 的冷 (5℃) 生理盐水充分混合, 如此制备 3 管。通过以下进行洗涤, 将每个管在制冷 (4℃) 的同时以 8,000rpm 离心 10 分钟, 并且弃去上清后, 再向其中添加 20mL 的冷生理盐水以悬浮细菌 (洗涤操作 1)。再进行两次该洗涤操作, 并且将已总计洗涤 3 次的细菌液体合并到 1 管后, 将细菌悬液的体积调整到 6.5mL。将如此洗涤的细菌悬液使用 8 微米滤膜 (聚碳酸酯, Toyo Roshi Kaisha, Ltd., K800A025A) 进行过滤, 并且将如此收集的滤液中的成活细菌 (培养的成活细菌液体) 用作测试药物。

[0634] (2) 移植的肿瘤细胞的培养

[0635] 于 37℃、5% CO₂ 的条件下, 在添加了 1v/v% 青霉素 (50000U/mL) / 链霉素 (50mg/mL) 和在 56℃ 下固定 30 分钟的 FBS (10v/v%) 的 DMEM 培养基中, 培养人乳腺癌细胞系 KPL-1 细胞。

[0636] 融合时, 用 1×PBS(-) 洗涤后, 添加 1×胰蛋白酶-EDTA 以使细胞脱离, 并且视情况用 DMEM 培养基将通过离心 (1000rpm/5 分钟) 收集的细胞稀释并传代。

[0637] 在移植实验中, 使用第五代细胞。将未被台盼蓝染色的成活细胞数目通过 Thoma 血细胞计数器 (Thoma 0.1mm deep ERMA, Tokyo) 进行计数, 并且通过将它们在汉克溶液 (Hanks' solution) 中悬浮来将细胞数调整为 2.5×10^6 细胞/mL。

[0638] (3) 荷瘤 (tumor-bearing) 裸小鼠的制备和肿瘤体积的测量

[0639] 将 0.2mL 上文制备的 KPL-1 细胞悬液移植到裸小鼠的右前肢背侧的皮肤下 (5×10^5 细胞 / 小鼠)。

[0640] 移植后, 使用测径仪, 通过测量肿瘤的尺寸 (大直径、小直径、厚度), 根据下文的公式来测定肿瘤的体积。

[0641] 肿瘤体积 (mm³) = 大直径 (mm) × 小直径 (mm) × 厚度 (mm) / 2

[0642] (4) 分组和培养的成活细菌 (测试药物)、糖源 (乳果糖) 和前药 (5-FC) 的给药

[0643] 分组和培养的成活细菌的给药 (测试药物)

[0644] 选择 16 只具有 60mm³ 至 95mm³ 级别的肿瘤体积的 KPL-1 荷瘤裸小鼠, 并平均分为两组 (每组 8 只小鼠), 一组用作对照组 (未处理组), 另一组用作处理组。

[0645] 将每只小鼠 0.3mL 的培养的成活细菌 (测试药物) 静脉内给予处理组, 每天 3 次 (AM/PM), 持续 2 天 (第 1 天和第 2 天)。

[0646] 给予的培养的成活细菌的总体积为 1.8mL, 并且给予的细胞总数为 5.9×10^9 cfu/小鼠。

[0647] 按照以下测量给予的成活细菌数。

[0648] 成活细菌数的测量

[0649] 将培养的细菌液体用厌氧稀释剂稀释 10^6 倍, 将其中 100 μl 在 3 个 BLFS 平板上涂板, 并在密封容器中 (AneroPack rectangular jar, Mitsubishi Gas Chemical Co., Ltd.), 于 37℃ 下, 在培养箱中与去氧 / 二氧化碳生成剂共同厌氧培养 3 天。根据从检测到的菌落数在 30 至 300 的级别的平板, 通过下文的公式计算给予的细菌数。

[0650] 给予的细菌数 (cfu) = 菌落数 (a) × 涂板稀释率 (b) × 每 1mL 制剂的转换因子 (c) × 剂量 (mL)

[0651] (a) : $(P1+P2+P3)/3$ (3 个平板 (P1、P2、P3) 的平均菌落数)

[0652] (b) : $\times 10^6$ (10^6 倍稀释)

[0653] (c) : $\times 10$ (每平板各自涂板 $100 \mu l$)

[0654] 乳果糖的给药

[0655] 按照以下, 再将乳果糖溶液给予处理组作为细菌的糖源。

[0656] 将 1mL 以 20% (w/v) 溶于纯净水并在 121°C 下高压灭菌 20 分钟的乳果糖溶液给予到小鼠的腹腔中, 每天一次。

[0657] 给药时间段为 21 天 (第 3 天至第 23 天), 从培养的成活细菌的给药完成后的那天开始。

[0658] 氟胞嘧啶 (5-FC) 的给药

[0659] 将 0.4mL 的 5-FC 溶液口服给予小鼠, 每天 3 次 (约 9:00、14:00 和 18:00) (总给药量 1.2mL)。

[0660] 给药时间段为 21 天 (第 3 天至第 23 天), 从 APS001F 培养的成活细菌的给药完成后的那天开始。

[0661] (5) 肿瘤生长抑制效果的检查

[0662] 开始处理 (分组时) 之前和处理开始后 24 天, 对于所有的小鼠, 以 3 至 4 天一次的频率测量肿瘤直径, 并检查对肿瘤生长的影响。

[0663] 计算每组的小鼠肿瘤体积的平均值 $\pm$ SD, 并且使用相对于对照组的相对肿瘤体积比 (T/C(%)) 作为指标, 评定抗肿瘤效果。

[0664] 对照组和处理组的肿瘤体积 (平均值 $\pm$ SD) 显示在表 8 中。

[0665] 此外, 肿瘤体积随天数的变化显示在图 5 中。

[0666] 测试结束日 (第 24 天), 处理组的相对肿瘤体积比 (T/C(%)) 为 23.0% , 并观察到显著的肿瘤生长抑制活性。

[0667] [表 8]

[0668] 表 8 长双歧杆菌 Re-105A/pBifiCD 克隆菌株的抗肿瘤效果

[0669]

处理	小鼠数量	肿瘤大小 (mm^3) 平均值 $\pm$ SD								第24天的 T/C(%)	双尾检验 (p 值)
		第0天	3	7	10	14	17	21	24		
A) 未处理的对照	8	74.5	122.3	205.3	370.1	560.8	912.0	1612.1	2115.7	-	-
		12.5	44.2	78.7	212.5	285.4	564.8	765.4	1009.9		
B) APS001F(完整)+5-FC+乳果糖	8	74.7	92.4	132.3	154.5	270.1	365.6	484.4	486.5	23.0	0.002
		10.7	15.4	54.7	41.8	120.0	180.4	211.8	265		

[0670] 工业应用

[0671] 本发明的目的是提供这样的表达载体, 其仅在转化体细菌中复制, 并且不在除了所述转化体细菌的细菌中复制, 特别是不在例如大肠杆菌的致病或者需氧或兼性厌氧细菌中复制, 以及构建所述表达载体的方法。此外, 本发明的目的是提供形成自由所述表达载体转化的厌氧微生物的基因转运体、含有所述基因转运体的药物组合物和含有所述细菌的实体瘤治疗剂。

[0672] 本发明的载体是非常安全的载体,其不含有在除了所述转化体细菌的细菌中发挥功能,特别是在大肠杆菌中发挥功能的复制起点,并且没有在除了所述转化体细菌的细菌中复制的可能性,特别是不在例如大肠杆菌的致病或者需氧或兼性厌氧细菌中复制。使用本发明的载体转化的基因转运体具有高质粒保留稳定性,并且即使其被横向转移到除了所述转化体细菌的细菌,特别是横向转移到例如大肠杆菌的致病或者需氧或兼性厌氧细菌,不存在在该细菌中复制的可能性,并且其作为非常安全和高质量的基因转运体是有前途的。

[0673]

0-1	PCT/RO/134 (SAFE) 与保藏的微生物或其他生物材料 相关的描述 (PCT 条约 13 条之二)	
0-1-1	备用	PCT-SAFE Version 3.51.036.211 MT/FOP 20090101/0.20.5.15
0-2	国际申请号	PCT/JP2009/001768
0-3	申请人或代理机构的案号	PCT390-1AN
1	下面的描述与本说明书中涉及的 保藏的微生物或其他生物材料有 关	
1-1	段落号	0018
1-3	保藏的确证	
1-3-1	保藏机构的名称	技术与评价专利微生物保藏国立研究所
1-3-2	保藏机构的地址	〒 292-0818 日本千叶县木更津市かずさ鎌足 2-5-8
1-3-3	保藏日期	2008年2月19日 (19.02.2008)
1-3-4	登录号	NPMD NITE BP-491
1-5	适用所做描述的指定国家	所有指定国

[0674] 仅受理局用

[0675]

0-4	是否与国际申请一起收到该表格	是
0-4-1	核准官员	小野田 猛

[0676] 仅国际局用

[0677]

0-5	国际局何时收到该表格	
0-5-1	核准官员	

[0001]

序列表

<110> 嶋谷一柴田 裕子
清水 瞳
米倉 弘美

<120> 表达载体

<130> 美国临时申请第61/124, 528号

<160> 4

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1793

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 质粒 pSPCM-pUCori

<400> 1

```
actagtagaa agcttagagt cgactcgatt ttcgttcgtg aatacatgtt ataataacta      60
taactaataa cgtaacgtga ctggcaagag atatTTTTaa aacaatgaat aggtttacac      120
ttactttagt tttatggaaa tgaaagatca tatcatatat aatctagaat aaaattaact      180
aaaataatta ttatctagat aaaaaattta gaagccaatg aaatctataa ataaactaaa      240
ttaagtttat ttaattaaca actatggata taaaataggt actaatcaaa atagtgagga      300
ggatatatTT gaatacatac gaacaaatta ataaagtga aaaaataactt cggaacatt      360
taaaaaataa ccttattggt acttacatgt ttggatcagg agttgagagt ggactaaaac      420
caaatagtga tcttgacttt ttagtcgtcg tatctgaacc attgacagat caaagtaaag      480
aaatacttat acaaaaaatt agacctattt caaaaaaaat aggagataaa agcaacttac      540
gatatatTga attaacaatt attattcagc aagaaatggt accgtggaat catcctccca      600
aacaagaatt tatttatgga gaatggttac aagagcttta tgaacaagga tacattcctc      660
agaaggaatt aaattcagat ttaaccataa tgctttacca agcaaaacga aaaaataaaa      720
gaatatacgg aaattatgac ttagaggaat tactacctga tattccattt tctgatgtga      780
gaagagccat tatggattcg tcagaggaat taatagataa ttatcaggat gatgaaacca      840
```

[0002]

```

actctatatt aactttatgc cgtatgattt taactatgga cacgggtaaa atcataccaa 900
aagatattgc gggaaatgca gtggctgaat cttctccatt agaacaatagg gagagaattt 960
tgtttagcagt tcgtagttat cttggagaga atattgaatg gactaatgaa aatgtaaatt 1020
taactataaa ctattttaaat aacagattaa aaaaattata aaaaattga aaaaatggtg 1080
gaaacacttt tttcaatttt tttagatctt gagcaaaagg ccagcaaaag gccaggaacc 1140
gtaaaaaggc cgcgttgctg gcgtttttcc ataggtccg cccctgac gagcatcaca 1200
aaaatcgacg ctcaagtcag aggtggcgaa acccgacagg actataaaga taccaggcgt 1260
ttccccctgg aagctccctc gtgcgtctc ctgttccgac cctgccgctt accgatacc 1320
tgtccgcctt tctcccttcg ggaagcgtgg cgttttctca tagctcacgc ttaggtatc 1380
tcagttcggt gtaggtcggt cgtccaagc tgggctgtgt gcacgaacc cccgttcagc 1440
ccgaccgctg cgccttatcc ggtaactatc gtcttgagtc caaccggta agacacgact 1500
tatcgccact ggcagcagcc actggtāaca ggattagcag agcgaggtat gtaggcggtg 1560
ctacagagtt cttgaagtgg tggcctaact acggctacac tagaagaaca gtatttggtg 1620
tctgcgctct gctgaagcca gttaccttcg gaaaaagagt tggtagctct tgatccggca 1680
aacaaccac cgctggtagc ggtggttttt ttgtttgcaa gcagcagatt acgcgcagaa 1740
aaaaaggatc tcaagaagat cctttgatct tttctacgga tccttctcga gtc 1793

```

<210> 2

<211> 3566

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 质粒 pHU-eCDm-SPCM-pUCori

<400> 2

```

ggatccgtct tcctgctggc ctatgcattg ggttccgcag tgcccactcc aggcgggtctg 60
ggcgggtgtg aagcggcgct gacattcgcg ttcgtggcgg tcggagtgcc gcagggcgctg 120
gcgctttccg ccactttgct gcaccgcgtg gtgttctact ggctgcgcac tccgctgggc 180
gcggcgccca tgaagtggct tgacaagcat aatcttgtct gattcgtcta ttttcatacc 240
cccttcgggg aaatagatgt gaaaaccctt ataaaacgcg ggttttcgca gaaacatgcg 300

```

[0003]

ctagtatcat tgatgacaac atggactaag caaaagtgtg tgtccccctga cccaagaagg	360
atgcttttatg gcatacaaca agtctgacct cgtttcgaat aacgctttac aaacaattat	420
taacgccccgg ttaccaggcg aagagggggt gtggcagatt catctgcagg acggaaaaat	480
cagcgccatt gatgcgcaat ccggcgtgat gcccataact gaaaacagcc tggatgccga	540
acaaggttta gttataccgc cgtttgtgga gccacatatt cacctggaca ccacgcaaac	600
cgccggacaa ccgaactgga atcagtccgg 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
gcaaactgtc gccttccctc aggaagggat tttgtcgtat cccaacgggtg aagcgttgct	900
ggaagaggcg ttacgcttag gggcagatgt agtgggggcg attccgcatt ttgaatttac	960
ccgtgaatac ggcgtggagt cgctgcataa aaccttcgcc ctggcgcaaa aatacgaccg	1020
tctcatcgac gttcactgtg atgagatcga tgacgagcag tcgcgctttg tcgaaaccgt	1080
tgctgccctg gcgcaccatg aaggcatggg cgcgcgagtc accgccagcc acaccacggc	1140
aatgcactcc tataacgggg cgatatcctc acgcctgttc cgcttgctga aaatgtccgg	1200
tattaacttt gtcgccaacc cgctgggtcaa tattcatctg caaggacgtt tcgatacgta	1260
tccaaaacgt cgcggcacat cgcgcggtta agagatgctg gagtcggca ttaacgtctg	1320
ctttggtcac gatgtgtct tcgatccgtg gtatccgtg ggaacggcga atatgctgca	1380
agtgtgcat atggggctgc atgtttgcc gttgatgggc tacgggcaga ttaacgatgg	1440
cctgaattta atcaccacc acagcgcaag gacgttgaat ttgcaggatt acggcattgc	1500
cgcggaaac agcgccaacc tgattatcct gccggctgaa aatgggtttg atgcgctgcg	1560
ccgtcaggtt ccggtacgtt attcgggtac tggcggcaag gtgattgcc gcacacaacc	1620
ggcacaacc accgtatatac tggagcagcc agaagccatc gattacaaac gttgaccttc	1680
tgctcgtagc gattacttcg agcattactg acgacaaaga ccccgaccga gatggtcggg	1740
gtctttttgt tgtggtgctg tgacgtgttg tccaaccgta ttattccgga ctagtagaaa	1800

[0004]

gcttagagtc gactcgattt tcgttcgtga atacatgtta taataactat aactaataac	1860
gtaacgtgac tggcaagaga tattttttaa acaatgaata ggtttacact tacttttagtt	1920
ttatggaaat gaaagatcat atcatatata atctagaata aaattaacta aaataattat	1980
tatctagata aaaaatttag aagccaatga aatctataaa taaactaaat taagtittatt	2040
taattaacaa ctatggatat aaaataggta ctaatcaaaa tagtgaggag gatatatattg	2100
aatacatacg aacaaattaa taaagtga aaataacttc ggaaacattt aaaaaataac	2160
cttattggta cttacatggt tggatcagga gttgagagtg gactaaaacc aaatagtgat	2220
cttgactttt tagtcgtcgt atctgaacca ttgacagatc aaagtaaaga aatacttata	2280
caaaaaatta gacctatttc aaaaaaata ggagataaaa gcaacttacg atatattgaa	2340
ttaacaatta ttattcagca agaaatggta ccgtggaatc atcctcccaa acaagaattt	2400
atttatggag aatggttaca agagctttat gaacaaggat acattcctca gaaggaatta	2460
aattcagatt taaccataat gctttaccaa gcaaacgaa aaaataaaag aatatacgga	2520
aattatgact tagaggaatt actacctgat attccatttt ctgatgtgag aagagccatt	2580
atggattcgt cagaggaatt aatagataat tatcaggatg atgaaaccaa ctctatatta	2640
actttatgcc gtatgatatt aactatggac acgggtaaaa tcataccaaa agatattgcg	2700
ggaaatgcag tggctgaatc ttctccatta gaacataggg agagaatttt gttagcagtt	2760
cgtagttaac ttggagagaa tattgaatgg actaatgaaa atgtaaattt aactataaac	2820
tatttaata acagattaaa aaaattataa aaaaattgaa aaaatgggtg aaacactttt	2880
ttcaattttt ttagatcttg agcaaaaggc cagcaaaagg ccaggaaccg taaaaaggcc	2940
gcgttgctgg cgtttttcca taggtccgc cccctgacg agcatcaca aaatcgacgc	3000
tcaagtcaga ggtggcgaaa cccgacagga ctataaagat accaggcggt tccccctgga	3060
agctccctcg tgcgtctcc tgttcgacc ctgccgtta ccgataacct gtccgccttt	3120
ctcccttcgg gaagcgtggc gttttctcat agctcacgt gtaggtatct cagttcgggtg	3180
taggtcgttc gctccaagct gggctgtgtg cacgaacccc ccgttcagcc cgaccgtgc	3240
gccttatccg gtaactatcg tcttgagtc aacccggtaa gacacgactt atcgccactg	3300
gcagcagcca ctggtaacag gattagcaga gcgaggtatg taggcggtgc tacagagttc	3360

[0005]

ttgaagtgg	ggcctaacta	cggctacact	agaagaacag	tatttggtat	ctgcgctctg	3420
ctgaagccag	ttaccttcgg	aaaaagagtt	ggtagctctt	gatccggcaa	acaaaccacc	3480
gctggtagcg	gtggtttttt	tgtttgcaag	cagcagatta	cgcgcagaaa	aaaaggatct	3540
caagaagatc	ctttgatctt	ttctac				3566

<210> 3
 <211> 5150
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>
 <223> 穿梭质粒pCD穿梭

<400> 3	
ggatccgtct	tcttctggc
ctatgcattg	ggttccgcag
tgcccactcc	aggcggctctg
60	
ggcgggtgtg	aagcggcgct
gacatttcgg	ttcgtggcgg
tccgagtgcc	gcagggcgctg
120	
gcgctttccg	ccactttgct
gcaccgcgtg	gtgttctact
ggctgcgcat	tccgctgggc
180	
gcggcggcca	tgaagtggct
tgacaagcat	aatcttgtct
gattcgtcta	ttttcatacc
240	
cccttcgggg	aaatagatgt
gaaaaaccct	ataaaacgag
ggttttcgca	gaaacatgcg
300	
ctagtatcat	tgatgacaac
atggactaag	caaaagtgtc
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	
cgcgggacaa	ccgaactgga
atcagtcagg	cacgctgttt
gaaggcattg	aacgctgggc
660	
cgagcgcaaa	gcgttattaa
cccatgacga	tgtgaaacaa
cgcgcatggc	aaacgctgaa
720	
atggcagatt	gccaacggca
ttcagcatgt	gcgtacccat
gtcgtatgtt	cggatgcaac
780	
gctaactgcg	ctgaaagcaa
tgctggaagt	gaagcaggaa
gtcgcgccgt	ggattgatct
840	
gcaaatcgtc	gccttccttc
aggaagggat	tttgtcgtat
cccaacgggtg	aagcgttgct
900	
ggaagaggcg	ttacgcttag
gggcagatgt	agtggggggc
attccgcatt	ttgaatttac
960	

[0006]

ccgtgaatac	ggcgtggagt	cgctgcataa	aaccttcgcc	ctggcgcaaa	aatacgaccg	1020
tctcatcgac	gttcactgtg	atgagatcga	tgacgagcag	tcgcgctttg	tcgaaaccgt	1080
tgctgccctg	gcgacccatg	aaggcatggg	cgcgcgagtc	accgccagcc	acaccacggc	1140
aatgcactcc	tataacgggg	cgtatacctc	acgcctgttc	cgcttgctga	aaatgtccgg	1200
tattaacttt	gtcgccaacc	cgctgggtcaa	tattcatctg	caaggacgtt	tcgatacgtg	1260
tccaaaacgt	cgcggcatca	cgcgcgttaa	agagatgctg	gagtcgggca	ttaacgtctg	1320
ctttggtcac	gatgctgtct	tcgatccgtg	gtatccgctg	ggaacggcga	atatgctgca	1380
agtgtgcat	atggggctgc	atgtttgcc	gttgatgggc	tacgggcaga	ttaacgatgg	1440
cctgaattta	atcaccacc	acagcgaag	gacgttgaat	ttgcaggatt	acggcattgc	1500
cgcgggaaac	agcgccaacc	tgattatcct	gccggctgaa	aatgggtttg	atgcgctgcg	1560
ccgtcaggtt	ccggtacgtt	attcggtagc	tggcggcaag	gtgattgcc	gcacacaacc	1620
ggcacaacc	accgtatata	tggagcagcc	agaagccatc	gattacaaac	gttgaccttc	1680
tgctcgtagc	gattacttcg	agcattactg	acgacaaaga	ccccgaccga	gatggtcggg	1740
gtctttttgt	tgtgggtgtg	tgacgtgttg	tccaaccgta	ttattccgga	ctagtcctcc	1800
aggacctcgt	ctacgaggcg	ctgagcgagg	aatggcgcaa	aagggaacgc	gagatcagcg	1860
acccatgggc	caacgacgag	gcggacggat	accagccgcc	ctcatacgag	ccggtcaacc	1920
ccgaacgcag	gactccccag	acgccctccg	atggcctgat	ctgacgtccg	aaaaaaggcg	1980
ctgtgcgccc	tttttaaata	ttttataaat	ctttttacat	tcttttagcc	cctccgcagc	2040
cttactctcc	caacgggttt	cagccgaaac	ctacaccaa	aggggagcga	acctacacca	2100
aaaggggagc	gaacctacac	caaaagggga	gcgaacctac	acaaaaaggg	gagctatata	2160
caccttttgt	tatttaaggt	gcaagttgtg	ctatgctgag	gccatgtcca	atgagatcgt	2220
gaagttcagc	aaccagttca	acaacgtcgc	gctgaagaag	ttcgacgccg	tgcacctgga	2280
cgtgctcatg	gcgatcgctt	caagggtgag	ggagaagggc	acggccacgg	tggagtcttc	2340
gttcgaggag	ctgcgcggcc	tcatgcgatt	gaggaagaac	ctgaccaaca	agcagctggc	2400
cgacaagatc	gtgcagacga	acgcgcgcct	gctggcgctg	aactacatgt	tcgaggattc	2460
gggcaagatc	atccagttcg	cgctgttcac	gaagtctgtc	accgaccgcg	aggaggcgac	2520

[0007]

tctcgcggtt	ggggtcaacg	aggagttcgc	gttcctgctc	aacgacctga	ccagccagtt	2580
cacgcgcttc	gagctggccg	agttcgccga	cttcaagagc	aagtacgcca	aggagttcta	2640
ccgcagggcc	aagcagtacc	gcagctccgg	aatctggaag	atcggcccg	acgagttctg	2700
ccgactgctt	ggcgttccac	cgtcggcaat	aaccagaca	cgatatctga	atcagaaggt	2760
tcttcagcca	attcaggagg	agtgtgggcc	tctccttggc	ctgaagatcg	agcgccagta	2820
cgtgaaacgc	aggctgtcgg	gcttcgtgtt	cacattcgcc	cgcgagaccc	ctccggtgat	2880
cgacgccagg	cccggtggagg	cgaggaagac	ggacggcgac	ggcaagggcc	attggacgag	2940
cgttgccggg	tacggcgagg	tgttcacgac	cacggcggtt	ttcgacgtga	cggccgccc	3000
ggctcacttc	gacggcaccg	ttgaagccgg	ggagtgccgt	ttctgcgcgt	ttgacgcgcg	3060
caaccgcgaa	catcatgcgc	ggaacgccgg	aaggctgttc	tagcggccgt	gtccgcgcct	3120
ctggggcggt	tgcgcctgcc	atgggtcgat	ctgccgctgt	tcggcctcac	gctggtctgt	3180
gcgctgcctg	atctccctga	gcaggtcggc	cttggtcctg	ggggcgcttc	gctcctcgaa	3240
cgggcgcgtc	tccccaggt	cctcgggctc	gctcaggctc	aacggctcgt	caccggacgg	3300
ctcgggccc	gttctctcct	gtgcggggtt	ctccgcctgt	gcgcgttggt	cggccatgcg	3360
cagtgcgagg	gccttcacct	gttcggggct	tgctgactcg	attttcggtc	gtgaatacat	3420
gttataataa	ctataactaa	taacgtaacg	tgactggcaa	gagatatttt	taaaacaatg	3480
aataggttta	cacttacttt	agttttatgg	aatgaaaga	tcatatcata	tataatctag	3540
aataaaatta	actaaaataa	ttattatcta	gataaaaaat	ttagaagcca	atgaaatcta	3600
taaataaact	aaattaagtt	tatttaatta	acaactatgg	atataaaata	ggtactaatc	3660
aaaatagtag	ggaggatata	tttgaataca	tacgaacaaa	ttaataaagt	gaaaaaaata	3720
cttcggaaac	atttaaaaaa	taaccttatt	ggtacttaca	tgtttgatc	aggagttgag	3780
agtggactaa	aaccaaatag	tgatcttgac	tttttagtcg	tcgtatctga	accattgaca	3840
gatcaaagta	aagaaatact	tatacaaaaa	attagaccta	tttcaaaaaa	aataggagat	3900
aaaagcaact	tacgatatat	tgaattaaca	attattatct	agcaagaaat	ggtaccgtgg	3960
aatcatcctc	ccaaacaaga	atttatttat	ggagaatggt	tacaagagct	ttatgaacaa	4020

[0008]

```

ggatacattc ctcagaagga attaaattca gatttaacca taatgcttta ccaagcaaaa 4080
cgaaaaaata aaagaatata cggaattat gacttagagg aattactacc tgatattcca 4140
ttttctgatg tgagaagagc cattatggat tcgtcagagg aattaataga taattatcag 4200
gatgatgaaa ccaactctat attaacttta tgccgtatga ttttaactat ggacacgggt 4260
aaaatcatac caaaagatat tgcgggaaat gcagtggctg aatcttctcc attagaacat 4320
agggagagaa ttttgttagc agttcgtagt tatcttgagc agaattattga atggactaat 4380
gaaaatgtaa atttaactat aaactattta aataacagat taaaaaaatt ataaaaaaat 4440
tgaaaaaatg gtggaaacac ttttttcaat ttttttagat cttgagcaaa aggccagcaa 4500
aaggccagga accgtaaaaa ggccgcgttg ctggcgtttt tccataggct ccgccccct 4560
gacgagcatc acaaaaatcg acgtcaagt cagagggtgc gaaacccgac aggactataa 4620
agataccagg cgtttcccc tggaagctcc ctctgtcgtc ctctgttcc gaccctgccg 4680
cttaccggat acctgtccgc ctttctccct tcgggaagcg tggcgctttc tcatagctca 4740
cgctgtaggt atctcagttc ggtgtaggtc gttcgtcca agctgggctg tgtgcacgaa 4800
cccccgctc agcccgaccg ctgcgcctta tccgtaact atcgtcttga gtccaaccg 4860
gtaagacacg acttatcgcc actggcagca gccactggta acaggattag cagagcgagg 4920
tatgtaggcg gtgtacaga gttcttgaag tgggtggccta actacggcta cactagaaga 4980
acagtatttg gtatctgcgc tctgtgaag ccagttacct tcggaaaaag agttggtagc 5040
tcttgatccg gcaaacaaac caccgtggt agcgggtggt tttttgttg caagcagcag 5100
attacgcgca gaaaaaagg atctcaagaa gatccttga tcttttctac 5150

```

<210> 4
 <211> 4476
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>
 <223> 质粒 pBifiCD

```

<400> 4
agatccgtct tctgtctggc ctatgcattg ggttccgcag tgcccactcc aggcggtctg 60
ggcgggtgtg aagcggcgct gacattcgcg ttcgtggcgg tcggagtgcc gcagggcgtg 120

```

[0009]

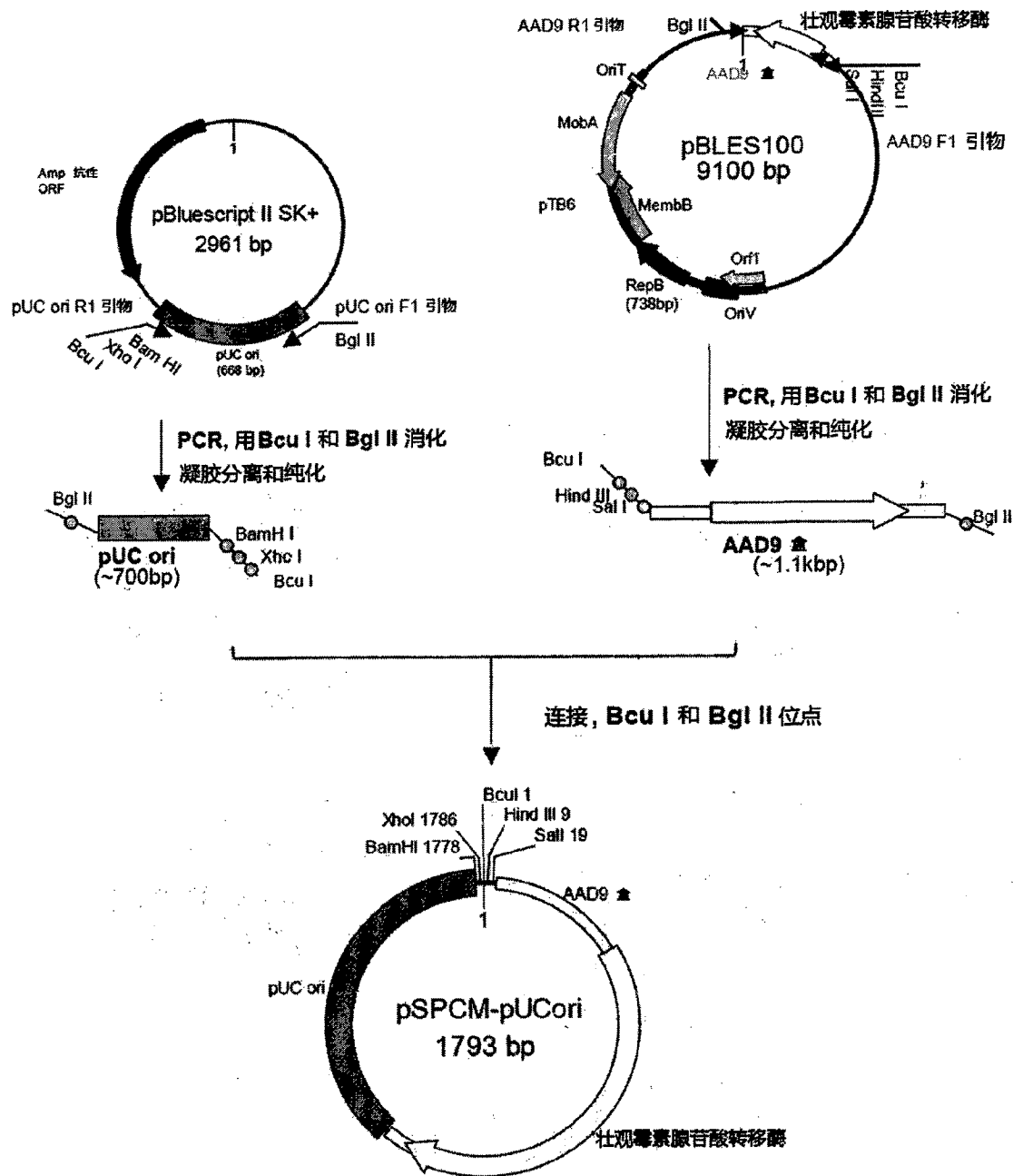
gcgctttccg ccactttgct gcaccgcgtg gtgtttctact ggctgcgcat tccgctgggc	180
gcggcggcca tgaagtggct tgacaagcat aatcttgtct gattcgtcta tttcatacc	240
cccttcgggg aaatagatgt gaaaaccctt ataaaacgcg ggttttcgca gaaacatgcg	300
ctagtatcat tgatgacaac atggactaag caaaagtgtg tgtccctga cccaagaagg	360
atgctttatg gcatacaaca 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 atcagtcagg 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 gccttccctc aggaagggat tttgtcgtat cccaacggtg aagcgttgct	900
ggaagaggcg ttacgcttag gggcagatgt agtgggggcg attccgcatt ttgaatttac	960
ccgtgaatac ggcggtggagt cgctgcataa aaccttcgcc ctggcgcaaa aatacgaccg	1020
tctcatcgac gttcactgtg atgagatcga tgacgagcag tcgcgctttg tcgaaaccgt	1080
tgtgcacctg gcgcaccatg aaggcatggg cgcgcgagtc accgccagcc acaccacggc	1140
aatgcactcc tataacgggg cgtatacctc acgcctgttc cgcttgctga aaatgtccgg	1200
tattaacttt gtcgccaacc cgctgggtcaa tattcatctg caaggacgtt tcgatacgta	1260
tccaaaacgt cgcggcatca cgcgcgttaa agagatgctg gagtccggca ttaacgtctg	1320
ctttggtcac gatgctgtct tcgatccgtg gtatccgtg ggaacggcga atatgctgca	1380
agtgtgcgat atggggctgc atgtttgccg gttgatgggc tacgggcaga ttaacgatgg	1440
cctgaattta atcaccacc acagcgcaag gacgttgaat ttgcaggatt acggcattgc	1500
cgccggaaac agcgccaacc tgattatcct gccggctgaa aatgggtttg atgcgctgcg	1560
ccgtcagggt ccggtacgtt attcgggtacg tggcggcaag gtgattgccg gcacacaacc	1620

[0010]

ggcacaacc accgtatatac tggagcagcc agaagccatc gattacaaac gttgaccttc	1680
tgctcgtagc gattacttcg agcattactg acgacaaaga ccccgaccga gatggtcggg	1740
gtctttttgt tgtgggtgctg tgacgtgttg tccaaccgta ttattccgga ctagtcctcc	1800
aggacctcgt ctacgaggcg ctgagcgagg aatggcgcaa aagggaaggc gagatcagcg	1860
acccatgggc caacgacgag gcggacggat accagccgcc ctcatagag ccggtcaacc	1920
ccgaacgcag gactccccag acgccctccg atggcctgat ctgacgtccg aaaaaaggcg	1980
ctgtgcgccc tttttaaatc ttttataaat ctttttacat tcttttagcc cctccgcagc	2040
cttactctcc caacgggttt cagccgaaac ctacaccaa aggggagcga acctacacca	2100
aaaggggagc gaacctacac caaaagggga gcgaacctac accaaaaggg gagctatata	2160
caccttttgt tatttaaggt gcaagttgtg ctatgctgag gccatgtcca atgagatcgt	2220
gaagttcagc aaccagttca acaacgtcg cgtgaagaag ttcgacgccg tgcacctgga	2280
cgtgctcatg gcgatcgct caagggtgag ggagaagggc acggccacgg tggagttctc	2340
gttcgaggag ctgcgcggcc tcatgcgatt gaggaagaac ctgaccaaca agcagctggc	2400
cgacaagatc gtgcagacga acgcgcgct gctggcgctg aactacatgt tcgaggattc	2460
gggcaagatc atccagttcg cgctgttcac gaagttcgtc accgaccgc aggaggcgac	2520
tctcgcgggt ggggtcaacg aggagttcg gttcctgctc aacgacctga ccagccagtt	2580
cacgcgcttc gagctggccg agttcgccga cctcaagagc aagtacgcca aggagttcta	2640
ccgcagggcc aagcagtacc gcagctccgg aatctggaag atcggccgcg acgagttctg	2700
ccgactgctt ggcgttcac cgctcgcaat aaccagaca cgatatctga atcagaaggt	2760
tcttcagcca attcaggagg agtgtgggcc tctccttggc ctgaagatcg agcgccagta	2820
cgtgaaacgc aggtgtcgg gcttcgtgtt cacattcgcc cgcgagacc ctccggtgat	2880
cgacgccagg cccgtggagg cgaggaagac ggacggcgac ggcaagggcc attggacgag	2940
cgttgccggg tacggcgagg tgttcacgac cacggcggtt ttcgacgtga cggccgccg	3000
ggctcacttc gacggcaccg ttgaagccgg ggagtgcctt ttctgcgct ttgacgcgcg	3060
caaccgcgaa catcatgcgc ggaacgccg aaggtgttc tagcggcct gtccgcgcct	3120
ctggggcggt tgcgcctgcc atgggtcgat ctgccgctgt tcggcctcac gctggtctgt	3180

[0011]

gcgctgcctg atctccctga gcaggtcggc cttggctcctg ggggcgcttc gctcctcgaa	3240
cgggccgctc tccccaggt cctcgggctc gctcaggtcc aacggctcgt caccggacgg	3300
ctcgggccgg ttctctccct gtgccgggtt ctccgcctgt gcgcgttggt cggccatgcg	3360
cagtgcgagg gccttcacct gttcggggct tgtcgactcg attttcgttc gtgaatacat	3420
gttataataa ctataactaa taacgtaacg tgactggcaa gagatatttt taaaacaatg	3480
aataggttta cacttacttt agttttatgg aaatgaaaga tcatatcata tataatctag	3540
aataaaatta actaaaataa ttattatcta gataaaaaat ttagaagcca atgaaatcta	3600
taaataaact aaattaagtt tatttaatta acaactatgg atataaaata ggtactaatc	3660
aaaatagtga ggaggatata ttggaataca tacgaacaaa ttaataaagt gaaaaaaata	3720
cttcggaaac atttaaaaaa taaccttatt ggtacttaca tgtttggatc aggagttgag	3780
agtggaactaa aaccaaatag tgatcttgac tttttagtcg tcgtatctga accattgaca	3840
gatcaaagta aagaaatact tatacaaaaa attagacctt tttcaaaaaa aataggagat	3900
aaaagcaact tacgatatat tgaattaaca attattattc agcaagaaat ggtaccgtgg	3960
aatcatcctc ccaaacaaga atttatttat ggagaatggt tacaagagct ttatgaacaa	4020
ggatacattc ctccagaagga attaaattca gatttaacca taatgcttta ccaagcaaaa	4080
cgaaaaaata aaagaatata cggaatttat gacttagagg aattactacc tgatattcca	4140
ttttctgatg tgagaagagc cattatggat tcgtcagagg aattaataga taattatcag	4200
gatgatgaaa ccaactctat attaacttta tgccgtatga ttttaactat ggacacgggt	4260
aaaatcatac caaaagatat tgcgggaaat gcagtggctg aatcttctcc attagaacat	4320
aggagagaaa ttttgttagc agttcgtagt tatcttggag agaataattga atggactaat	4380
gaaaatgtaa atttaactat aaactattta aataacagat taaaaaaatt ataaaaaaat	4440
tgaaaaaatg gtggaaacac ttttttcaat tttttt	4476



选择标记质粒 (pSPCM-pUCori) 的构建过程
(步骤1)

图 1

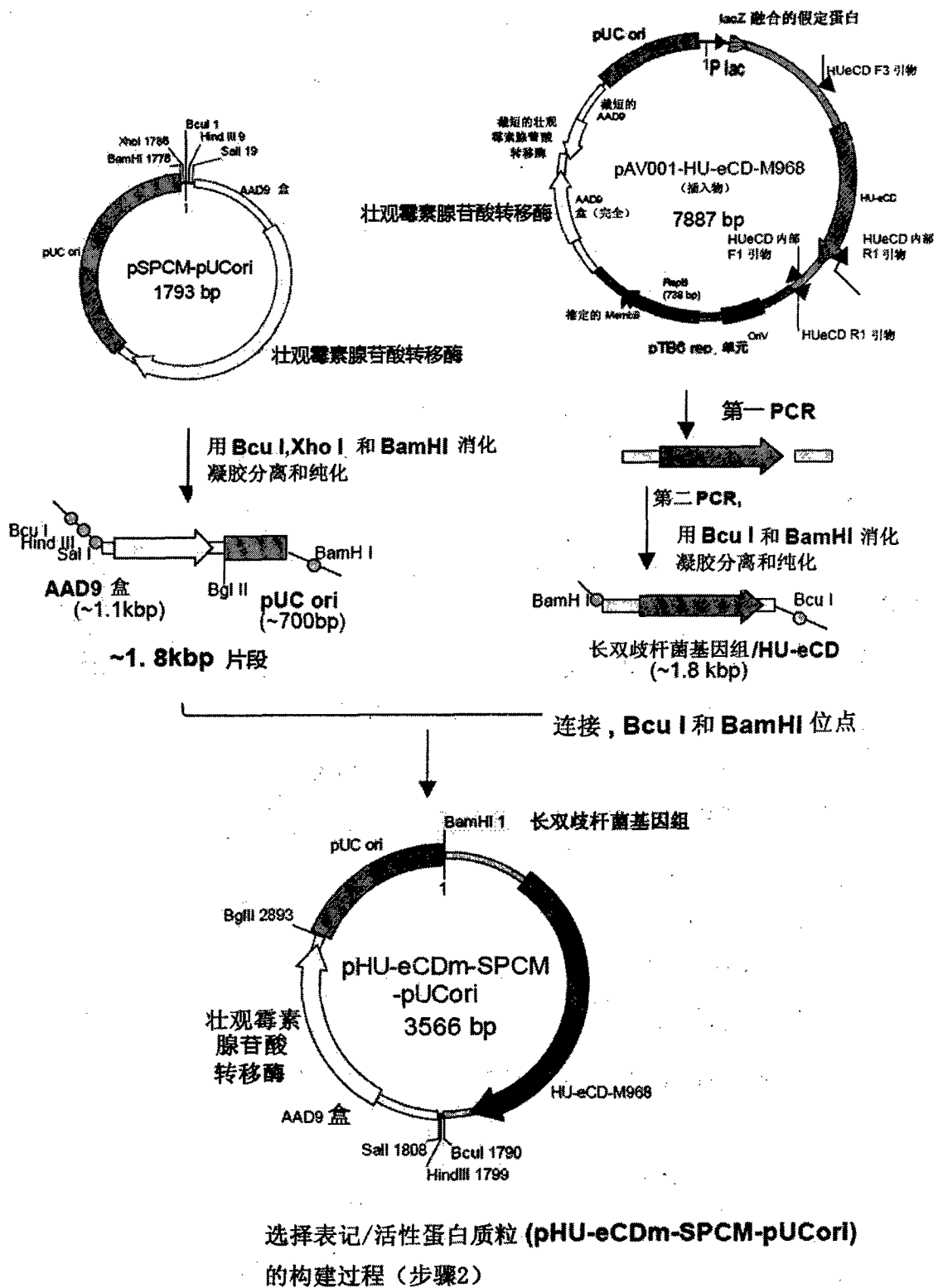


图 2

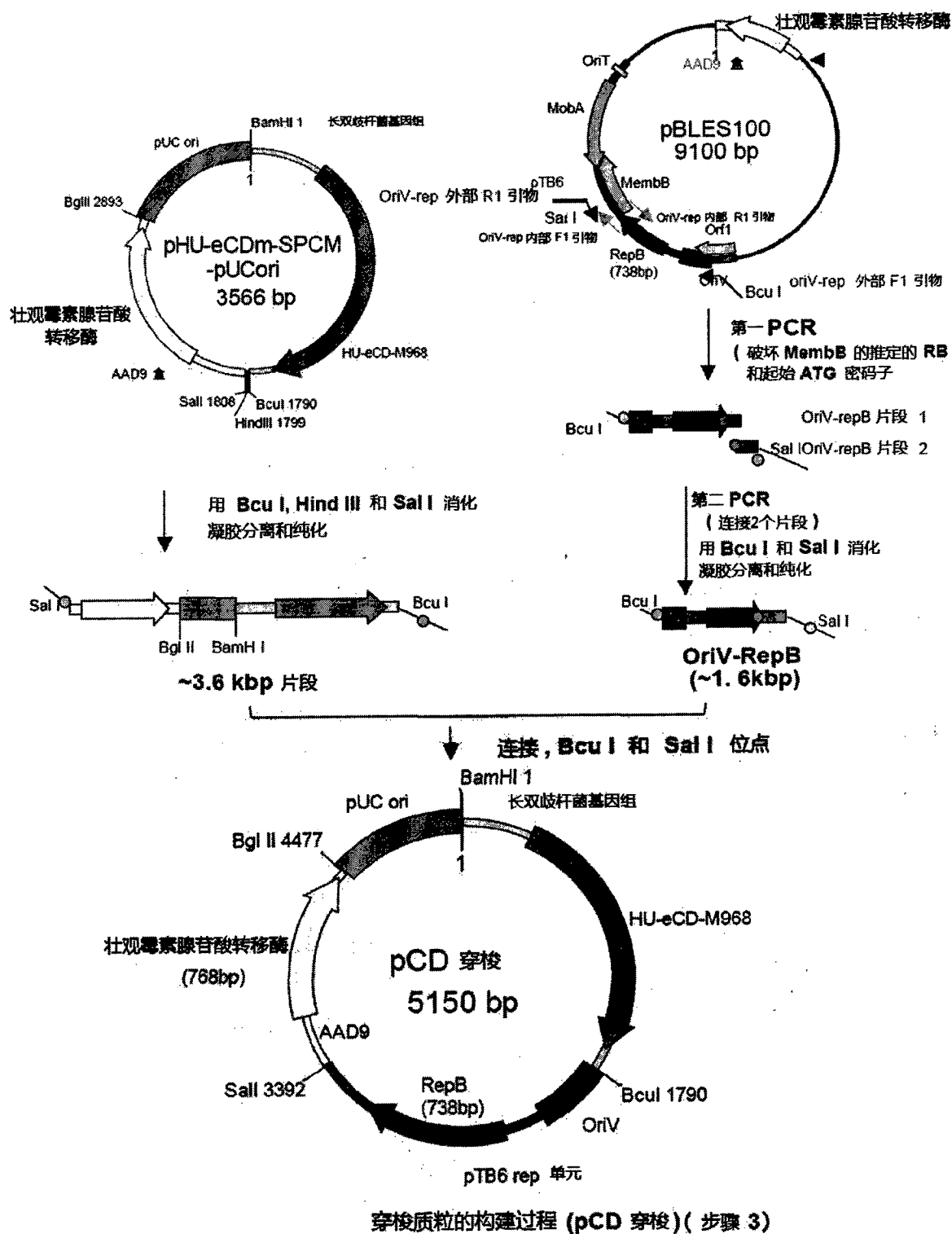
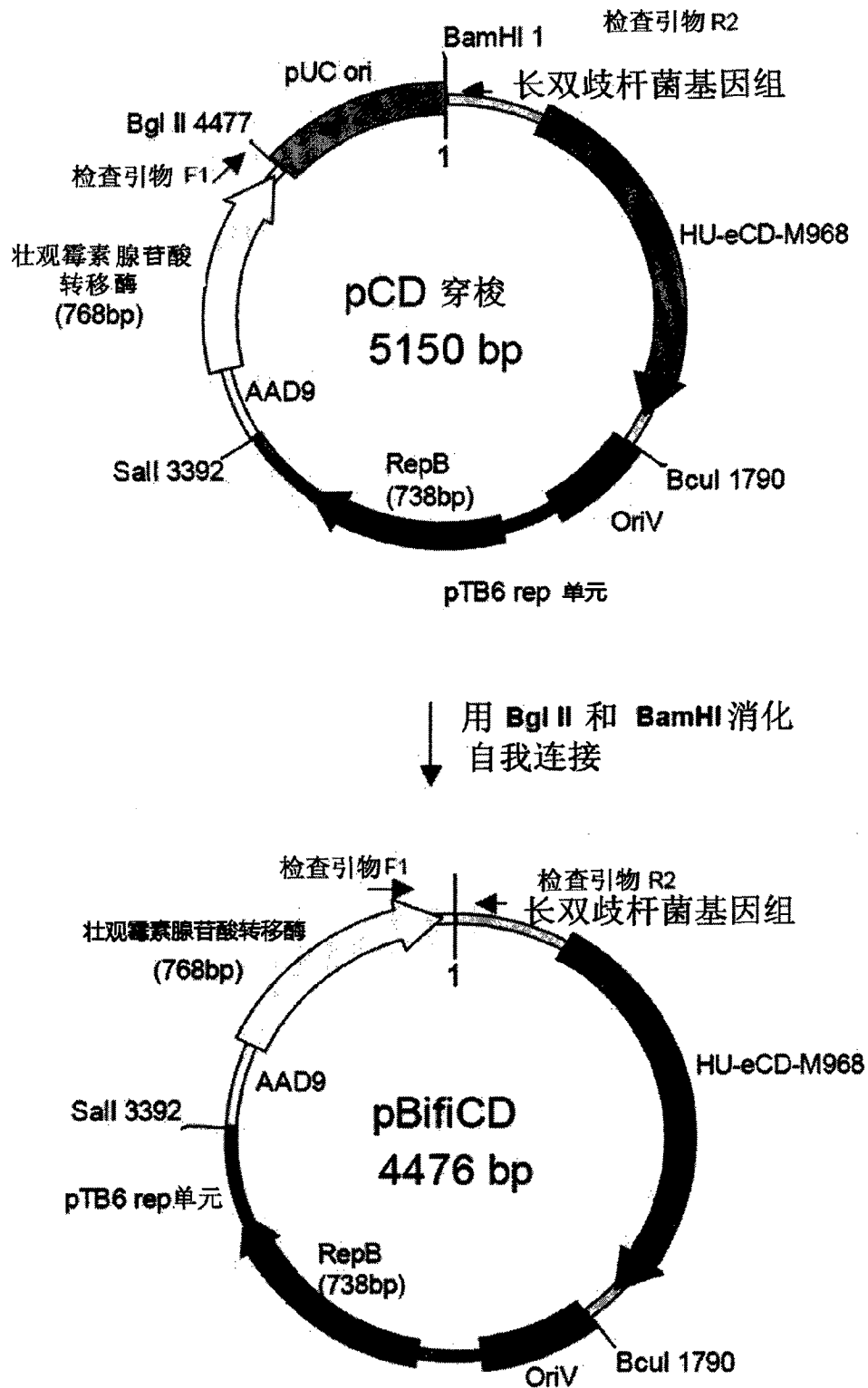
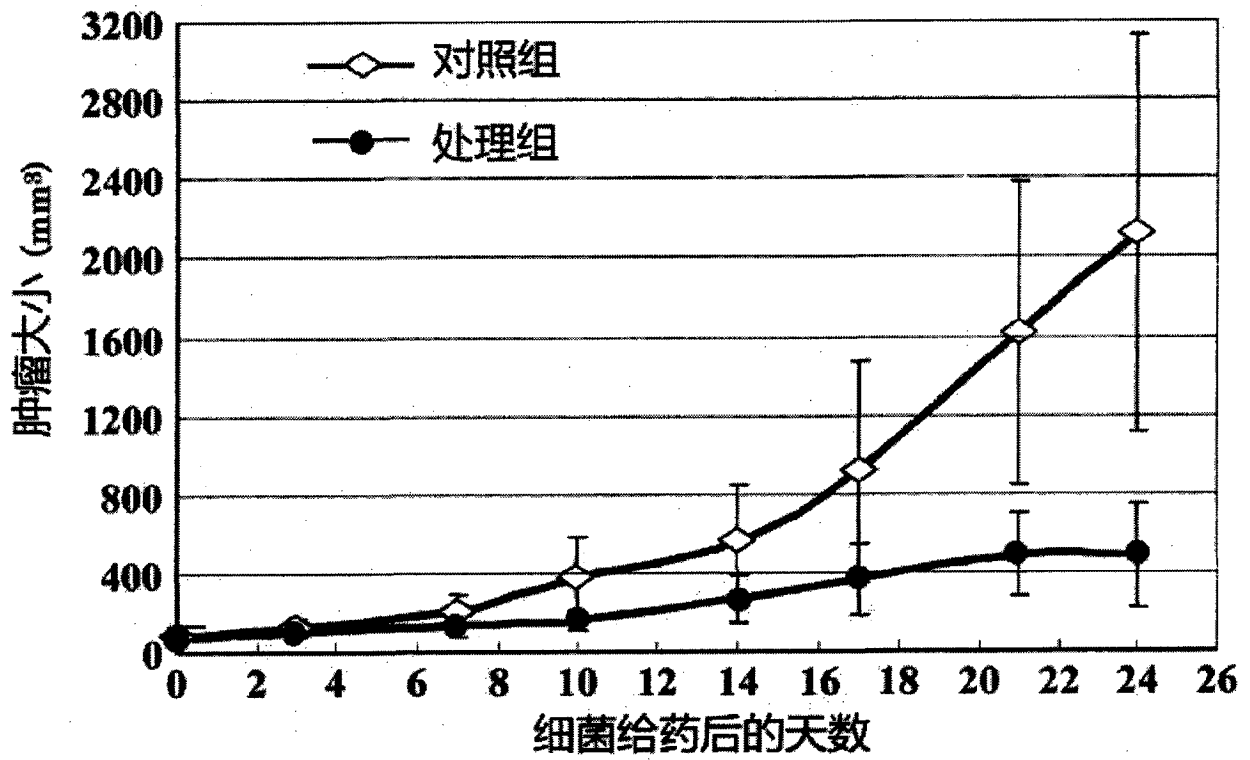


图 3



“pBifiCD”的构建过程（步骤4）

图 4



长双歧杆菌 Re-105A/pBifiCD 克隆菌株的抗肿瘤效果

图 5