



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 367 535**

51 Int. Cl.:
C12N 1/02 (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08101712 .1**
96 Fecha de presentación : **23.06.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1947171**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.07.2008**

54 Título: **Minicélulas bacterianas purificadas.**

30 Prioridad: **24.06.2003 US 602021**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
04.11.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
04.11.2011

73 Titular/es:
ENGINEIC MOLECULAR DELIVERY Pty. Ltd.
Building 2, 25 Sirius Road Lane Cove West
Sydney NSW 2066, AU

72 Inventor/es: **Brahmbhatt, Himanshu y**
MacDiarmid, Jennifer

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 367 535 T3

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

DESCRIPCIÓN

Minicélulas bacterianas purificadas

Antecedentes de la invención

La presente invención se refiere a minicélulas bacterianas purificadas.

5 Una minicélula es una forma anucleada de una célula bacteriana *E. coli* u otra, engendrada por una perturbación en la coordinación, durante la fisión binaria, de la división celular con segregación de ADN. La replicación cromosómica procarionota está ligada a fisión binaria normal, que implica formación de tabique celular medio. En *E. coli*, por ejemplo, la mutación de genes *min*, tales como *minCD*, pueden eliminar la inhibición de formación de tabique en los polos celulares durante la división celular dando como resultado producción de una célula hija normal y una minicélula anucleada (de Boer y col., 1992; Raskin & de Boer, 1999; Hu & Lutkenhaus, 1999; Harry, 2001).

Además de las mutaciones de operón *min*, las minicélulas anucleadas también se generan después de una serie de otros reordenamientos genéticos o mutaciones que afectan a la formación del tabique, por ejemplo, en el *divVB1* en *B. subtilis* (Reeve y Cornett, 1975; Levin y col., 1992). También pueden formarse minicélulas después de una perturbación en los niveles de expresión génica de proteínas implicadas en la división celular/segregación cromosómica. Por ejemplo, la sobreexpresión de *minE* conduce a división polar y producción de minicélulas. De forma similar, pueden resultar minicélulas sin cromosomas de defectos en segregación cromosómica, por ejemplo la mutación *smc* en *Bacillus subtilis* (Britton y col., 1998), delección *spoOJ* en *B. subtilis* (Ireton y col., 1994), mutación *mukB* en *E. coli* (Hiraga y col., 1989) y mutación *parC* en *E. coli* (Stewart y D'Ari, 1992). Pueden proporcionarse productos génicos en trans. Cuando se sobreexpresa de un plásmido de alto número de copias, por ejemplo, CafA puede potenciar la tasa de división celular y/o inhibir la partición de cromosomas después de la replicación (Okada y col., 1994), dando como resultado la formación de células encadenadas y minicélulas anucleadas (Wachi y col., 1989; Okada y col., 1993).

Las minicélulas son distintas de otras vesículas pequeñas que se generan y se liberan espontáneamente en ciertas situaciones y, a diferencia de las minicélulas, no se deben a reordenamientos genéticos específicos o expresión génica episomal. Son ejemplares de tales otras vesículas las ampollas bacterianas, que son vesículas de membrana pequeñas (Dorward y col., 1989). Se han observado ampollas en varias especies bacterianas de *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Bordetella*, *Escherichia*, *Neisseria*, *Pseudomonas*, *Salmonella* y *Shigella*, por ejemplo. Pueden producirse ampollas bacterianas, por ejemplo, a través de la manipulación del ambiente de crecimiento (Katsui y col., 1982) y a través del uso de agentes desestabilizadores de membrana exógenos (Matsuzaki y col., 1997).

Debido a que la replicación plasmídica dentro de células procarionotas es independiente de la replicación cromosómica, los plásmidos pueden segregarse en tanto células hijas normales como minicélulas durante la división celular aberrante descrita anteriormente. Por lo tanto, las minicélulas derivadas de *E. coli min* recombinante portan números significativos de copias de plásmidos, con todos los componentes celulares bacterianos excepto cromosomas y se han usado como tal en el estudio de la expresión génica codificada por plásmido *in vitro*. Véase Brahmhatt (1987), Harlow y col. (1995) y Kihara y col. (1996). Brahmhatt (1987) demostró, por ejemplo, que las minicélulas de *E. coli* pueden portar plásmidos recombinantes con insertos de ADN de hasta 20 kb, sin ningún ADN cromosómico y pueden expresar nueve o más proteínas recombinantes simultáneamente.

Una solicitud de patente reciente, el documento WO 03033519, describió minicélulas intactas recombinantes que contienen moléculas de ácido nucleico terapéuticas. Tales minicélulas son vectores eficaces para suministrar oligonucleótidos y polinucleótidos a células huésped *in vitro* e *in vivo*. En consecuencia, son particularmente útiles para introducir moléculas de ácido nucleico que, tras la transcripción y/o traducción, actúan para aliviar o tratar de otro modo una enfermedad o modificar un rasgo asociado con un tipo de célula, tejido u órgano particular de un sujeto.

Las aplicaciones de minicélulas *in vivo* generalmente requieren preparaciones de minicélulas de una alta pureza, particularmente con respecto a las bacterias parentales vivas, endotoxina libre y residuos celulares (incluyendo bacterias parentales muertas, fragmentos de membrana, ácidos nucleicos y componentes intracelulares) que podrían inducir una respuesta inflamatoria en un huésped inmunizado. Además, el uso de minicélulas en productos farmacéuticos comerciales requerirá procedimientos para purificar minicélulas según patrones farmacéuticos internacionales aprobados. Para este fin, los procedimientos convencionales de purificación de minicélulas generalmente son insatisfactorios.

Las técnicas convencionales implican (a) centrifugación a baja velocidad, para reducir la biocarga de células parentales y (b) sedimentación de tasa diferencial en un gradiente de glicerol, sacarosa o percol. Un diferencial inicial, la centrifugación a baja velocidad normalmente reduce las células parentales hasta en 100 veces, dejando de 50 % a 70 % de las minicélulas en el fluido sobrenadante. Dos ciclos posteriores de sedimentación de tasa diferencial producen después preparaciones de minicélulas que tienen una pureza de aproximadamente 1 célula vegetativa por 10^6 - 10^7 minicélulas. Tales procedimientos convencionales se revisan en Frazer & Curtiss (1975) y se describen por Reeve (1979), Clark-Curtiss & Curtiss (1983) y la Patente de Estados Unidos N° 4.311.797 (de Khachatourians).

La pureza conseguida por procedimientos de purificación convencionales puede no ser adecuada para todas las aplicaciones *in vivo*, algunas de las cuales pueden requerir dosis mayores de 10^6 minicélulas o incluso 10^{10} minicélulas. A la relación de contaminación anteriormente mencionada, esto se traduciría en 10.000 células parentales vivas por dosis. Un nivel de contaminación tal podría ser letal, particularmente en pacientes inmunocomprometidos tales como pacientes de cáncer y SIDA. Por ejemplo, la DI_{50} (dosis infecciosa en 50 % de las personas infectadas) para organismos *Shigella dysenteriae*, *Salmonella enteritidis* y *Listeria monocytogenes* es de aproximadamente 10, 1.000, y 10 respectivamente. Además, estudios anteriores han indicado que el nivel de contaminación de células parentales varía con las diferentes cepas bacterianas (Clarke-Curtiss y Curtiss, 1983). A este respecto, las aplicaciones de terapia génica descritas en el documento WO 03033519 pueden emplear minicélulas derivadas de una serie de cepas bacterianas mutantes Gram-negativas y Gram-positivas y requerirían minicélulas que están esencialmente sin contaminación de células bacterianas parentales vivas. Por lo tanto, los procedimientos de purificación de minicélulas convencionales no permiten el control de calidad para fabricación cGMP (buenas prácticas de fabricación actuales) de dosis biofarmacéuticas de minicélulas.

Como un inconveniente adicional, los medios de formación de gradiente (percol, sacarosa y glicerol) empleados por procedimientos de purificación convencionales son incompatibles con usos *in vivo*. El percol es tóxico y, por lo tanto, se restringe a contextos de "finés de investigación solamente". La sacarosa transmite una alta osmolaridad a gradientes que puede provocar cambios fisiológicos en las minicélulas. De hecho, los presentes inventores han determinado que las minicélulas experimentan un choque osmótico en gradientes de sacarosa y, como consecuencia, se vuelven estructuralmente deformadas. El glicerol es altamente viscoso y difícil de retirar completamente de las suspensiones de minicélulas. En consecuencia, aunque estos medios de gradiente de densidad separan eficazmente células y orgánulos o componentes celulares, no son adecuados para separar células biológicas que están destinadas a uso clínico en seres humanos.

Se han desarrollado varios enfoques para mejorar las técnicas de purificación de minicélulas convencionales. Un enfoque emplea células parentales que portan una mutación *recA* cromosómica y tratamiento con dosis bajas de radiación ultravioleta (UV) (Sancar y col., 1979). El fundamento de este enfoque es que la radiación UV degradará preferentemente el ADN cromosómico debido a su gran tamaño de diana, a diferencia de ADN plasmídico menor. Sin embargo, las minicélulas recombinantes usadas para terapia génica y aplicaciones de vacuna deben estar sin ninguna mutación y los procedimientos de mutagénesis no específicos tales como radiación UV no asegurarían que todos los ADN plasmídicos permanezcan no mutados.

Otro enfoque para mejorar la purificación de minicélulas funciona inhibiendo la síntesis de pared celular bacteriana, tal como usando ampicilina o cicloserina o sometiendo a inanición a cepas que requieren ácido diaminopimélico (DAP) de DAP (Clarke-Curtiss y Curtiss, 1983). Sin embargo, este enfoque también padece varios inconvenientes. Primero, muchos plásmidos recombinantes usados para terapia génica portarán un marcador de resistencia a ampicilina, que hace a las células parentales que portan el plásmido resistentes a ampicilina. Segundo, muchas aplicaciones de minicélulas *in vivo* emplearán minicélulas derivadas de una serie de diferentes especies bacterianas, muchas de las cuales pueden no ser susceptibles a mutaciones que requieren DAP. Tercero, cualquier uso a gran escala de antibióticos no es deseable debido a los riesgos consiguientes de generar bacterias resistentes a antibióticos.

Recientemente, se ha indicado un nuevo enfoque para purificar minicélulas que aborda las preocupaciones anteriormente mencionadas (documento WO 03033519). El nuevo procedimiento combina filtración de flujo cruzado (el flujo de alimentación es paralelo a la superficie de membrana; Forbes, 1987) y filtración cerrada (el flujo de alimentación es perpendicular a la superficie de membrana) para conseguir una pureza de minicélulas superior a 10^7 (es decir, menos de una célula parental por 10^7 minicélulas) e incluso 10^9 . Opcionalmente, la combinación de filtración puede precederse de una centrifugación diferencial, a baja fuerza centrífuga, para retirar alguna parte de las células bacterianas y enriquecer de este modo el sobrenadante para las minicélulas.

Aunque este procedimiento de filtración supera los inconvenientes asociados con técnicas de purificación de minicélulas convencionales, también tiene limitaciones. En primer lugar, la filtración de flujo cruzado da como resultado una pérdida considerable de minicélulas, que añade coste al procedimiento de fabricación. Adicionalmente, las preparaciones de minicélulas obtenidas por el procedimiento de filtración contienen algo de endotoxina bacteriana, que provoca un choque suave cuando se administra *in vivo*. Finalmente, la pureza de las minicélulas varía de lote a lote cuando se emplean procedimientos de filtración.

Sigue existiendo una necesidad de minicélulas bacterianas de alta pureza.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona preparaciones de minicélulas purificadas, preparadas de acuerdo con los procedimientos desvelados a continuación. Las preparaciones de minicélulas purificadas contienen menos de aproximadamente 1 célula bacteriana parental contaminante por 10^{10} o 10^{11} minicélulas. También preferentemente, las preparaciones de minicélulas purificadas están sustancialmente libres de endotoxina y residuos celulares (incluyendo bacterias parentales muertas, fragmentos de membrana, ácidos nucleicos y componentes intracelulares) que podrían inducir una respuesta inflamatoria o choque endotóxico en un huésped inmunizado.

Breve descripción de los dibujos

La **Figura 1** representa una forma en la que las técnicas de purificación de minicélulas de la presente invención pueden integrarse con otros procedimientos de purificación de minicélulas.

5 La **Figura 2** muestra micrografías electrónicas de barrido de bacterias *S. typhimurium* de cepa *minCDE* (intervalo de tamaños diferentes) y minicélulas derivadas de la cepa. **(A)** Muestra una bacteria parental de tamaño pequeño (1,1 μm de largo) y una minicélula (0,4 μm de diámetro), **(B)** muestra una bacteria parental mayor (1,32 μm de largo), **(C)** muestra una bacteria parental aun mayor (1,6 μm de largo) y **(D)** muestra una mezcla de bacterias parentales y minicélulas, en la que la primera varía en longitud de 1 μm a 4 μm .

10 La **Figura 3A** muestra la filamentación de bacterias parentales *S. typhimurium* de cepa *minCDE* después de incubación con diversas concentraciones de NaCl durante diversos tiempos.

La **Figura 3B** muestra imágenes de microscopía de fluorescencia que compara los tamaños de bacterias *S. typhimurium* de cepa *minCDE* incubadas en medio de crecimiento durante 4 horas en ausencia de NaCl (imagen del lado izquierdo) y de filamentos bacterianos formados después de 4 horas de incubación en presencia de NaCl 5 % (imagen del lado derecho).

15 La **Figura 4A** muestra la filamentación de bacterias parentales *E. coli* de cepa *minCDE* después de incubación con diversas concentraciones de NaCl durante diversos tiempos.

20 La **Figura 4B** muestra imágenes de microscopía de fluorescencia que comparan los tamaños de bacterias *E. coli* de cepa *minCDE* incubadas en medio de crecimiento durante 4 horas en ausencia de NaCl (imagen del lado izquierdo) y de filamentos bacterianos formados después de 4 horas de incubación en presencia de NaCl 5 % (imagen del lado derecho).

25 Las **Figuras 5A-C** muestran 3 etapas de purificación secuencial de minicélulas usando medios biológicamente compatibles, por ejemplo, Optiprep, para la centrifugación de gradiente de densidad como se describe en el Ejemplo 3. La preparación de minicélulas en bruto separada por la primera centrifugación de gradiente de densidad (Figura 5A) revela los contaminantes, es decir, sedimento bacteriano significativo y células bacterianas de tamaño relativamente pequeño que forman una banda entre las minicélulas y el sedimento bacteriano. La banda de minicélulas se recogió y se procesó a través de un segundo gradiente de Optiprep (Figura 5B) revelando una banda de minicélulas más clara, una banda más aguda de células bacterianas pequeñas y un sedimento bacteriano insignificante. La banda de minicélulas se recogió y se procesó a través de un tercer gradiente de Optiprep (Figura 5C) que reveló una purificación significativa de las minicélulas.

30 Las **Figuras 6A-C** muestran los conteos de minicélulas (Figura 6A), células bacterianas viables (Figura 6B) y endotoxina (UE; Figura 6C), respectivamente, durante las etapas de un procedimiento de purificación de minicélulas. Las diferentes etapas en el procedimiento de purificación en las que se recogieron muestras para análisis se muestran en el eje de las x. Se describen detalles experimentales en el Ejemplo 5. Cada valor es una media de tres muestras y cada muestra se recogió de un procedimiento de purificación separado. Se muestran las barras de error típico.

Descripción detallada de realizaciones preferidas

40 Los presentes inventores han determinado que el uso de medios biológicamente compatibles mejora la purificación de minicélulas convencional. A este respecto, han observado que los medios de gradiente de densidad habitualmente usados, aunque son eficaces en la separación de minicélulas de contaminantes, con frecuencia tienen efectos negativos en las minicélulas. Por ejemplo, los procedimientos convencionales habitualmente emplean gradientes de sacarosa al 30 % y requieren de dos a tres purificaciones de gradiente de sacarosa repetidas para conseguir la pureza adecuada. Esto expone las minicélulas a alta presión osmótica durante hasta dos horas, provocando probablemente choque osmótico a las minicélulas. Los presentes inventores han descubierto que las minicélulas purificadas en gradientes de sacarosa con frecuencia están significativamente deformadas en relación con minicélulas purificadas por otros medios. Presumiblemente, la deformidad resulta de desestabilización de membrana, que permite un exceso de fluido en las minicélulas. Dicha desestabilización de membrana y su aumento consiguiente de la porosidad de membrana, también podría permitir que contenidos del citosol, incluyendo ácidos nucleicos terapéuticos, se filtren fuera de las minicélulas.

50 En un aspecto, por lo tanto la presente invención considera un procedimiento de purificación de minicélulas que comprende separar minicélulas de células bacterianas parentales y otros contaminantes mediante centrifugación de gradiente de densidad en un medio biológicamente compatible. Después de la centrifugación, se recoge una banda de minicélulas del gradiente y, opcionalmente, las minicélulas pueden someterse a ciclos adicionales de centrifugación de gradiente de densidad para maximizar la pureza. El procedimiento puede incluir adicionalmente una etapa preliminar de realizar centrifugación diferencial en la muestra que contiene minicélulas. Cuando se realiza a baja fuerza centrífuga, la centrifugación diferencial retirará cierta parte de las células bacterianas parentales, enriqueciendo de este modo el sobrenadante con respecto a minicélulas.

“Medios biológicamente compatibles”, usado en este contexto, se refiere a medios que no afectan de forma negativa a la fisiología o morfología de las minicélulas. Preferentemente, los medios biológicamente compatibles tampoco afectan negativamente a la fisiología de las células huésped o a la fisiología del organismo huésped. El significado de “biológicamente compatible” es por lo tanto contextual. Por ejemplo, un medio particular puede ser biológicamente compatible para un tipo de minicélula, pero tóxico para otro. Preferentemente los medios biológicamente compatibles son tanto isotónicos como no tóxicos.

OptiPrep™ (Axis-Shield PLC, Dundee, Escocia), que es una solución al 60 % (p/v) estéril de iodixanol (5,5'-[(2-hidroxi-1-3propanodiol)-bis(acetilamino)] bis [N,N'-bis(2,3dihidroxipropil-2,4,6-triyodo-1,3-benzenocarboxamida)] en agua, constituye un ejemplo altamente preferido de un medio biológicamente compatible. Los investigadores han usado ampliamente OptiPrep™ y otros medios de gradiente de densidad similares para purificar orgánulos y células de mamíferos, así como vesículas de membrana, virus, proteínas, ácidos nucleicos y lipoproteínas. Estos usos se revisan en Density Gradient Media. Applications and Products 2002, Axis-Shield PLC, Dundee, Escocia. Tales medios no se emplearon previamente, sin embargo, para purificar minicélulas derivadas de bacterias. De hecho, antes de la observación de los presentes inventores de que otros medios afectan negativamente a la fisiología y morfología de las minicélulas, no se había reconocido siquiera una necesidad de medios biológicamente compatibles para purificar minicélulas.

Con OptiPrep™ es posible usar gradientes preformados o formar un gradiente *in situ* por centrifugación (gradiente autogenerado). Los gradientes preformados pueden ser gradientes continuos o discontinuos. Los gradientes preformados de OptiPrep™ pueden formarse estratificando soluciones de las concentraciones deseadas en un tubo de centrífuga y permitiendo a las soluciones difundirse sellando la parte superior del tubo y apoyándolo sobre un lado durante la difusión. La preparación de gradientes de densidad isoosmóticos con OptiPrep™ depende de la preparación de soluciones de gradiente por dilución de solución de OptiPrep™ con una solución diluyente apropiada. La selección de una solución diluyente y equilibradores osmóticos está dentro de la experiencia habitual de los facultativos.

En otro aspecto, la presente invención combina centrifugación de gradiente de densidad en un medio biológicamente compatible con etapas de filtración. Por ejemplo, la centrifugación de gradiente de densidad puede incorporarse en un procedimiento de filtración en serie como se ejemplifica en la Figura 1. Un procedimiento de filtración en serie tal se describe en el documento WO 03033519. Brevemente, este proceso combina filtración de flujo cruzado (el flujo de alimentación es paralelo a una superficie de membrana) y filtración cerrada (el flujo de alimentación es perpendicular a una superficie de membrana). Opcionalmente, esta combinación puede precederse de una centrifugación diferencial, a baja fuerza centrífuga, para retirar alguna parte de las células bacterianas parentales y enriquecer de este modo el sobrenadante con respecto a minicélulas. También opcionalmente, la combinación puede seguirse de un tratamiento con antibióticos para matar las células bacterianas parentales residuales.

La filtración de flujo cruzado, dependiendo del tamaño de poro del filtro, puede separar minicélulas de contaminantes mayores tales como células bacterianas parentales y de contaminantes menores tales como ampollas bacterianas, endotoxina libre, ácidos nucleicos, residuos celulares y exceso de líquido. Para separar las minicélulas de contaminantes mayores, el tamaño de poro concreto de los filtros de flujo cruzado debería permitir a las minicélulas penetrar a través de los filtros, pero no a las células bacterianas grandes. Se prefiere un tamaño de poro de 0,45 µm para este fin debido a que las minicélulas son de aproximadamente 0,4 µm de diámetro, mientras que las células bacterianas son mayores. Para separar minicélulas de contaminantes menores, el tamaño de poro concreto de los filtros de flujo cruzado debería permitir a los contaminantes menores penetrar a través de los filtros pero no a las minicélulas. Se prefiere un tamaño de poro de 0,2 µm para este fin debido a que las ampollas bacterianas varían en diámetro de 0,05 µm a 0,2 µm y los otros contaminantes menores son menores de 0,2 µm.

La aplicación eficaz de filtración de flujo cruzado en este contexto normalmente supone al menos una etapa que implica un tamaño de poro mayor, aproximadamente 0,45 µm, seguido de al menos una etapa con un tamaño menor, aproximadamente 0,2 µm. Entre o durante las etapas de filtración de flujo cruzado en serie, puede realizarse diafiltración para maximizar la recuperación de minicélulas. En la diafiltración, el volumen se mantiene constante y se usan las membranas de ultrafiltración para conservar las partículas deseadas (minicélulas, en este caso), mientras que se retiran los solutos y partículas menores no deseadas.

El uso de filtración de flujo cruzado da cabida a suspensiones que portan cargas pesadas de materia en partículas, tales como cultivos bacterianos, que pueden portar cargas de poblaciones de minicélulas y bacterianas de 10^{11} a 10^{13} por litro de cultivo. Para minimizar la obstrucción del filtro y la pérdida posterior de minicélulas, el cultivo bacteriano/minicelular puede diluirse, preferentemente de 5 veces a 10 veces. Las diluciones también permiten el uso de una presión de bomba y caudal apropiadamente bajos.

Para retirar las células bacterianas parentales residuales que permanecen después de la filtración de flujo cruzado, puede realizarse filtración cerrada. Para este fin, se prefiere el uso de al menos una filtración cerrada, empleando un tamaño de poro de aproximadamente 0,45 µm.

En una realización, un procedimiento de purificación de minicélulas combina centrifugación de gradiente de densidad

a través de un medio biológicamente compatible con una etapa de filtración que emplea al menos un filtro con un tamaño de poro menor de o igual a aproximadamente 0,2 μm .

5 En otra realización, un procedimiento de purificación de minicélulas combina centrifugación de gradiente de densidad a través de un medio biológicamente compatible con una etapa de filtración cerrada que emplea un filtro con un tamaño de poro de aproximadamente 0,45 μm .

10 Los presentes inventores también han descubierto que inducir a las células bacterianas parentales a adoptar una forma filamentosa, antes de la filtración, mejora significativamente la purificación de minicélulas. Debido a que las minicélulas y células bacterianas parentales tienen el mismo diámetro (media de 0,4 μm) algunas células bacterianas pueden penetrar a través de un poro de filtro que apenas aloja una minicélula (por ejemplo, poros de filtro cerrado o de flujo cruzado de 0,45 μm), incluso aunque la longitud de las células bacterianas es de al menos 1 μm . Esto sucede cuando una célula bacteriana oblonga se coloca perpendicular a un filtro. Sin embargo, los filamentos de células bacterianas, que consisten en células bacterianas unidas de extremo a extremo no pueden penetrar en tales filtros.

15 Por lo tanto, otro aspecto de la invención implica contaminar las células bacterianas parentales para que formen filamentos antes de la filtración. Esto se consigue sometiendo a una suspensión de minicélulas a condiciones ambientales que inducen una respuesta de estrés en células parentales. Tales condiciones las conocen bien los expertos en la materia e incluyen condiciones anaerobias, condiciones limitantes de nutrientes y condiciones osmóticas anómalas. Los medios hipertónicos son particularmente útiles para inducir filamentación. En un ejemplo, una suspensión de minicélulas puede complementarse con caldo de cultivo de soja Trypticase (medio de crecimiento) que contiene cloruro sódico 5 % (inductor de estrés). En tales condiciones inductoras de estrés, las células no se tabican completamente durante la división celular y forman filamentos bacterianos largos que consisten en múltiples células.

25 Las realizaciones preferidas de la invención explotan la filamentación bacteriana para aumentar la pureza de minicélulas. Por lo tanto, en un aspecto, la invención proporciona un procedimiento de purificación de minicélulas que incluye las etapas de (a) someter a una muestra que contiene minicélulas a centrifugación de gradiente de densidad en un medio biológicamente compatible y (b) someter a la muestra que contiene minicélulas a una condición que induce a las células bacterianas parentales a adoptar una forma filamentosa, seguido de (c) filtrar la muestra para obtener una preparación de minicélulas purificada.

30 Los presentes inventores han descubierto adicionalmente que la retirada de endotoxina mejora las preparaciones de minicélulas. En estudios en ratones *in vivo*, observaron un choque suave resultante del uso de preparaciones de minicélulas que contenían endotoxinas residuales. Por lo tanto, las preparaciones de minicélulas útiles preferentemente están sustancialmente libres de endotoxinas, lo que significa que contienen niveles clínicamente insignificantes de endotoxina o niveles que no inducirían una respuesta inflamatoria o choque endotóxico en un paciente.

35 Se conocen bien en la técnica procedimientos para retirar endotoxinas. Un procedimiento ejemplar usa perlas magnéticas (por ejemplo, Dynabeads™; Dynal biotech, Oslo, Noruega) revestidas con anticuerpos anti-lípido A. Las perlas magnéticas revestidas con anticuerpo pueden mezclarse con una suspensión de minicélulas en un tubo e incubarse para permitir que el anticuerpo se una a lipopolisacárido libre (LPS) mediante su parte de lípido A. El tubo que porta la suspensión se coloca después en un soporte magnético para inmovilizar las perlas magnéticas en complejo con LPS-anti-lípido A y se recogen las minicélulas. Pueden realizarse múltiples ciclos de incubación con perlas nuevas para conseguir el nivel deseado de pureza.

45 Los anticuerpos monoclonales que se unen a epítomos hallados en la parte polisacárida del núcleo profundo de LPS también son útiles para retirar endotoxina libre. No se cree que la parte polisacárida de núcleo profundo de LPS esté expuesta en la superficies de membranas bacterianas. Por lo tanto, los anticuerpos dirigidos contra esta parte de LPS no deberían unirse a LPS unido a célula bacteriana. Antes de su uso, tales anticuerpos deberían ensayarse para asegurar que no reaccionan de forma cruzada con componentes expuestos en superficie celular de LPS.

50 Debido al potencial de las endotoxinas bacterianas para provocar efectos secundarios negativos, los procedimientos de purificación de minicélulas preferidos incluyen una o más etapas para retirarlas. Por lo tanto, en un aspecto, la invención proporciona un procedimiento de purificación de minicélulas que emplea una etapa de centrifugación de gradiente de densidad en un medio biológicamente compatible, seguido de una o más etapas para retirar endotoxina de la preparación de minicélulas enriquecida resultante. Más preferentemente, el procedimiento incluye adicionalmente una o más etapas de filtración, como se ha descrito anteriormente.

55 Las técnicas de purificación de minicélulas descritas en el presente documento pueden emplearse en diversas combinaciones para obtener una preparación de una pureza deseada. Los procedimientos preferidos incluyen una combinación de filtración y centrifugación de gradiente de densidad. Los procedimientos preferidos también incluyen filamentación inducida por estrés de células bacterianas parentales seguido de filtración y retirada de endotoxina de preparaciones de minicélulas. Un ejemplo de un procedimiento (representado de forma esquemática en la Figura 1) que emplea todas estas técnicas es como sigue:

- Etapa A: Centrifugación diferencial de un cultivo de células bacterianas productor de minicélulas. Esta etapa, que puede realizarse a 2000g durante aproximadamente 20 minutos, retira la mayoría de las células bacterianas parentales, mientras que deja las minicélulas en el sobrenadante.
- 5 Etapa B: Centrifugación de gradiente de densidad usando un medio de gradiente de densidad no tóxico e isotónico. Esta etapa separa las minicélulas de muchos contaminantes, incluyendo células bacterianas parentales con mínima pérdida de minicélulas. Preferentemente, esta etapa se repite dentro de un procedimiento de purificación.
- Etapa C: Filtración de flujo cruzado a través de un filtro de 0,45 μm para reducir adicionalmente la contaminación de células bacterianas parentales.
- 10 Etapa D: Filamentación inducida por estrés de células bacterianas parentales residuales. Esto puede conseguirse sometiendo la suspensión de minicélulas a cualquiera de varias condiciones ambientales inductoras de estrés.
- Etapa E: Tratamiento con antibióticos para matar las células bacterianas parentales.
- 15 Etapa F: Filtración de flujo cruzado para retirar pequeños contaminantes, tales como ampollas de membrana, fragmentos de membrana, residuos bacterianos, ácidos nucleicos, componentes del medio y así sucesivamente y para concentrar las minicélulas. Puede emplearse un filtro de 0,2 μm para separar las minicélulas de contaminantes pequeños y puede emplearse un filtro de 0,1 μm para concentrar las minicélulas.
- 20 Etapa G: Filtración cerrada para eliminar células bacterianas muertas filamentosas. Puede emplearse un filtro de 0,45 μm para esta etapa.
- Etapa H: Retirada de endotoxina de la preparación de minicélulas. Puede emplearse perlas magnéticas revestidas con anti-lípido A para esta etapa.

Los expertos en la materia pueden implementar variaciones de estas etapas e incorporar etapas de purificación adicionales, coherentes con los principios descritos en este documento.

- 25 Los procedimientos anteriores para purificar minicélulas bacterianas proporcionan preparaciones de minicélulas purificadas útiles para aplicaciones *in vivo* tales como las descritas en el documento WO 03033519. Estas preparaciones contienen menos de aproximadamente 1 célula bacteriana parental contaminante por 10^7 minicélulas, preferentemente menos de aproximadamente 1 célula bacteriana parental contaminante por 10^8 minicélulas, más preferentemente menos de aproximadamente 1 célula bacteriana parental contaminante por 10^9 minicélulas, incluso
- 30 más preferentemente menos de aproximadamente 1 célula bacteriana parental contaminante por 10^{10} minicélulas y aún más preferentemente menos de aproximadamente 1 célula bacteriana parental contaminante por 10^{11} minicélulas. Preferentemente, todas las células bacterianas parentales contaminantes están muertas y estas preparaciones no contienen ninguna célula bacteriana parental viva. También preferentemente, las preparaciones de minicélula purificadas están sustancialmente libres de endotoxinas y residuos celulares (incluyendo bacterias parentales muertas, fragmentos de membrana, ácidos nucleicos y componentes intracelulares). Como se ha explicado previamente, una preparación de minicélulas está sustancialmente libre de endotoxinas si la preparación contiene niveles clínicamente insignificantes de endotoxina o niveles que no inducirían una respuesta inflamatoria o
- 35 choque endotóxico en un paciente. De forma similar, una preparación de minicélulas está sustancialmente libre de residuos celulares si contiene niveles clínicamente insignificantes de residuos celulares o niveles que no inducirían una respuesta inflamatoria en un paciente.
- 40

La referencia a los siguientes ejemplos ilustrativos ayudará a proporcionar un entendimiento más completo de la invención.

Ejemplo 1 – Imperfección de la filtración sin las técnicas de la invención

- 45 Este ejemplo ilustra que el uso de filtración para purificar minicélulas, sin las técnicas de la invención, puede producir resultados imperfectos.

- Se analizan cepas bacterianas mutantes productoras de minicélulas de *S. typhimurium*, *E. coli* y *Shigella flexneri* por microscopía electrónica de barrido (SEM) para determinar el tamaño de las células bacterianas y minicélulas. Para la microscopía electrónica de barrido de alta resolución se sigue el siguiente procedimiento. Los cultivos bacterianos se dejan crecer en caldo de cultivo de soja Trypticase (TSB) (marca BBL obtenida de Bacto Labs, Liverpool, NSW, Australia). El caldo de cultivo se prepara de acuerdo con las instrucciones del fabricante a 30 g/l y se esteriliza en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. El cultivo líquido se deja crecer durante una noche en un incubador en
- 50 agitación a 37 °C. Para cambiar las soluciones las células se centrifugan a 13.000 rpm durante 20 minutos, el sobrenadante se descarta y las células se resuspenden en el nuevo reactivo (descrito posteriormente) usando un mezclador de vórtex. Esto retira por lavado iones y biomateriales de las células y las deja suspendidas en un volumen pequeño de agua destilada. La secuencia de reactivos es (a) 1 ml de agua destilada - resedimentar, (b) 1
- 55

ml de agua destilada - resuspender, (c) depositar 250 μ l en una placa de muestra de latón limpia, (d) secar durante una noche a 30 °C, (e) revestir justo antes de la microscopía con 2 nm de metal cromo depositado en un revestidor por pulverización en vacío limpio Xenosput. Las muestras de ensayo revestidas se examinan usando un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo Hitachi S-900 usando una energía de haz de 3 kilovoltios (Universidad de Nueva Gales de Sur, NSW, Australia). Las imágenes digitales a diferentes aumentos se registran usando un digitalizador ImageSlave.

Los resultados muestran (se muestran imágenes representativas de *S. typhimurium* de cepa *min*CDE en las Figuras 2A-D) que las células bacterianas parentales varían en longitud de 0,9 μ m a 4 μ m y de 0,4 μ m a 0,5 μ m de anchura. Después de las etapas de filtración descritas en el lado izquierdo de la Figura 1, algunos lotes muestran contaminación bacteriana residual. Las bacterias contaminantes son de tamaño pequeño, es decir, aproximadamente 0,9 μ m de longitud. Esto indica que algunas bacterias de tamaño pequeño que son aproximadamente de la misma anchura que las minicélulas (Figura 2A) se filtran a través de los filtros cerrados y de flujo cruzado de 0,45 μ m.

Ejemplo 2. Eliminación de bacterias pequeñas: conversión en filamentos bacterianos.

Este ejemplo demuestra que inducir las bacterias a adoptar forma de filamento antes de la filtración mejora los procedimientos de purificación de minicélulas.

Se diseña un estudio para afrontar el problema descrito en el Ejemplo 1, haciendo a las bacterias parentales de tamaño pequeño residuales sustancialmente mayores que el tamaño de poro de 0,45 μ m de un filtro cerrado. Las condiciones inductoras de estrés en un ambiente de crecimiento bacteriano pueden evitar la tabicación completa durante la división celular bacteriana, dando como resultado filamentos bacterianos.

El estudio demuestra que los medios de crecimiento bacterianos hipertónicos (inductores de estrés) inducen de forma fiable la filamentación de cepas bacterianas productoras de minicélulas de *S. typhimurium* y *E. coli*. Todas las bacterias se cultivan a partir de reservas de glicerol mantenidas a -80 °C. Las cepas de *S. typhimurium* y *E. coli* se cultivan en caldo de cultivo de soja Trypticase (TSB) (marca BBL obtenida de Bacto Labs, Liverpool, NSW, Australia). Se prepara de acuerdo con las instrucciones del fabricante a 30 g/l y se esteriliza en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. El cultivo líquido se deja crecer en un incubador en agitación a 37 °C. El cultivo bacteriano de una noche se diluye 1:5000 en TSB fresco y se deja crecer hasta que la DO_{600nm} alcance 0,2. El cultivo se divide en diez alícuotas de 5 ml en frascos estériles y se añade NaCl estéril previamente esterilizado en autoclave a cada frasco para producir concentraciones finales de NaCl (p/v) de 0 % (control), 2 %, 3 %, 4,5 %, 5 %, 5,5 %, 6 %, 7 % y 8 %. Los cultivos se incuban estáticamente a 37 °C y se obtienen muestras a las 2 horas, 4 horas, 8 horas y 24 horas. También se obtiene una muestra de control de hora cero para la microscopía. Las muestras se centrifugan a 13.200 rpm y los sedimentos bacterianos/minicelulares se resuspenden en agua destilada. Se coloca una gota de cada muestra en un portaobjetos de vidrio, se seca al aire y se fija por calor. Cada muestra se tiñe con Gram usando un lavado de alcohol al 95 % seguido de flujo de Safranina de Gram durante 1 minuto y un lavado de agua. Los portaobjetos se visualizan usando el microscopio óptico Leica modelo DMLB con análisis de imagen por medio de una cámara Leica DC y software de tratamiento de imágenes Leica IM. Las muestras se observan a 40X o inmersión en aceite a aumento 100X.

Los experimentos anteriores se repiten cuatro veces para determinar la fiabilidad de los resultados y también se realizan variaciones con una serie de controles.

Los resultados muestran (Figuras 3A-B y 4A-B) que con concentración creciente de NaCl, las células bacterianas forman filamentos que comprenden de dos a veinte cocobacilos adheridos de extremo a extremo. Dentro del intervalo de concentraciones de NaCl de 2 % a 3 %, la filamentación es variable (Figuras 3A y 4A), debido a que varias células bacterianas no forman filamentos incluso después de periodos de incubación más largos. Sin embargo, a NaCl de 4 % a 5 %, las células bacterianas se convierten de forma fiable en filamentos (Figuras 3B y 4B). El periodo de incubación óptimo para filamentación a NaCl de 4 % a 5 % es de aproximadamente 4 horas y generalmente no es necesaria incubación adicional hasta 24 horas. Las concentraciones salinas mayores de 5,5 % a 8 % reducen la formación de filamentos. Estudios preliminares para determinar un conteo bacteriano viable de cada muestra por siembra de dilución en placas de agar TSB sugieren que muere un número significativo de células bacterianas a concentraciones salinas mayores (NaCl de 5,5 % a 8 %), una razón potencial por la que se observa una reducción de la filamentación a estas concentraciones de NaCl.

Se realiza un estudio definitivo del efecto de las diversas concentraciones de NaCl sobre la viabilidad de las células bacterianas usando el Kit de Viabilidad Bacteriana LIVE/DEAD BacLight (Molecular Probes, Eugene, OR, Estados Unidos). El kit emplea dos tinciones de ácido nucleico, la tinción verde fluorescente SYTO® 9 y la tinción de yoduro de propidio rojo fluorescente. Estas tinciones difieren en su capacidad para penetrar células bacterianas sanas. La tinción SYTO 9 marca bacterias tanto vivas como muertas. Por el contrario, el yoduro de propidio (PI) penetra solamente bacterias con membranas dañadas, reduciendo la fluorescencia de SYTO 9 cuando están presentes ambos colorantes. Por lo tanto, las bacterias vivas con membranas intactas darán respuesta fluorescente verde, mientras que las bacterias muertas con membranas dañadas darán respuesta fluorescente roja. El experimento anteriormente descrito sobre filamentación inducida por sal se repite y se obtienen muestras de 0 horas, 2 horas, 4

horas, 8 horas y 24 horas para las diversas concentraciones de NaCl. Las muestras se centrifugan a 13.200 rpm, se descarta el sobrenadante y se resuspende el sedimento bacteriano/minicelular en 100 µl de BSG. Se añaden 0,5 µl de una mezcla 50/50 de SYTO 9/PI a cada muestra y se incuba durante 15 minutos. Las muestras se centrifugan a 13.200 rpm, se descarta el sobrenadante y se resuspenden los sedimentos en 100 µl de agua destilada. Se coloca una gota de cada muestra en un portaobjetos de vidrio, se seca al aire y se cubre con una gota de aceite de montaje BacLight. Cada muestra se visualiza usando el microscopio óptico Leica modelo DMLB con análisis de imagen por medio de una cámara Leica DC y software de adquisición de imágenes digitales Leica. Las muestras se observan a 40X o en inmersión de aceite a aumento 100X.

Los resultados muestran (fotos en color no mostradas) que a concentraciones de NaCl de 5,5 % y mayores, un número significativo de células bacterianas dan respuesta fluorescente roja (células muertas) y a concentraciones de NaCl de 7 % y 8 %, casi todas las células bacterianas están muertas en un periodo de dos horas de incubación. Este resultado muestra que NaCl de 4 % a 5 % durante un tiempo de incubación de 4 horas es el límite máximo para conseguir filamentación. Después de 2 horas de incubación, las células bacterianas vivas se convierten en filamentos. Sin embargo, a medida que el tiempo de incubación aumenta los filamentos dan respuesta fluorescente roja, lo que sugiere que incluso NaCl de 4 % a 5 % es estrés suficiente para las células bacterianas y que comienzan a morir después de unas pocas generaciones de crecimiento. Puesto que este estrés parece inhibir la tabicación completa durante la división celular bacteriana, es suficiente para permitir la formación de filamentos bacterianos. Estos datos también explican por qué la filamentación no se consigue a mayor concentración salina: el estrés es tóxico, inhibiendo el crecimiento bacteriano y la división celular y provocando la muerte celular.

Ejemplo 3. Uso de medios de gradiente de densidad biológicamente compatibles para separar minicélulas intactas de bacterias parentales y otros contaminantes.

Después de la centrifugación diferencial del cultivo de células bacterianas/minicélulas, un número significativo de contaminantes de células bacterianas se eliminaron por centrifugación de gradiente de densidad usando un medio biológicamente compatible. OptiPrep™ (Axis-Shield PLC, Dundee, Escocia), que es una solución estéril al 60 % (p/v) de iodixanol (5,5'-[(2-hidroxi-1-3 propanodiol)-bis (acetilamino)] bis [N,N'-bis(2,3dihidroxiopropil-2,4,6-triyodo-1,3-benzenocarboxamida)] en agua, constituye un medio biológicamente compatible. Se prepararon gradientes de 6 % a 12 % en tubos de centrifuga transparentes de polipropileno de 25 ml (Livingstone International Pty Ltd, Sydney, Australia) y se superpone 1 ml de la suspensión de células bacterianas/minicélulas en cada gradiente. Los tubos se centrifugaron a 2.000g / 20 minutos. Se recogieron veintitrés muestras de 1 ml del tubo y se analizaron por microscopía óptica usando un objetivo de inmersión en aceite con aumento 100X. Los resultados mostraron 3 segmentos principales como se muestra en la Figura 5A. El segmento superior contenía principalmente minicélulas con células bacterianas y ampollas bacterianas contaminantes. Un segundo segmento inferior portaba principalmente células bacterianas pero parecían aproximadamente de 2 a 3 veces más largas que una minicélula. El sedimento portaba principalmente células bacterianas.

La suspensión de minicélulas en bruto (banda superior; **Figura 5A**) se recogió y centrifugó a 13.200 rpm / 30 minutos en tubos Eppendorf. El sedimento se resuspendió en 2 ml de BSG estéril y se volvió a procesar en gradientes de OptiPrep™ como anteriormente. Los resultados mostraron (Figura 5B) que hubo un sedimento bacteriano relativamente más pequeño, la banda media era mucho más clara y la banda de minicélulas aparecía definida. Todas las zonas (volúmenes de 2 ml) en el tubo se analizaron por microscopía óptica como anteriormente y los resultados fueron similares excepto que la banda de minicélulas parecía portar muy pocos contaminantes bacterianos. La banda de minicélulas se recogió como antes y se volvió a procesar a través de un tercer gradiente de OptiPrep™ como anteriormente. Esto dio como resultado una banda clara (Figura 5C) y cuando se analizó por microscopía, reveló la presencia de principalmente minicélulas con muy pocos contaminantes bacterianos. Los experimentos se repitieron 10 veces con resultados similares.

Ejemplo 4. Reducción significativa de endotoxina libre de preparaciones de minicélulas intactas purificadas.

Las endotoxinas de bacterias Gram negativas son moléculas de lipopolisacáridos (LPS) con tres dominios diferenciados denominados lípido A, oligosacárido central y O-polisacárido. El lípido A y el oligosacárido central comprenden el núcleo de la endotoxina y están relativamente conservados entre diferentes especies bacterianas Gram negativas. El lípido A es el resto tóxico de endotoxina y está ligado covalentemente al oligosacárido central en todos los LPS (Reitschel y col., 1991).

La endotoxina libre residual se retiró de las preparaciones de minicélulas purificadas como sigue. Se conjugaron perlas magnéticas revestidas con proteína G (Dynal Biotech, Oslo, Noruega) con anticuerpo policlonal anti-lípido A de cabra (Biodesign, Saco, Maine, Estados Unidos). Este anticuerpo reacciona de forma cruzada con una serie de diferentes especies de LPS bacterianos Gram negativos incluyendo LPS de *S. typhimurium*. La reacción de conjugación se llevó a cabo incubando (O/N con mezcla suave a 4 °C) Dynabeads-proteína G que se lavaron 3 veces en 0,5 ml de tampón Na-Fosfato 0,1 M (pH 5,0) con el anticuerpo anti-lípido A. El exceso de anticuerpo se eliminó lavando el conjugado de Dynabeads-proteína G / anti-lípido A tres veces con 0,5 ml de tampón Na-Fosfato 0,1 M (pH 5,0). El conjugado se resuspendió en 300 µl del mismo tampón y se usaron 50 µl para tratar 500 µl de la suspensión de minicélulas purificada para retirar la endotoxina libre. La incubación conjunta se llevó a cabo durante 1 hora a 4 °C seguido de colocar el tubo en un imán (Dynal) y recoger el sobrenadante de minicélulas. El tratamiento

se llevó a cabo 3 veces con conjugado de Dynabeads-proteína G / anti-lípido A nuevo para asegurar la máxima retirada de endotoxina libre residual.

Ejemplo 5. Enumeración de conteos de minicélulas intactas, células bacterianas y endotoxinas a lo largo del procedimiento de purificación de minicélulas.

5 Este experimento se diseñó para determinar la cinética del procedimiento de purificación de minicélulas con respecto a producción de minicélulas, reducción de los conteos de bacterias parentales y reducción de endotoxina libre. El procedimiento de purificación completo se llevó a cabo tres veces y se recogieron las muestras en cada una de 12 etapas descritas posteriormente. Cada muestra se analizó con respecto a conteos celulares bacterianos y de minicélulas por citometría de flujo y conteo de viabilidad en placas de agar. También se determinaron las unidades de endotoxina (UE) para cada muestra por el ensayo de LAL (Charles River Laboratories, Inc. Wilmington, MA, Estados Unidos), llevada a cabo por Australian Microbiology Services Pty Ltd (Sydney, Australia). El procedimiento de purificación completo se describe brevemente posteriormente.

15 Se cultivó durante una noche (O/N) *S. typhimurium* de cepa *minCDE* recombinante que portaba un alto número de copias de plásmidos (marcador de ácido nucleico) a 37 °C, agitando en 25 ml de caldo de cultivo de soja Trypticase (TSB). Se inoculó después a seis matraces que contenían cada uno 1 l de TSB con 2 ml del cultivo O/N y se incubaron adicionalmente a 37 °C con agitación (**Muestra 1**). El cultivo se centrifugó diferencialmente a 2000g / 20 minutos en una centrífuga de sobremesa para sedimentar un número significativo de células bacterianas. El sobrenadante (**Muestra 2**) se recogió y concentró pasándolo a través de un filtro de flujo cruzado de 0,1 µm. La suspensión se concentró adicionalmente por centrifugación a 13.200 rpm / 60 minutos en una centrífuga de Eppendorf y el sedimento de células bacterianas/minicélulas se resuspendió en 16 ml de BSG estéril (**Muestra 3**). Se prepararon 16 gradientes de densidad (6 % a 12 %) en tubos de centrífuga transparentes de polipropileno de 25 ml (Livingstone International Pty Ltd, Sydney, Australia) usando un medio biológicamente compatible OptiPrep™ (Axis-Shield PLC, Dundee, Escocia) y se superpuso 1 ml de suspensión celular bacteriana/minicelular en cada gradiente. Los tubos se centrifugaron a 2000g / 20 minutos y la banda de minicélulas (Figura 5A) se recogió de la parte superior de cada tubo con una jeringa. Aproximadamente 24 ml de la suspensión de minicélulas en bruto (**Muestra 4**) se recogieron y centrifugaron a 13.200 rpm / 30 minutos en tubos Eppendorf. El sedimento se resuspendió en 12 ml de BSG estéril y se volvió a procesar en 12 gradientes de OptiPrep™ como anteriormente. Las bandas de minicélulas (Figura 5B) se recogieron como antes (**Muestra 5**) y se volvieron a procesar a través de 4 gradientes de OptiPrep™ como anteriormente. Esto dio como resultado una banda de minicélulas difusa clara (Figura 5C) en cada tubo y se recogió (**Muestra 6**). La suspensión de minicélulas se añadió a 1 l de TSB y se incubó durante 2 horas / 37 °C en reposo para reactivar las células bacterianas contaminantes (**Muestra 7**). Se añadió NaCl (concentración final de 5 % p/v) a la suspensión para estresar a las células bacterianas vivas e inhibir el proceso de formación de tabique durante la división celular. La suspensión se incubó durante 2 horas a 37 °C en reposo para asegurar que la mayoría de las células bacterianas contaminantes se convirtieran en filamentos bacterianos (**Muestra 8**). Se añadieron antibióticos de amplio espectro, gentamicina (200 µg/ml) y kanamicina (200 µg/ml) a la suspensión y se incubaron O/N a 37 °C para matar a todas las células bacterianas vivas (**Muestra 9**). La suspensión se pasó a través de un filtro de flujo cruzado de 0,2 µm para intercambio de tampón y la suspensión se reconstituyó en BSG estéril (**Muestra 10**). Este proceso eliminó todos los contaminantes menores de 0,2 µm por ejemplo sin endotoxina, fragmentos de minicélulas y bacterianos lisados, ácidos nucleicos y nutrientes de TSB. Se eliminaron después los filamentos bacterianos de la suspensión de minicélulas pasando la solución a través de un filtro cerrado de 0,45 µm. La suspensión se concentró a un volumen de 50 ml pasándola a través de un filtro de flujo cruzado de 100 kDa y se centrifugó después a 13.200 rpm / 20 minutos para sedimentar las minicélulas. El sobrenadante se descartó y el sedimento se resuspendió en 1 ml de BSG estéril (**Muestra 11**). La endotoxina libre residual se retiró usando Dynabeads-proteína G conjugada con anticuerpo anti-lípido A como se describe en el Ejemplo 4. Esto dio como resultado la **Muestra 12**.

La enumeración de células bacterianas y minicélulas se llevó a cabo por citometría de flujo como sigue. Cada muestra del procedimiento de purificación de minicélulas se diluyó de forma apropiada para portar aproximadamente 10^8 a 10^{10} minicélulas y se incubaron 250 µl de la muestra con colorante verde fluorescente Syto9 3,3 µM (Molecular Probes, Eugene, OR, Estados Unidos). Este colorante penetra intacto y daña a las membranas de células bacterianas y se une a ácidos nucleicos endógenos dando como resultado células bacterianas verdes fluorescentes. En los estudios preliminares de los inventores estos han mostrado que también penetra en la membrana de las minicélulas y da como resultado minicélulas recombinantes verdes fluorescentes. Todas las muestras se contaron en el citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA, Estados Unidos) usando el software de análisis y adquisición Cellquest (Becton Dickinson). Los conteos se realizaron durante 30 segundos en caudal medio con un umbral de 37 V en un accionador de fluorescencia verde "FL1" que detecta entre 515 y 545 nm. La tensión de FL1 PMT se ajustó a 550 V. La tensión de "SSC" PMT de dispersión lateral se ajustó a 524 V. La dilución de muestra apropiada produjo entre 5000 y 50000 partículas cada 30 segundos y el conteo de partículas final fue una media de 5 repeticiones. Las minicélulas y las bacterias se distinguieron basándose en sus diferencias en SSC y fluorescencia verde.

60 Los resultados mostraron (Figuras 6A-C) que al comienzo del procedimiento de purificación, el cultivo bacteriano / minicelular de 6 l portaba aproximadamente 5×10^{12} minicélulas (Figura 6A) y se produjeron pérdidas graduales a lo

largo del procedimiento de purificación hasta dar como resultado un rendimiento de aproximadamente 5×10^{10} minicélulas al final.

El conteo de células bacterianas parentales (Figura 6B) al comienzo del procedimiento fue similar a los números de minicélulas, es decir, aproximadamente 5×10^{12} bacterias. El procedimiento de purificación dio como resultado la eliminación de más de 1000 veces las células bacterianas en el punto de tratamiento con antibiótico. En este punto la relación de minicélulas:células bacterianas fue de más de 100:1 y por lo tanto las mediciones de citometría de flujo no podían detectar células bacterianas en las muestras analizadas. Después del tratamiento con antibiótico, todas las muestras analizadas por ensayo de conteo de placa viable revelaron la ausencia de células bacterianas vivas. El análisis por PCR cuantitativa con respecto a la presencia de ADN genómico en la muestra purificada final reveló la presencia de menos de 1 célula bacteriana parental (célula muerta) en 10^{11} minicélulas purificadas.

El conteo de endotoxinas libres en cada muestra (Figura 6C) mostró que al comienzo del procedimiento de purificación la muestra portaba aproximadamente 16^9 unidades de endotoxina (UE). Las UE se redujeron a aproximadamente 10^6 después de la tercera etapa de purificación de gradiente (Figura 6C; Muestra 6). Las UE aumentaron de nuevo una vez que se incubó la suspensión de células bacterianas residuales / minicélulas en TSB para filamentación inducida por sal (Figura 6C; Muestras 7-9) pero se redujo a 10^4 a 10^5 UE en etapas de purificación posteriores.

Se sabe que en soluciones acuosas, puede encontrarse LPS purificado como LPS libre y como micelas puesto que el resto de lípido A es hidrófobo, mientras que el segmento de carbohidrato (polisacárido central y O-polisacárido) es hidrófilo. Esto da como resultado micelas en las que el lípido A hidrófobo está internado mientras que el polisacárido hidrófilo interactúa con el ambiente acuoso. Se sabe que estas micelas están presentes en una serie de tamaños moleculares diferentes y puede ser de hasta varios millones de Dalton. El LPS unido a una célula bacteriana o una minicélula tiene la parte de lípido A internada dentro de la membrana bicapa y no es una endotoxina. El LPS libre es una endotoxina puesto que el resto de lípido A está disponible para interactuar con membranas celulares de mamífero dando como resultado un efecto endotóxico grave. No se sabe si las micelas de LPS son endotoxinas *in vivo*.

Las minicélulas de la presente invención son útiles para aplicaciones terapéuticas *in vivo* y por lo tanto el procedimiento de purificación se centra en la retirada de LPS libre, es decir, endotoxina. El ensayo de LAL, sin embargo, mide las tres formas de LPS: forma libre (endotoxina), forma micelar (los estudios posteriores sugirieron que esta no es una endotoxina) y unida a superficie de minicélula (no endotoxina). Por el contrario el anticuerpo anti-lípido A solo parece unirse a y eliminar el LPS libre puesto que los sitios de unión a antígeno del anticuerpo no pueden acceder al lípido A en micelas o en minicélulas intactas puesto que los sitios de unión a antígeno están internados.

Ejemplo 6. Determinación de niveles de endotoxina libre en preparaciones de minicélulas purificadas.

Para demostrar lo anterior, se realizó una serie de experimentos adicionales para determinar qué forma de LPS se mide realmente por el ensayo de LAL. La preparación de minicélulas purificada se trató secuencialmente 5 veces para retirar LPS libre usando conjugado de Dynabeads-proteína G / anti-lípido A preparado de nuevo y a partir de cada purificación se analizaron las siguientes muestras por el ensayo de LAL; (a) suspensión de minicélulas purificada que se espera que porte las 3 formas de LPS, es decir, forma libre, micelar y unida a membrana de superficie de minicélula, (b) el conjugado de Dynabeads-proteína G / anti-lípido A recuperado que presumiblemente porta la forma libre unida de LPS, (c) el sobrenadante después de la centrifugación de suspensión de minicélulas a 13.200 rpm / 20 minutos después de tratamiento con Dynabeads-proteína G / anti-lípido A. Esta presumiblemente porta la forma micelar de LPS puesto que la forma libre debería retirarse por anti-lípido A y el LPS unido a minicélulas debería encontrarse en el sedimento de minicélulas, (d) el sedimento de (c) que se resuspendió en BSG libre de pirógenos estéril. También se incluyeron una serie de controles, por ejemplo, LPS de *S. typhimurium* purificado (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, Estados Unidos) tratado con conjugado de Dynabeads-proteína G / anti-lípido A para confirmar que el anticuerpo anti-lípido A se unía a y eliminaba la forma libre de LPS, muestras de diluyente para asegurar que los diluyentes no contribuían a las UE observadas, etc.

Los resultados mostraron (Tabla 1, posteriormente) que, como se esperaba, la mayoría de las UE que se midieron por el ensayo de LAL se asociaban con el LPS unido a membrana de superficie de minicélulas (columna D) que no es una endotoxina como se ha visto en los estudios *in vivo* en el Ejemplo 7. Este resultado es similar al visto en la Figura 6C (Muestra 12). El sobrenadante (Columna C) también portaba una cantidad significativa de UE y presumiblemente esa es la forma micelar de LPS puesto que cada muestra se había procesado previamente con el conjugado de Dynabeads-proteína G / anti-lípido A. El resultado interesante se vio en la Columna B que mostró que cada vez que se lleva a cabo el tratamiento anti-lípido A, las únicas cantidades de forma libre de LPS que podían encontrarse en la preparación de minicélulas purificadas estaba entre 20 UE y 45 UE. Este valor es mucho menor que los patrones de endotoxina actuales para liberación en lote de agentes farmacéuticos parenterales que es de 350 UE / dosis (Grandics, 2000).

Tabla 1

	A	B	C	D
Muestra	Suspensión de Minicélulas	Dynabeads-proteína G / anti-lípido A recuperado	Sobrenadante después de que las minicélulas se sedimenten por centrifugación	Sedimento de minicélulas resuspendido
	UE/ml de la solución original			
Después del 1 ^{er} procedimiento de retirada de endotoxina libre	15.560	43,8	3,490	9,910
Después del 2 ^o procedimiento de retirada de endotoxina libre	18.910	35,1	2,250	16,940
Después del 3 ^{er} procedimiento de retirada de endotoxina libre	26.920	19,0	2,143	10,090
Después del 4 ^o procedimiento de retirada de endotoxina libre	20.230	25,2	1,870	11,620
Después del 5 ^o procedimiento de retirada de endotoxina libre	15.400	27,8	1,361	15,080

Ejemplo 7. Confirmación *in vivo* de que las minicélulas purificadas portan niveles insignificantes de endotoxina.

- 5 Las preparaciones de minicélulas purificadas se trataron secuencialmente (3 veces) para retirar endotoxinas usando el procedimiento de conjugado de Dynabeads-proteína G / anti-lípido A descrito anteriormente. Cada una de las preparaciones que portaban 16⁹ minicélulas purificadas, es decir, retirada preendotoxina, y después de la primera, segunda y tercera etapas de retirada de endotoxina, se inyectó en la vena de la cola de ratones desnudos atímicos
- 10 hembra de 6 semanas de edad (5 ratones por grupo). Los ratones usados en este ejemplo se obtuvieron de Animal Resources Centre, Perth, WA, Australia, y todos los experimentos animales se realizaron en conformidad con la guía de cuidado y uso de animales de laboratorio y con la aprobación del Comité de Ética Animal. Los experimentos se realizaron en la instalación de animales pequeños acreditada por Agricultura de NSW en EnGeneIC Pty Ltd (Sydney, NSW, Australia). Los ratones se observaron cuidadosamente durante un periodo de 4 semanas para registrar cualquier señal de choque endotóxico, por ejemplo, fiebre, letargo, pérdida de apetito y peso y muerte posterior.
- 15 Los resultados mostraron que sin el procedimiento de retirada de endotoxina la mayoría de los ratones desarrollaron rápidamente fiebre y permanecieron aletargados dentro de las primeras 12 horas. La mayoría de los animales murieron en un periodo de dos semanas. Los ratones que recibieron minicélulas después del primer procedimiento de retirada de endotoxinas fueron más estables y mostraron una fiebre suave durante las primeras 24 horas. Sin embargo, los ratones se recuperaron después de 3 días. Los ratones que recibieron minicélulas purificadas que se
- 20 habían sometido a dos y tres ciclos de retirada de endotoxinas no mostraron efectos secundarios adversos y permanecieron sanos. Esto sugirió que la nueva etapa de retirada de endotoxina libre era esencial si las minicélulas van a usarse para fines farmacéuticos dentro de un huésped mamífero.

PUBLICACIONES CITADAS

- 25 Brahmhatt, "Cloning and molecular characterization of the rfb gene cluster of Salmonella ryphimurium," Ph.D. Thesis, University of Adelaide, Australia (1987).
- Britton y col., "Characterization of a prokaryotic SMC protein involved in chromosome partitioning," Genes Dev. 12: 1254 (1998).

- Clark-Curtiss & Curtiss, "Analysis of recombinant DNA using *Escherichia coli* minicells," *Methods Enzymol.* 101: 347 (1983).
- de Boer y col., "Roles of MinC and MinD in the site-specific septation block mediated by the MinCDE system of *Escherichia coli*," *J. Bacteriol.* 174: 63 (1992).
- 5 Dorward y col., "Export and intercellular transfer of DNA via membrane blebs of *Neisseria gonorrhoeae*," *J. Bacteriol* 171: 2499 (1989).
- Forbes, "Crossflow microfiltration," *Australian J. Biotechnology* 1: 30 (1987).
- Grandics, P. Pyrogens in parenteral pharmaceuticals. *Pharmaceutical Technology.* (2000).
- 10 Frazer & Curtiss, "Production, properties and utility of bacterial minicells," *Curr Top Microbiol. Immunol.* 69: 1 (1975).
- Harlow y col., "Cloning and characterization of the *gsk* gene encoding guanosine kinase of *Escherichia coli*," *J. Bacteriol.* 177: 2236 (1995).
- Harry, "Bacterial cell division: Regulating Z-ring formation," *Mol. Microbiol.* 40: 795 (2001).
- 15 Hiraga y col., "Chromosome partitioning in *Escherichia coli*: novel mutants producing anucleate cells," *J. Bacteriol.* 171: 1496 (1989).
- Hu & Lutkenhaus, "Topological regulation of cell division in *Escherichia coli* involves rapid pole to pole oscillation of the division inhibitor MinC under the control of MinD and MinE," *Mol. Microbiol.* 34: 82 (1999).
- Ireton y col., "*spo0J* is required for normal chromosome segregation as well as the initiation of sporulation in *Bacillus subtilis*," *J. Bacteriol.* 176: 5320 (1994).
- 20 Katsui y col., "Heat-induced blebbing and vesiculation of the outer membrane of *Escherichia coli*," *J. Bacteriol.* 151: 1523 (1982).
- Kihara y col., "Analysis of a FlIM-FlIN flagellar switch fusion mutant of *Salmonella typhimurium*," *J. Bacteriol.* 178: 4582 (1996).
- 25 Levin y col., "Identification of *Bacillus subtilis* genes for septum placement and shape determination," *J. Bacteriol.* 174: 6717 (1992).
- Matsuzaki y col., "Interactions of an antimicrobial peptide, magainin 2, with outer and inner membranes of Gram-negative bacteria," *Biochim Biophys. Acta.* 1327: 119 (1997).
- Okada y col., "Possible function of the cytoplasmic axial filaments in chromosomal segregation and cellular division of *Escherichia coli*," *Sci. Prog.* 77: 253 (1993-94).
- 30 Okada y col., "Cytoplasmic axial filaments in *Escherichia coli* cells: possible function in the mechanism of chromosome segregation and cell division," *J. Bacteriol.* 176: 917 (1994).
- PCT/IB02/04632. Intact minicells as vectors for DNA transfer and gene therapy in vitro and in vivo.
- Raskin & de Boer, "MinDE-dependent pole-to-pole oscillation of division inhibitor MinC in *Escherichia coli*," *J. Bacteriol.* 181: 6419 (1999).
- 35 Reitschel ET, Seydel U, Zähringer FU y col. Bacterial endotoxin: molecular relationships between structure and activity. *Infect Dis Clin N Am.* 5: 753 (1991).
- Reeve, "Use of minicells for bacteriophage-directed polypeptide synthesis," *Methods Enzymol.* 68: 493 (1979).
- Reeve & Cornett, "Bacteriophage SPO1-induced macromolecular synthesis in minicells of *Bacillus subtilis*," *J. Virol.* 15: 1308 (1975).
- 40 Sancar y col., "Simple method for identification of plasmid-coded proteins," *J. Bacteriol.* 137: 692 (1979) Stewart & D'Ari, "Genetic and morphological characterization of an *Escherichia coli* chromosome segregation mutant," *J. Bacteriol.* 174: 4513 (1992).
- Wachi y col., "New *mre* genes *mreC* and *mreD*, responsible for formation of the rod shape of *Escherichia coli* cells," *J. Bacteriol.* 171: 6511 (1989)

REIVINDICACIONES

1. Una preparación de minicélulas derivada de bacterias purificada que contiene menos de aproximadamente 1 célula bacteriana parental contaminante por 10^{10} minicélulas.
2. La preparación de la reivindicación 1, en la que dicha preparación contiene menos de aproximadamente 1 célula bacteriana parental contaminante por 10^{11} minicélulas.
3. La preparación de la reivindicación 1 ó 2, estando dicha preparación sustancialmente libre de endotoxinas.
4. La preparación de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, estando dicha preparación sustancialmente libre de residuos celulares.

FIGURA 1

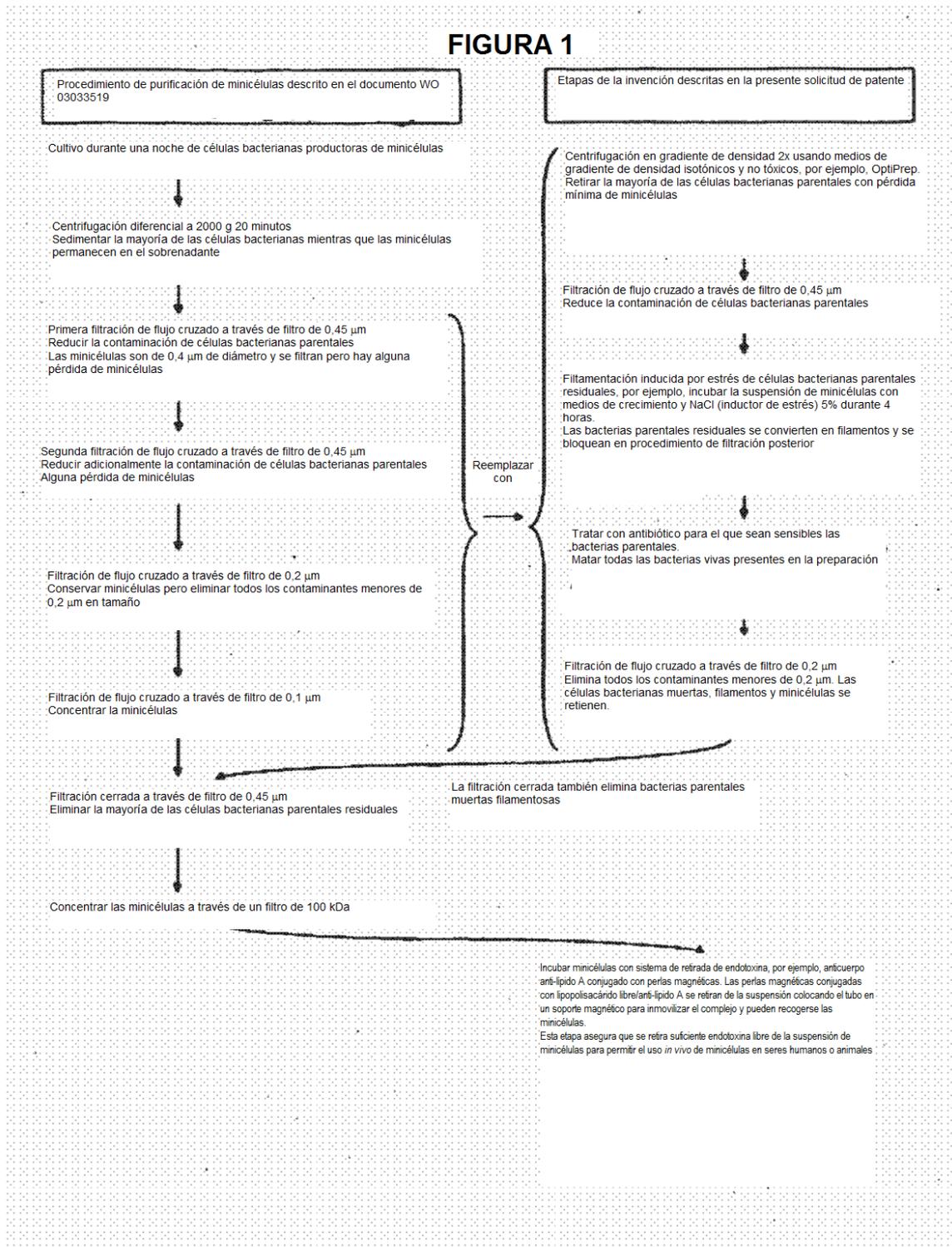


Figura 2

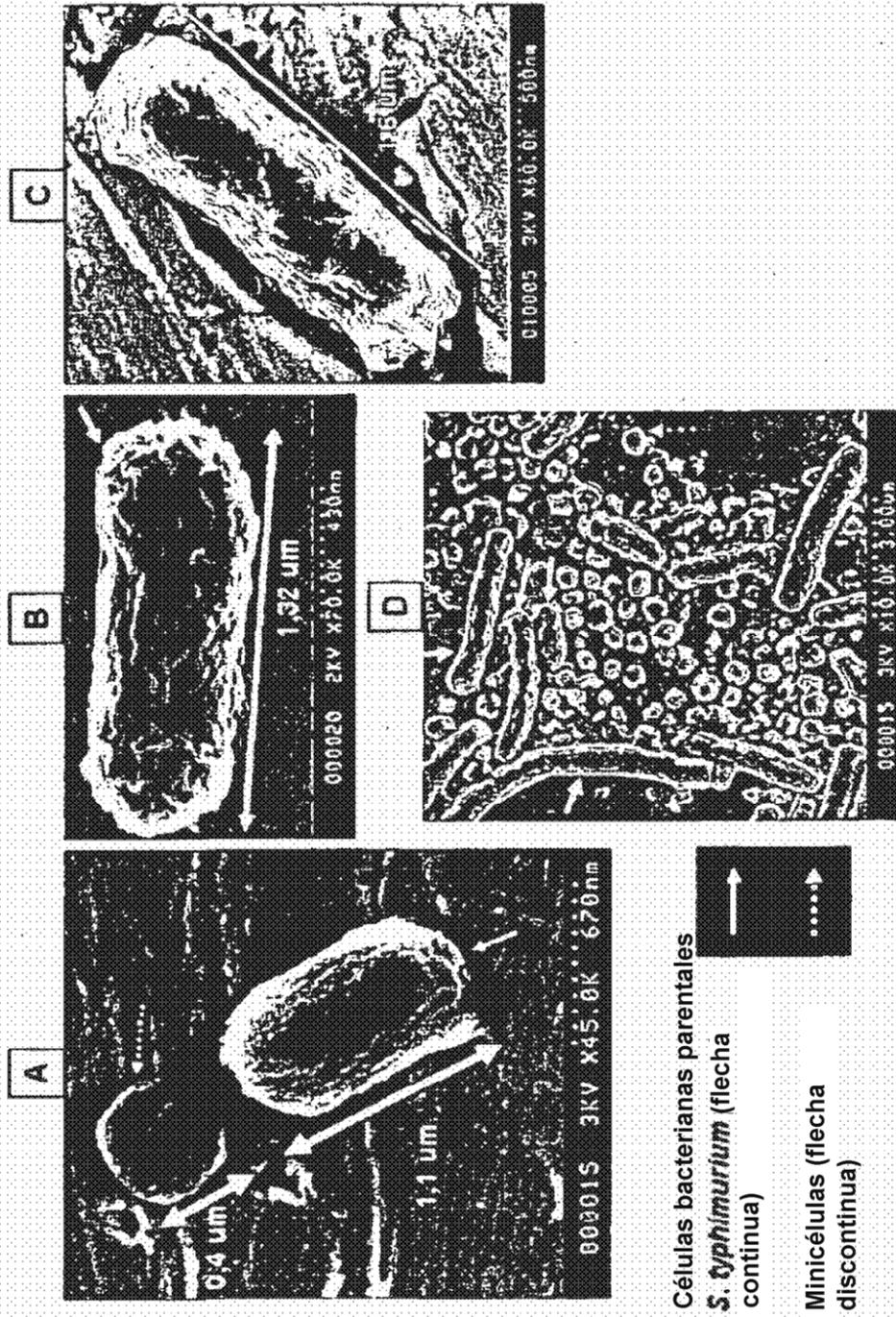


Figura 3A

Filamentación de *S. typhimurium* [ENS_{m001}] después de la adición de NaCl (aumento 1250x)
concentración de NaCl (p/v)

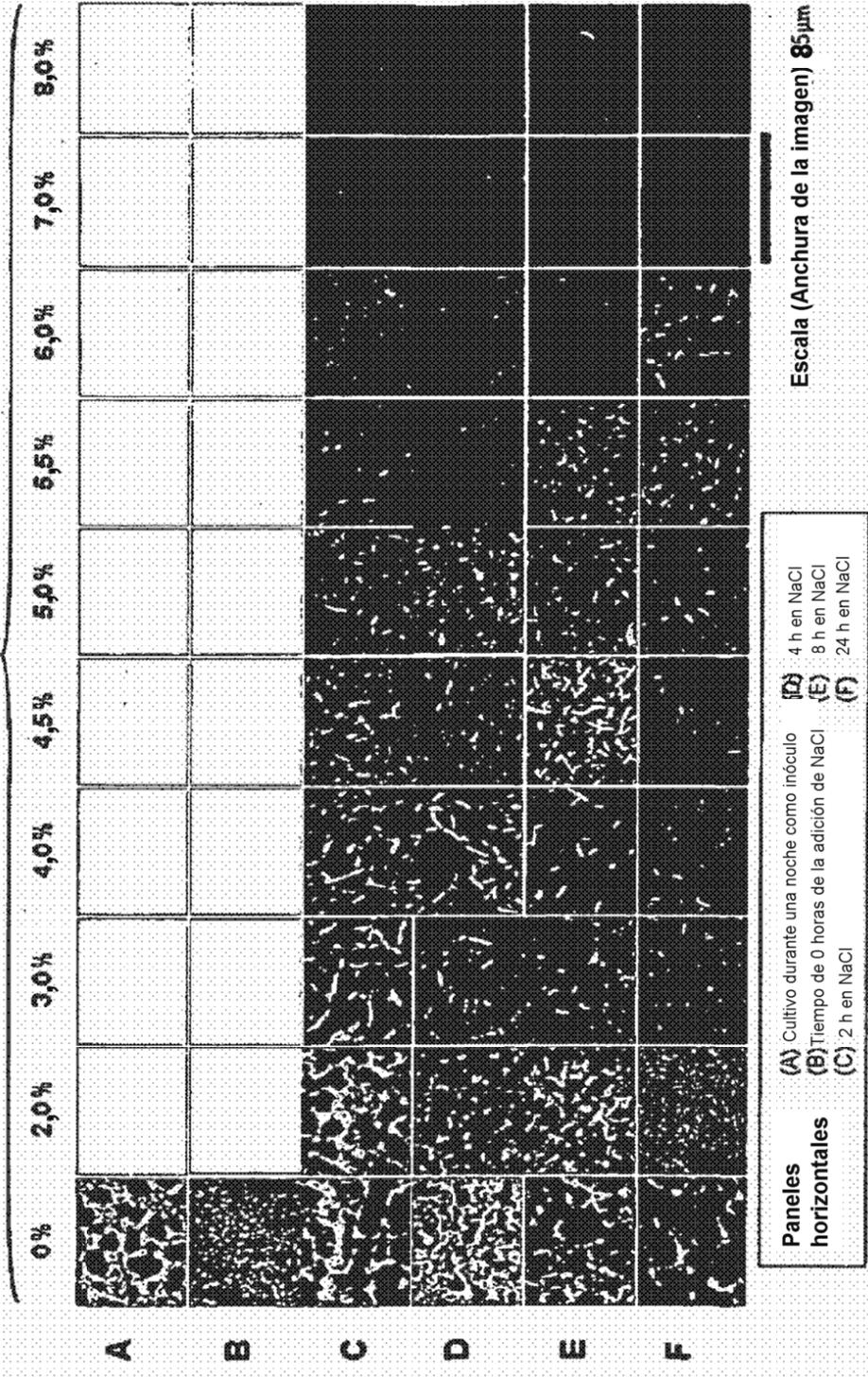
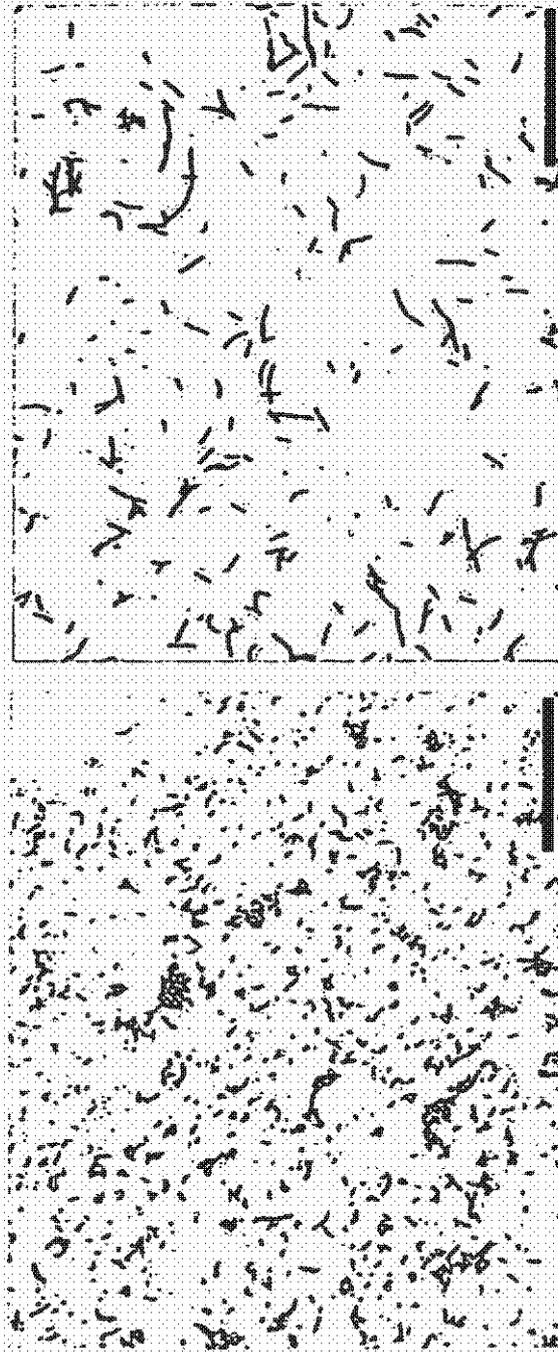


Figura 3 B

Filamentación inducida por sal en *Salmonella typhimurium* ENSm026

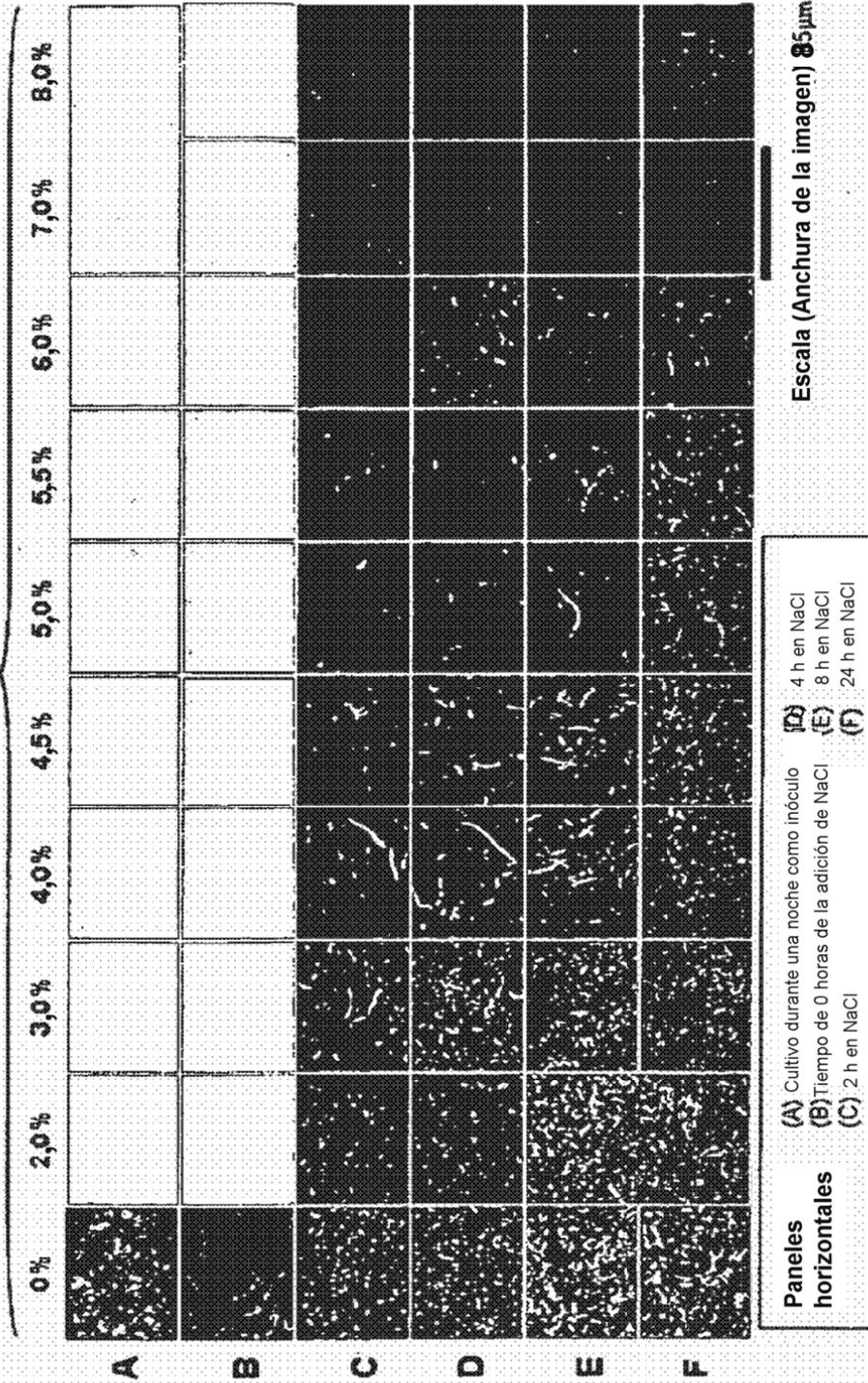


4 horas después de inóculo de cultivo Log (NaCl 0%) 4 horas después de inóculo de cultivo Log (NaCl 5,0%)

Escala 50µm

Figura 4 A

Filamentación de *E. coli* después de adición de NaCl (aumento 1250x)
concentración de NaCl (p/v)



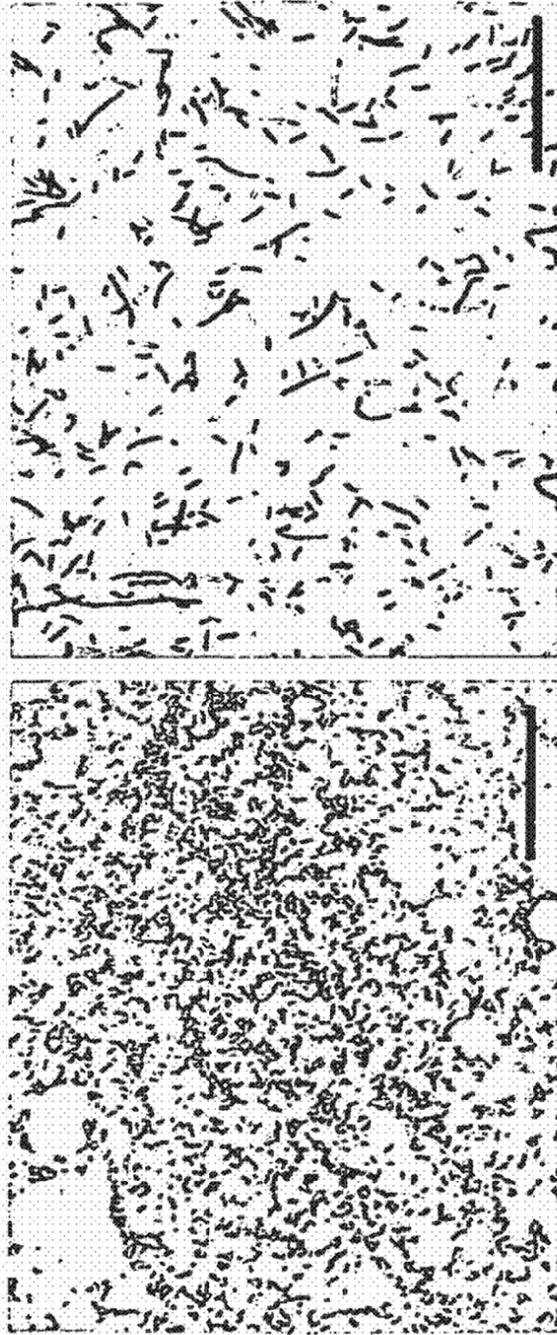
Paneles horizontales

- (A) Cultivo durante una noche como inóculo
- (B) Tiempo de 0 horas de la adición de NaCl
- (C) 2 h en NaCl
- (D) 4 h en NaCl
- (E) 8 h en NaCl
- (F) 24 h en NaCl

Escala (Anchura de la imagen) 85 μm

Figura 4 B

Filamentación inducida por sal en *E. coli*



4 horas después de inóculo de cultivo Log (NaCl 0%) 4 horas después de inóculo de cultivo Log (NaCl 5,0%)

Escala 50µm

Figura 5

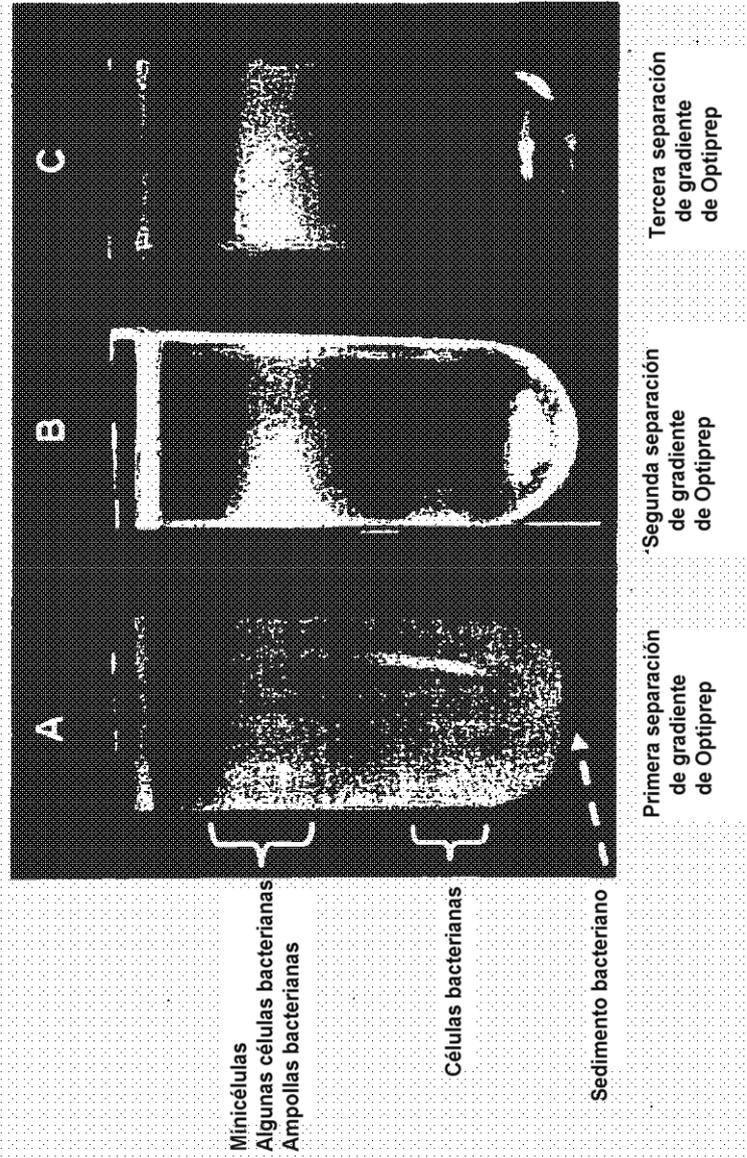
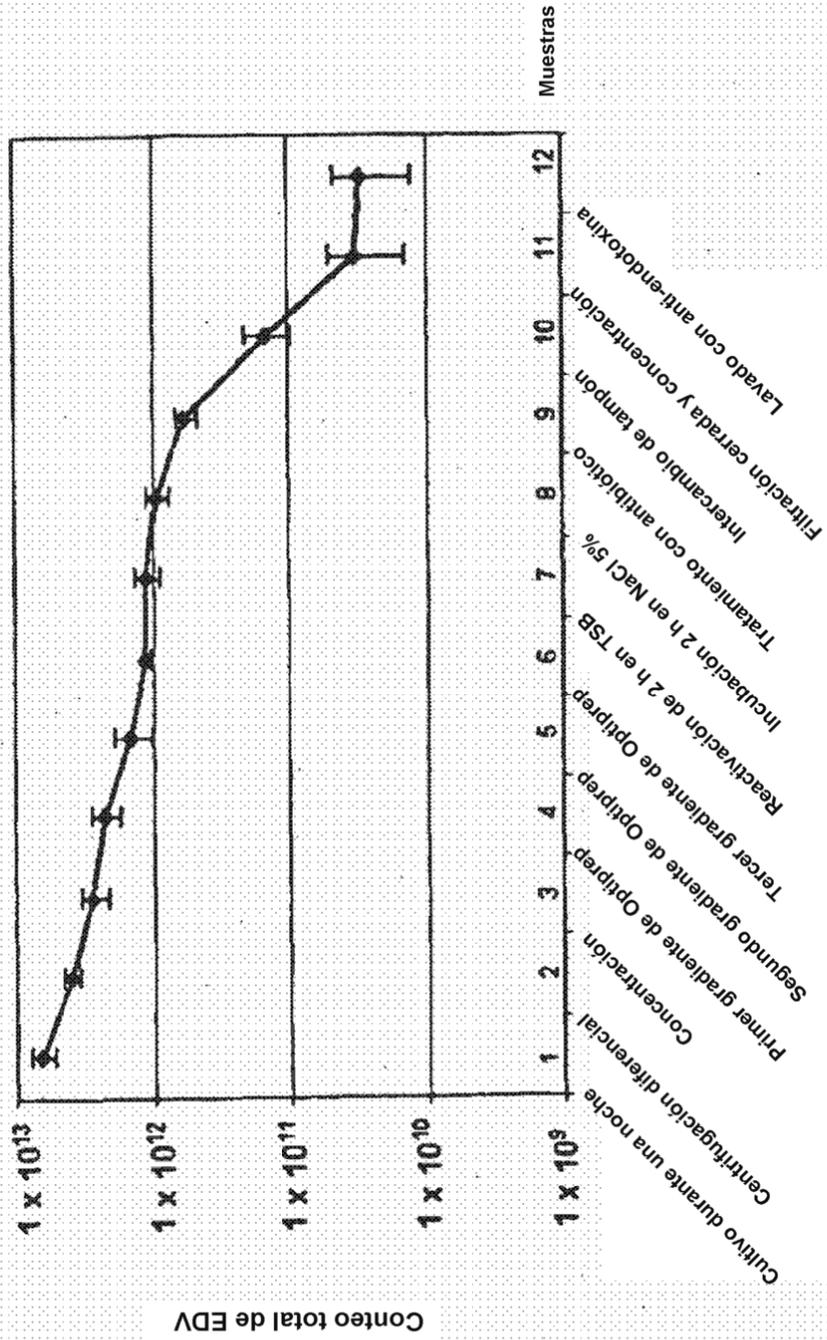
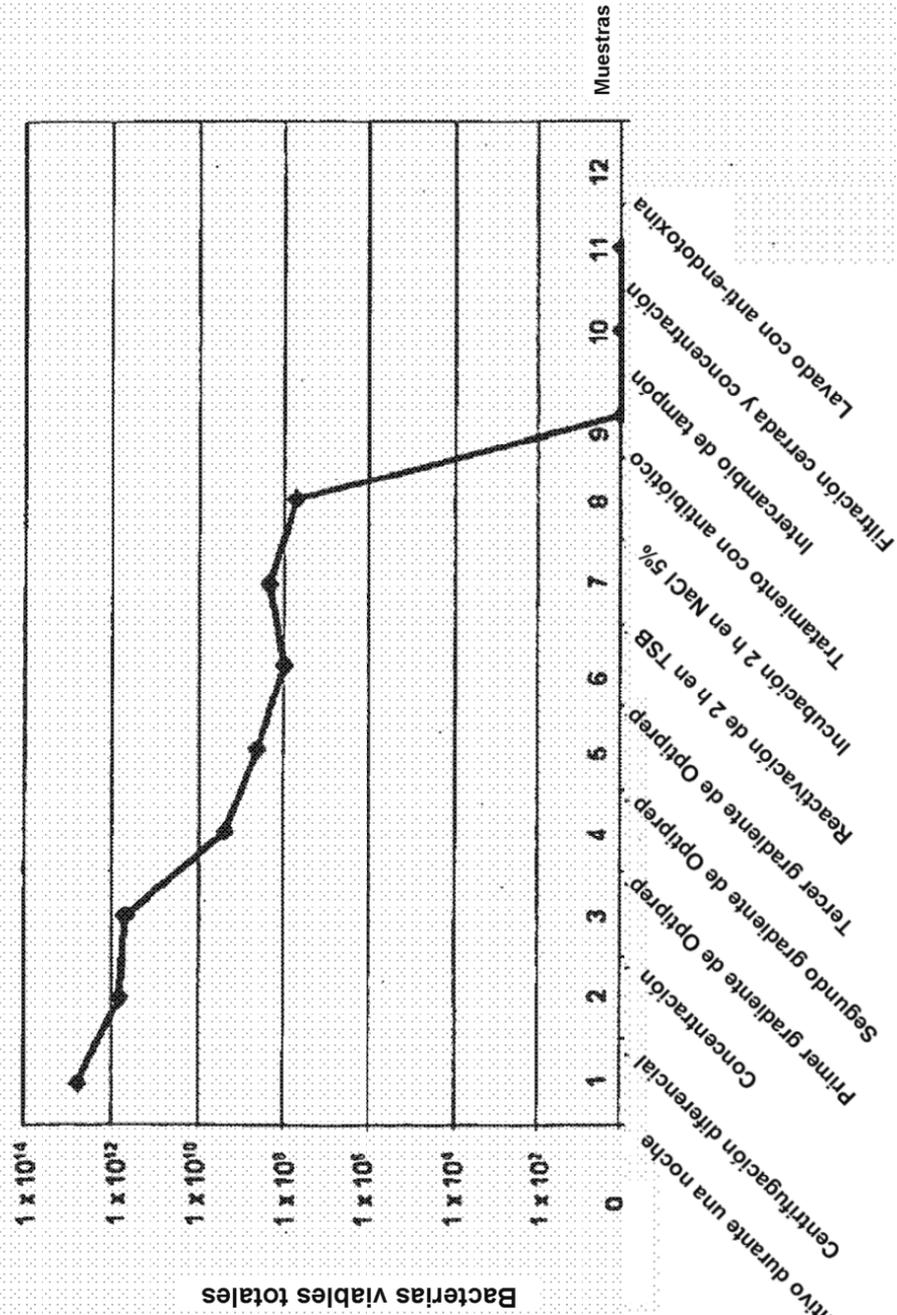


Figura 6A Conteo total de minicélulas intactas en cada etapa del procedimiento de purificación de minicélulas



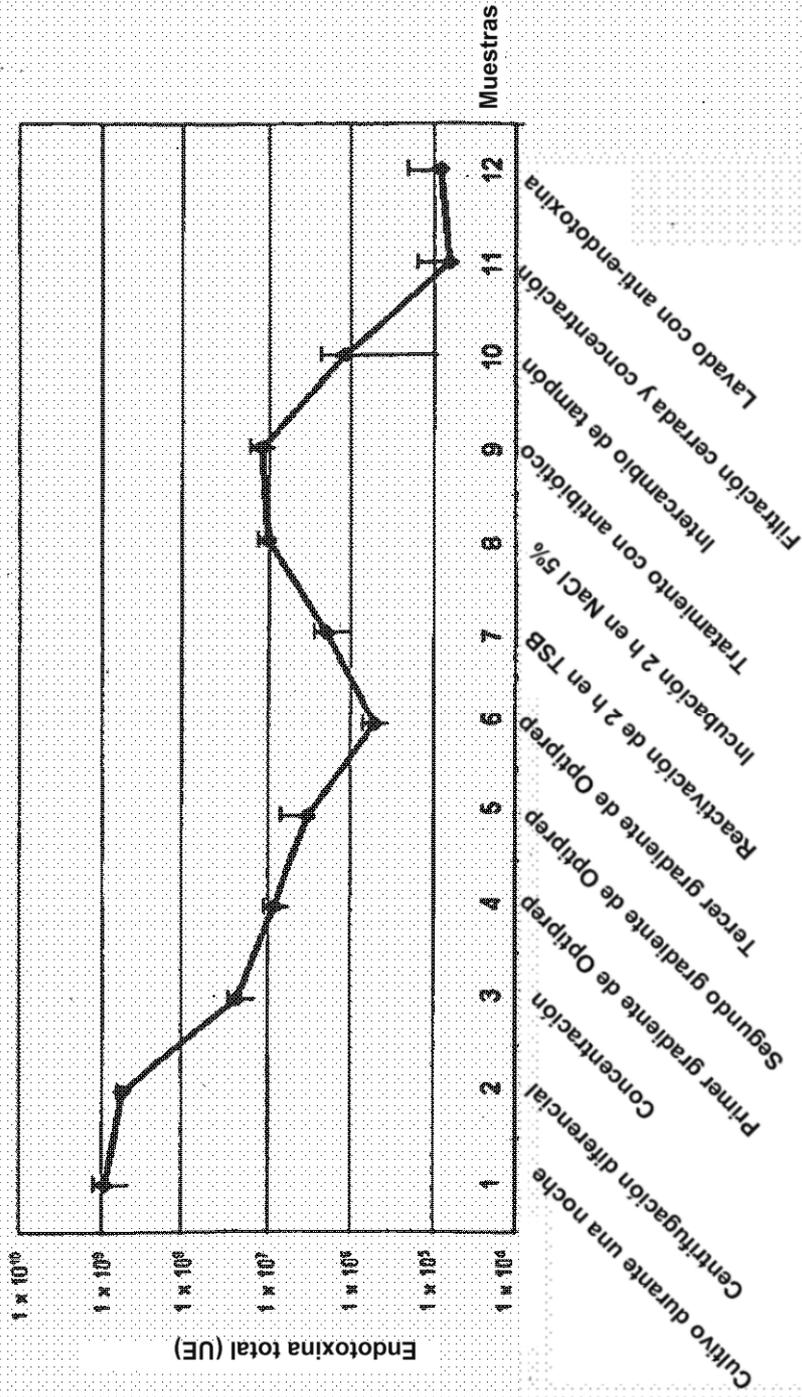
Etapa de Preparación

Figura 6B Conteo total de bacterias viables en cada etapa del procedimiento de purificación de minicélulas



Etapa de Preparación

Figura 6C Endotoxina total (UE) en cada etapa del procedimiento de purificación de minicélulas



Etapa de Preparación