

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 452 471**

51 Int. Cl.:

C12N 1/06 (2006.01)

A61K 39/108 (2006.01)

A61K 39/112 (2006.01)

A61K 35/74 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.01.2009 E 09702047 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.12.2013 EP 2240570**

54 Título: **Procedimiento de producción de fantasmas bacterianos (BG) utilizando beta-propiolactona (BPL) para la inactivación final**

30 Prioridad:

18.01.2008 US 21977 P

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

01.04.2014

73 Titular/es:

**LUBITZ, WERNER (100.0%)
HAUPTSTRASSE 88
3420 KLOSTERNEUBURG/KRITZENDOR, AT**

72 Inventor/es:

LUBITZ, WERNER

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 452 471 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

Procedimiento de producción de fantasmas bacterianos (BG) utilizando beta-propiolactona (BPL) para la inactivación final

5 La invención se refiere a la preparación de fantasmas bacterianos utilizando beta-propiolactona para la inactivación final de bacterias.

10 Envolturas de las células bacterianas vacías de bacterias gram-negativas, los denominados fantasmas bacterianos (BG – siglas en inglés), se preparan mediante expresión heteróloga controlada de un gen que efectúa una lisis parcial de las bacterias, particularmente bacterias gram-negativas (documentos EP-A-0 291 021, EP-A-0 516 655). Por ejemplo, el gen lítico puede ser el gen E del bacteriófago phiX174 que codifica un polipéptido que se inserta en el complejo de la envoltura de la célula de bacterias gram-negativas y conduce a la formación de una estructura de túnel en la membrana a través de las membranas interna y externa. El diámetro interno de esta estructura de túnel está en el intervalo de aproximadamente 20-400 nm, particularmente 40-200 nm o 500-1.000 nm, dependiendo de las condiciones empleadas de la lisis. Los componentes citoplásmicos se liberan por medio de esta estructura de túnel, en donde se obtiene un complejo de envoltura de la célula vacía que tiene una morfología intacta, un así denominado fantasma bacteriano.

20 A pesar de que el proceso lítico que conduce a un BG sin contenido citoplásmico es bastante eficaz, una determinada cantidad, habitualmente aproximadamente una célula en 10^4 células, permanece intacta. La co-expresión regulada de un gen de la lisis bacteriana, p. ej. el gen E del bacteriófago phiX174, y un gen nucleasa con el fin de generar fantasmas bacterianos exentos de ácidos nucleicos da como resultado un incremento sinérgico de la eficacia del proceso de exterminio y, de manera correspondiente, una reducción sustancial de células bacterianas vivas en una preparación de BG según se describe en el documento WO 03/006630.

El documento US 2.9898.435 (A) se refiere a un método de esterilizar químicamente líquidos acuosos que contienen bacterias o esporas de bacterias, caracterizado por que a dichos líquidos se añade beta-propiolactona.

30 El documento EP 0 460 480 A2 se refiere a un método para tratar ganado bovino y ovino para prevenir la pododermatitis séptica y la necrosis hepática, que comprende administrar al animal que está siendo tratado una bacteria *Fusobacterium necrophorum*, que es un aislado de *Fusobacterium necrophorum* inactivado con una beta-propiolactona.

35 El uso de fantasmas bacterianos como vacunas muertas o adyuvantes y la preparación de fantasmas bacterianos recombinantes que portan proteínas heterólogas en sus estructuras de la envoltura de la célula se describe en los documentos WO 91/13555 y WO 93/01791. Los fantasmas bacterianos son, además, adecuados como soportes o vehículos fijadores de objetivo para compuestos activos, según se describe en el documento WO 00/53163.

40 Con el fin de hacer incluso más seguro el uso de fantasmas bacterianos como vacunas muertas, particularmente para aplicaciones en medicina humana, es necesario proporcionar preparaciones de BG desprovistas de células bacterianas vivas.

Por lo tanto, el problema técnico en el que se fundamenta la presente invención era proporcionar preparaciones de BG exentas de células bacterianas vivas.

45 Sorprendentemente, se encontró que virtualmente todas las bacterias potencialmente no exterminadas son inactivadas cuando se utilizó un agente de esterilización como una etapa final en el proceso de producción de BG, en donde dicho agente esterilizante es beta-propiolactona (BPL). Además, sorprendentemente, la integridad de la preparación de fantasma bacteriano se mantiene después del tratamiento con beta-propiolactona.

50 La fórmula química para beta-propiolactona es $C_3H_4O_2$, y su peso molecular es 72,06 g/mol. La beta-propiolactona es un líquido incoloro que es altamente soluble en agua, sus productos de degradación son compuestos inofensivos que surgen de la autodestrucción. Beta-propiolactona, en calidad de un agente esterilizante, se utiliza para vacunas, injertos de tejidos, instrumentos quirúrgicos y enzimas, de plasma sanguíneo, agua, leche y caldo nutritivo, y como un desinfectante en fase de vapor en espacios cerrados. Su acción esterilizante se utiliza frente a bacterias vegetativas, hongos patológicos y virus.

Así, un primer aspecto de la presente invención se refiere a una preparación de fantasmas bacterianos

virtualmente exenta de células bacterianas vivas, que comprende tratar dichos fantasmas bacterianos con beta-propiolactona. Preferiblemente, el número de cualesquiera células bacterianas vivas remanentes en el preparado fantasma se reduce en un factor de al menos 10^3 , más preferiblemente en 10^4 , incluso más preferiblemente en 10^5 y lo más preferiblemente en 10^6 o incluso más.

5 En el método arriba descrito, la beta-propiolactona se añade preferiblemente a una concentración final de 0,01-1% (v/v) y más preferiblemente de 0,025-0,5% (v/v). La beta-propiolactona se puede añadir a la preparación en una o más etapas, p. ej. en dos etapas consecutivas, en donde las dos porciones son preferiblemente de igual cantidad, en donde la segunda porción de beta-propiolactona se añade después de aproximadamente 15-45 min, p. ej. aproximadamente a los 30 min. La adición de beta-propiolactona se produce preferiblemente en forma de un líquido. Es posible la adición en forma de un vapor o aerosol, o en otras formas.

10 Un aspecto preferido de la presente invención es que fantasmas bacterianos se inactivan durante 10-60 min, más preferiblemente durante 15-45 min, incluso más preferiblemente durante 25-35 min.

15 Además de ello, de acuerdo con la presente invención, la adición de beta-propiolactona se lleva a cabo preferiblemente a 15-55°C, más preferiblemente a 26-50°C, más preferiblemente a 35-45°C, incluso más preferiblemente a 36-44°C, y lo más preferiblemente a 38-43°C.

20 La preparación de fantasma bacteriano de la presente invención se puede producir por un método, que comprende las siguientes etapas:

- (a) proporcionar células bacterianas que comprendan un gen que codifica una proteína lítica capaz de formar una estructura de túnel en la envoltura de la célula bacteriana
- (b) opcionalmente, cultivar las células bacterianas bajo condiciones en donde el gen lítico no se expresa
- 25 (c) someter la célula bacteriana a condiciones en donde el gen lítico se expresa y los componentes citoplásmicos de las células bacterianas se liberan y
- (d) obtener los fantasmas bacterianos resultantes.

30 Un ejemplo preferido de un gen que codifica la proteína lítica es el gen E del bacteriófago phiX174.

De manera particularmente preferida, las células bacterianas utilizadas para el método arriba descrito de la preparación de fantasma bacteriano codifican adicionalmente una enzima capaz de hidrolizar componentes citoplásmicos en la célula bacteriana, según se describe en el documento WO 03/006630. El método correspondiente de la preparación de fantasma bacteriano comprende las siguientes etapas adicionales:

- 35 (a) opcionalmente, cultivar las células bacterianas bajo condiciones en donde no se expresa el gen de la enzima
- (b) someter la célula bacteriana a condiciones en donde el gen de la enzima se expresa y componentes citoplásmicos de las células bacterianas se degradan.

40 El gen que codifica la enzima hidrolítica es preferiblemente un gen nucleasa, en particular un gen nucleasa de *Staphylococcus aureus* (documento WO 03/006630).

45 En una realización particularmente preferida, el gen lítico y el gen de la enzima están en enlace operativo con una secuencia del control de la expresión regulable. Más preferiblemente, el gen lítico y el gen de la enzima se encuentran cada uno en enlace operativo con una secuencia de control de la expresión regulable separada y se encuentran en uno o varios vectores. Así, la expresión de los dos genes se puede iniciar por separado, p. ej. en diferentes instantes del proceso de cultivo.

50 Preferiblemente, las células se cultivan bajo condiciones represoras tanto para el gen lítico como para el gen de la enzima. Después, se induce la expresión de la enzima, p. ej. cuando el gen de la enzima se encuentra bajo el control de un promotor químicamente regulable tal como el promotor lac o un derivado del mismo, añadiendo un inductor tal como IPTG.

Más preferiblemente, la enzima se expresa en una forma que es al menos parcialmente inactiva y que puede ser activada en una fase posterior mediante adición al cultivo de un grupo prostético.

55 Luego, subsiguientemente, p. ej. después de 20 min hasta 1,5 h, de manera particularmente preferida después de aproximadamente 45 min, se induce la expresión del gen lítico, p. ej. cuando el gen lítico se encuentra en enlace operativo con un promotor regulable en temperatura tal como el promotor lambda PR o PL, en combinación con

una secuencia de operador modificada y el represor cl857 sensible a la temperatura (documento WO 98/07874) mediante un desplazamiento de la temperatura hasta, p. ej., 42°C a 44°C. Luego, después de aproximadamente 30 min hasta 2 h, p. ej. aproximadamente a los 90 min, la enzima se activa añadiendo un grupo prostético requerido para su función, p. ej. iones de metales tales como Mg²⁺ y/o Ca²⁺. La expresión de la proteína E lítica también puede ser inducida mediante compuestos químicos, p. ej. arabinosa, cuando se clonan bajo un sistema de promotor/operador inducible químico.

En ese contexto, es particularmente favorable que la inactivación mediada por beta-propiolactona de bacterias lisadas no E sea eficaz tanto a la temperatura restrictiva como a la permisiva.

En una realización preferida adicional, beta-propiolactona se añade después de la inducción de la lisis y después de la activación de la enzima hidrolítica, si es aplicable, y antes o después de la purificación de la preparación de fantasma bacteriano, prefiriéndose la adición de beta-propiolactona antes de la purificación. La adición de beta-propiolactona después de la purificación requiere una etapa de purificación adicional, p. ej. antes del uso, modificación ulterior y/o liofilización de los fantasmas bacterianos.

Para la producción a gran escala de preparaciones de fantasmas se prefiere concentrar los fantasmas después de la recolección, p. ej. a partir de un fermentador, mediante centrifugación, filtración tangencial, liofilización, secado por pulverización u otros métodos. Después de la concentración, se puede añadir beta-propiolactona en cantidades y/o bajo condiciones como las especificadas anteriormente.

La invención se refiere, además, a una composición que comprende una preparación de fantasma bacteriano tratada con beta-propiolactona según se describe arriba y un soporte, diluyente y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable. La composición es adecuada como una vacuna o un adyuvante, p. ej. un compuesto inmunoestimulante que se utiliza ya sea solo o junto con un inmunógeno contra el cual se deba dirigir una reacción inmune. La composición es adecuada para uso en medicina humana y medicina veterinaria. Además de ello, los fantasmas bacterianos exentos de cualesquiera células bacterianas vivas se pueden utilizar como soportes para agentes terapéuticos y de diagnóstico tales como polipéptidos (p. ej. anticuerpos, citocinas, interferones, quimiocinas), enzimas y polipéptidos o péptidos no inmunogénicos o inmunogénicos, ácidos nucleicos y sustancias activas de bajo peso molecular (p. ej. péptidos, hormonas, antibióticos, agentes antitumorales, esteroides, inmunomoduladores), según se describe en el documento WO 2005/011713, en donde los fantasmas bacterianos pueden estar sellados, p. ej. según se describe en el documento WO 01/54672 o WO 2005/011713.

Además, la invención se refiere al uso de beta-propiolactona en la fabricación de una preparación de fantasma bacteriano, en que el preparado de fantasma bacteriano es, en particular, una preparación farmacéutica.

Leyendas de las figuras

Figura 1 Diagrama de flujo del procedimiento de producción de BG para BG de *Shigella flexneri* 2a con expresión de E-SNUC a partir del plásmido pGLNlc

Figura 2 Construcción del plásmido pGLysivb

Figura 3 Gráfica representativa de la fermentación de *S. flexneri* 2a (pGLNlc) para visualizar los instantes A-M durante el transcurso del procedimiento de producción de BG

Figura 4 Comparación de *E. coli* NM522 (pBBR1MCS5, sin lisis E) y *E. coli* NM522 BG (pGlysvb, plásmido de lisis E) tratada frente a no tratada con BPL a una concentración final de 0,05% de BPL a 42°C

Figura 4A *E. coli* NM522 (plásmido de la estructura básica pBBR1MCS5, sin lisis E) no tratada frente a tratada con BPL

Figura 4B *E. coli* NM522 (pGlysvb, plásmido de lisis E) no tratada frente a tratada con BPL

Figura 5 Estudio de la temperatura para determinar el efecto de la actividad de BPL a diferentes temperaturas

Figura 6 Comparación de *E. coli* NM522 BG y *E. coli* NM522 producidas a escala de fermentador de 20 l y tratamiento con BPL a una concentración final de 0,05% de BPL a 42°C durante 30 min

Figura 6A E. coli NM522 BG (pGlysi**v**, plásmido de lisis E), tratada con BPL
 Figura 6B E. coli NM522 (plásmido de la estructura básica pBBR1MCS5, sin lisis E), tratada con BPL

5 Figura 7 E. coli NM522 BG producida mediante la combinación de lisis E y nucleasa (E-SNUC) a escala de fermentador de 20 l se inactivaron con una concentración final de 0,025% de BPL a 42°C durante 30 min

Figura 8 Estudio de consistencia de la producción de Shigella flexneri 2a BG (E-SNUC) utilizando 0,05% de BPL durante 30 min para la inactivación final

10 Figura 9 Datos de consistencia de la PCR en tiempo real de muestras durante el transcurso de la producción de BG de Shigella flexneri 2a de 5 fermentaciones de S. flexneri 2a (pGLN**ic**) media +/- DT de 5 operaciones de PCR en tiempo real a partir de correspondientes 5 fermentaciones, d.l = límite de detección = 0,02 ng de ADN/ml.

Figura 10 Fermentación utilizando Shigella flexneri 2a (plásmido de la estructura básica pBBR1MCS5) inactivado con 0,05% de BPL como control

Figura 10A ATCC 700930 (pBBR1MCS5) operación 1

Figura 10B ATCC 700930 (pBBR1MCS5) operación 2

Ejemplos

20 **1. Preparación de fantasmas bacterianos (BG) utilizando una combinación de lisis E y tratamiento con nucleasa seguido de tratamiento con beta-propiolactona (BPL) como una etapa de inactivación final (visualizada en la Figura 1)**

25 Bacterias gram-negativas (p. ej. E. coli o Shigella flexneri 2a en este estudio) se transforman con el plásmido pGlysi**v** (que codifica el gen E de lisis, construcción como la descrita en la Figura 2) o pGLN**ic** (que codifica tanto el gen E de lisis como el gen nucleasa de Staphylococcus aureus SNUC; documento WO 03/006630). Los plásmidos pGlysi**v** y pGLN**ic** regulan estrechamente la expresión del gen E de lisis mediante un desplazamiento ascendente de la temperatura de 35°C a 42-44°C bajo el promotor Lambda termosensible mutado (APRmut) y la expresión de SNUC depende la inducción a partir de un promotor lac situado más arriba mediante la adición de IPTG. Como consecuencia de la expresión de la proteína E se forma una estructura de túnel específica para E entre las membranas interna y externa de las bacterias, dando como resultado la expulsión del contenido citoplásmico, que incluye ADN cromosómico y del plásmido, al medio de cultivo bajo las condiciones descritas, al menos el 99,9% de todas las bacterias se convierten en BG durante el proceso de la lisis E. Para garantizar BG exento de ácido nucleico se activa un segundo sistema en el caso de pGLN**ic**, haciendo uso de las capacidades de degradación de ADN y ARN de SNUC. La nucleasa se expresa -30 min antes de la inducción de la expresión del gen E durante la fase de crecimiento exponencial de las bacterias y se activa después de la compleción de la lisis E mediante la adición de cloruro de magnesio y cloruro de calcio. Para la inactivación total de todas las bacterias potencialmente no exterminadas, se añade BPL en dos porciones al caldo de fermentación como última etapa en el proceso de producción de BG. Después de 30 min de incubación con BPL a 42°C-44°C, los BG se recolectan mediante centrifugación o filtración tangencial, se lavan ampliamente en agua estéril y se liofilizan.

45 Durante el proceso de producción, muestras del caldo de cultivo se toman a instantes fijos (marcados A-M en la Figura 3) para determinar la densidad óptica, unidades formadoras de colonias (CFU), aparición de BG mediante microscopía, así como para el análisis por PCR en tiempo real de los contenidos de ADN. Parámetros de fermentación tales como pH, flujo de aire, pO₂, agitación y temperatura se documentan automáticamente mediante el programa de fermentación. A lo largo del estudio de consistencia, todos los parámetros se mantuvieron en una ventana estrecha.

50 Con el fin de ver si la inactivación bacteriana final añadiendo BPL antes de la recolección de BG es crucial para el proceso de producción, se retiran 3 l del cultivo del caldo del fermentador antes de la adición de BPL, en el instante K. El caldo de cultivo en el recipiente se trata con BPL a una concentración final de 0,05% de BPL en dos adiciones de 0,025% de BPL (instantes K y L). Se recomienda la adición de BPL en dos porciones para evitar posibles contaminaciones (p. ej. mediante la formación de gotitas debajo de la tapa del recipiente) y un buen comportamiento de la inactivación. Para el análisis adicional de la supervivencia bacteriana, en el instante M, se recolectaron 3 l del material tratado con BG + BPL (6 frascos, cada uno de los cuales conteniendo 400 ml de suspensión de BG) mediante centrifugación (15 min a 8.000 rpm).

Después de la centrifugación, el sobrenadante se desecha y los sedimentos de BG se lavan intensamente en agua estéril. En la primera etapa de lavado, cada uno de los sedimentos de BG se resuspenden en 400 ml de agua desionizada estéril y, después de la centrifugación, los sedimentos se almacenan a -20°C durante una noche. Las siguientes etapas de lavado son para reducir el material a un volumen final de 40 ml (etapa de lavado 2 en 4x 400 ml de agua desionizada estéril, etapa de lavado 3 en 2x 400 ml de agua desionizada estéril, etapa de lavado 4 en 1x 400 ml de agua desionizada estéril). Alternativamente, el tratamiento con PBL también se puede producir en esta fase del proceso.

El sedimento final se resuspende añadiendo 40 ml de agua desionizada estéril y se distribuye a 2 matraces de liofilización, y la muestra remanente (~ 5 ml) se transfiere a un tercer matraz de liofilización. Después de la liofilización, el material se examina en cuanto a la esterilidad. Cada uno de los ensayos de esterilidad se realiza por triplicado. Aproximadamente 10 mg del preparado de BG se incorporan en tubos Eppendorf estériles etiquetados. A cada uno de los tubos se añaden 1,5 ml de medio LBv, y el material liofilizado se resuspende. 1 ml de la suspensión se vierte en una placa de Petri vacía y se añaden 20 ml de agar LBv (enfriado adecuadamente a la temperatura de la mano). Después de que el agar solidifica, la placa se incuba a 28°C durante 24 h. Se utilizan 100 µl de la suspensión de BG para la extensión en una placa de agar LBv y se incuba a 28°C durante 24 h. 200 µl de la suspensión fantasma se extienden en una placa de agar LBv y se incuban a 28°C durante 24 h. 100 µl de la suspensión fantasma se utilizan para inocular 5 ml de LBv y se incuban durante 24 h a 28°C. Después de la incubación de enriquecimiento de este último medio, se extienden 100 µl y 200 µl en agar LBv y se incuban a 28°C durante 24 h. La suspensión de BG remanente se almacena a 4°C. La extensión y el recuento de todas las placas de ensayo de la esterilidad se realiza con el sistema WASP, equipo Don Whitley Scientific, Ltd.

Para la PCR en tiempo real, muestras del caldo de cultivo se toman durante la fermentación en los instantes B-M. Todas las operaciones de PCR en tiempo real se han realizado de acuerdo con condiciones estandarizadas utilizando el aparato Icyler de Biorad IQ, amplificando un fragmento de la casete de resistencia a gentamicina del plásmido de lisis/SNUC pGLNlc. Se trazó una curva patrón individual para la cuantificación de pGLNlc en cada una de las operaciones de PCR en tiempo real, mostrando un coeficiente de correlación de al menos 0,998.

2. Comparación de E. coli NM522 (pBBR1MCS5, sin lisis E) y E. coli NM522 BG (pGlysiyb, plásmido de lisis E) tratada frente a no tratada con PBL a una concentración final de 0,05% de PBL a 42°C

Resultado:

Datos procedentes de E. coli NM522 (pBBR1MCS5), que ha sido tratada con 0,05% de PBL a 42°C (Figura 4A) muestran que se obtiene una reducción en la viabilidad de ~ 5 log en experimentos a pequeña escala, mientras que E. coli NM522 BG (pGlysiyb) tratada con 0,05% de PBL a 42°C (Figura 4B) resulta en ninguna bacteria superviviente. La utilización de una concentración de 0,05% de PBL bajo una temperatura de 42°C y 30 min para la reacción es suficiente para que las bacterias lisadas con E sean inactivadas de manera segura; no se detectan recuentos de células vivas. El tratamiento de bacterias E. coli con la misma cantidad de PBL bajo los mismos parámetros no conduce a una inactivación completa.

3. Estudio de la temperatura para determinar el efecto de la actividad de PBL a diferentes temperaturas

La actividad esterilizante de PBL y su autodestrucción en agua depende de la temperatura. Para examinar el perfil de temperatura para la inactivación bacteriana bajo condiciones para la producción de BG, se ha realizado un estudio para comparar las tasas de inactivación de E. coli NM522 pGlysiyb a una CFU de partida de aproximadamente $1 \cdot 10^3$ /ml utilizando 0,05% de PBL a 4 temperaturas diferentes (16°C, 28°C, 36°C y 42°C).

Resultado:

Se pueden demostrar rápidas tasas de inactivación de PBL (15 min) para la producción de BG a 42°C en comparación con temperaturas más bajas (30 min a 36°C) a una reducción de CFU en aproximadamente 1,5 log a 28°C y sólo una ligera reducción (menor que 0,5 log) a 16°C en el espacio de 30 min. Se ha determinado una tasa de reacción dependiente de la temperatura (Figura 5).

4. Comparación de E. coli NM522 BG y E. coli NM522 producida a escala de fermentador de 20 l y tratamiento con PBL a una concentración final de 0,05% de PBL a 42°C durante 30 min

Para determinar el efecto de inactivación de PBL a E. coli NM522 (pBBR1MCS5) bajo las mismas condiciones de fermentación que las utilizadas para la inactivación total de BG producido a partir de E. coli NM522 (pGlysiyb)

(Figura 6A), se han realizado fermentaciones control utilizando E. coli NM522 transformada con el plásmido de la estructura básica pBBR1MCS5 (sin lisis, sin nucleasa) (Figura 6B). Tasas de exterminio de PBL así como la concentración de ADN de muestras bacterianas se midieron en los instantes y bajo las condiciones de fermentación según se describen para la producción de BG (Ejemplo 1, Figura 3).

5 Resultado:
 Datos de la fermentación de E. coli NM522 (plásmido de la estructura básica pBBR1MCS5) que ha sido tratada con 0,05% de PBL a 42°C (Figura 6B) demuestran que se obtiene una reducción en la viabilidad de ~3 log, mientras que E. coli BG producida a partir de NM522 (pGlysvb) tratada con 0,05% de PBL a 42°C (Figura 6A) dio como resultado la inactivación total, no eran detectables CFU vivas al término del proceso de producción de BG (Figura 6A). Para E. coli NM522 BG (pGlysvb) a escala de fermentador de 20 l, se puede conseguir una etapa de inactivación final y segura para el procedimiento de producción de BG utilizando 0,05% de PBL durante 30 min a 42°C (Figura 6B). Para E. coli NM522 (plásmido de la estructura básica pBBR1MCS5) a escala de fermentador de 20 l no se puede conseguir ninguna inactivación final de E. coli utilizando 0,05% de PBL durante 30 min a 42°C. La reducción de la viabilidad de las bacterias es ~3 log.

5. E. coli NM522 BG producida mediante combinación de lisis E y nucleasa (E-SNUC) a escala de fermentador de 20 l se inactivó con una concentración final de 0,025% de PBL a 42°C durante 30 min

20 Resultado:
 En el proceso de producción de E. coli NM522 BG (E-SNUC BG) exenta de ADN (pGlysvb, que codifica el gen de lisis E, pSNUCIQ3 que codifica el gen nucleasa de Staphylococcus aureus SNUC; Mayr et al., 2005) se ha determinado que la concentración utilizada para la inactivación total mediante PBL es menor que 0,025% (Figura 7). Para el proceso de producción de E. coli NM522 BG exenta de ADN (pGlysvb, pSNUCIQ3) a escala de fermentador de 20 l se puede conseguir una inactivación final y segura utilizando 0,025% de PBL durante 30 min a 42°C (Figura 7).

6. Estudio de consistencia de la producción de Shigella flexneri 2a BG (E-SNUC) utilizando 0,05% de PBL durante 30 min para la inactivación final

30 El estudio de consistencia resume datos de cinco operaciones de fermentación que se realizaron todas bajo los parámetros descritos en la breve descripción del proceso de producción de BG según se representa en la Figura 3 (véase el Ejemplo 1).
 Para visualizar la consistencia de las fermentaciones, la Figura 8 muestra valores de CFU +/- DT en puntos de muestreo especificados (C = inducción de lisis, E = activación de SNUC, K = 1ª adición de PBL, L = 2ª adición de PBL y M = recolección). Tal como se describe arriba en el proceso de fabricación (Ejemplo 1, Figura 3) muestras durante la fermentación han sido tomadas en los instantes B-M para la detección mediante PCR en tiempo real para determinar ADN residual en las muestras de BG. Para visualizar la consistencia de los datos de PCR en tiempo real, la Figura 9 muestra ng medios de ADN/ml de cultivo recolectado +/- DT a los puntos de muestreo especificados (C = inducción de lisis, E = activación de SNUC, K = 1ª adición de PBL y M = recolección).

45 Resultado:
 El estudio de consistencia del procedimiento de producción de Shigella flexneri 2a BG mostró una buena correlación en la consistencia para todos los instantes medidos a lo largo del proceso de producción (Figura 9). Se han realizado ensayos de esterilidad según se describe en la breve descripción de la producción de BG (Ejemplo 1, Figura 3). El material para el ensayo de la esterilidad se recolectó en dos instantes, en el instante K, antes de la adición PBL, y en el instante M, al final del procedimiento de producción de BG. Se encontró que todas las muestras de BG sometidas a ensayo eran estériles. La PCR en tiempo real ha sido realizada para demostrar la reducción del contenido en ADN durante el proceso de producción. Las muestras muestran una buena consistencia y el límite de detección para ADN (= 0,02 ng de ADN/ml cultivo) se alcanza en el material final de las muestras tomadas en el instante M.

7. Fermentación utilizando Shigella flexneri 2a (pBBR1MCS5) inactivada con 0,05% de PBL, como control

55 Para determinar el efecto de inactivación de PBL a bacterias Shigella flexneri 2a bajo las mismas condiciones de fermentación que para la producción de BG, se realizaron dos fermentaciones control utilizando Shigella flexneri 2a transformada con el plásmido de la estructura básica pBBR1MCS5 (sin lisis, sin nucleasa). Tasas de exterminio por PBL así como la concentración de ADN de muestras bacterianas se midieron en los instantes y bajo las

condiciones de fermentación descritos para la producción de BG (Ejemplo 1, Figura 3).

Resultado:

- 5 Para la fermentación de *S. flexneri* 2a (plásmido de la estructura básica pBBR1MCS5), la inactivación con 0,05% de PBL provocó una caída en los recuentos de células vivas (CFU) en 4 log (Figura 10 A, B) indicando que, en contraposición con la lisis de E o la combinación de la lisis E-SNUC, una concentración final de 0,05% de PBL sola no es suficiente para exterminar a todas las bacterias en el espacio de 30 min.
Datos en tiempo real de las fermentaciones control no muestran disminución de ADN.

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Un método para producir una preparación de fantasma bacteriano, que comprende tratar dichos fantasmas bacterianos con beta-propiolactona.
- 2.- El método de la reivindicación 1, que comprende las etapas de:
(a) producir una preparación de fantasma bacteriano y
(b) subsiguientemente, tratar la preparación de fantasma bacteriano con beta-propiolactona bajo condiciones en donde se reduce el número de cualesquiera células bacterianas vivas remanentes en dicha preparación de fantasma.
10
- 3.- El método de la reivindicación 1 ó 2, en el que el número de cualesquiera células bacterianas vivas remanentes en dicha preparación de fantasma se reduce en al menos 10^3 - 10^4 .
- 15 4.- El método de las reivindicaciones 1-3, en el que los fantasmas bacterianos se tratan con una concentración final de beta-propiolactona de 0,01-1% (v/v).
- 5.- El método de las reivindicaciones 1-4, en el que la adición de beta-propiolactona se lleva a cabo en dos etapas consecutivas.
20
- 6.- El método de las reivindicaciones 1-5, en el que la adición de beta-propiolactona se lleva a cabo a 26-50°C, y en el que los fantasmas bacterianos se inactivan durante 10-60 min.
- 7.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que la preparación de fantasma bacteriano se obtiene:
25
(a) proporcionando células bacterianas que comprendan un gen que codifica una proteína lítica capaz de formar una estructura de túnel en el complejo de la envoltura de la célula bacteriana,
(b) sometiendo la célula bacteriana a condiciones en donde el gen lítico se expresa y los componentes citoplásmicos de las células bacterianas se liberan y
30
(c) obteniendo los fantasmas bacterianos resultantes.
- 8.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que la preparación de fantasma bacteriano se obtiene:
35
(a) proporcionando células bacterianas que comprendan un gen que codifica una proteína lítica capaz de formar una estructura de túnel en el complejo de la envoltura de la célula bacteriana,
(b) cultivando las células bacterianas bajo condiciones en donde el gen lítico no se expresa,
(c) sometiendo la célula bacteriana a condiciones en donde el gen lítico se expresa y los componentes citoplásmicos de las células bacterianas se liberan y
40
(d) obteniendo los fantasmas bacterianos resultantes.
- 9.- El método de la reivindicación 7 u 8, en el que las células bacterianas codifican adicionalmente una enzima capaz de hidrolizar componentes citoplásmicos en la célula bacteriana, que comprende la siguiente etapa:
45
someter la célula bacteriana a condiciones en donde se expresa el gen de la enzima y se degradan los componentes citoplásmicos de las células bacterianas.
- 10.- El método de la reivindicación 7 u 8, en el que las células bacterianas codifican adicionalmente una enzima capaz de hidrolizar componentes citoplásmicos en la célula bacteriana, que comprende las siguientes etapas:
50
(a) opcionalmente, cultivar las células bacterianas bajo condiciones en donde no se expresa el gen de la enzima
(b) someter la célula bacteriana a condiciones en donde el gen de la enzima se expresa y se degradan los componentes citoplásmicos de las células bacterianas.
- 11.- El método de la reivindicación 9 ó 10, en el que el gen que codifica la enzima hidrolítica es un gen nucleasa.
- 55 12.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones 7-11, en el que el gen lítico y el gen de la enzima están en enlace operativo con una secuencia de control de la expresión regulable, en donde el gen lítico y el gen de la enzima se encuentran en uno o varios vectores.

13.- El método de la reivindicación 12, en el que la expresión del gen lítico y la expresión de la enzima se inducen en instantes diferentes.

5 14.- Una composición farmacéutica que comprende una preparación de fantasma bacteriano tratada con beta-propiolactona y un soporte, diluyente y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable.

15.- La composición de la reivindicación 14, que es una vacuna o es un adyuvante.

10 16.- La composición de la reivindicación 15 para uso en medicina humana o para uso en medicina veterinaria.

17.- Uso de beta-propiolactona en la fabricación de una preparación de fantasma bacteriano.

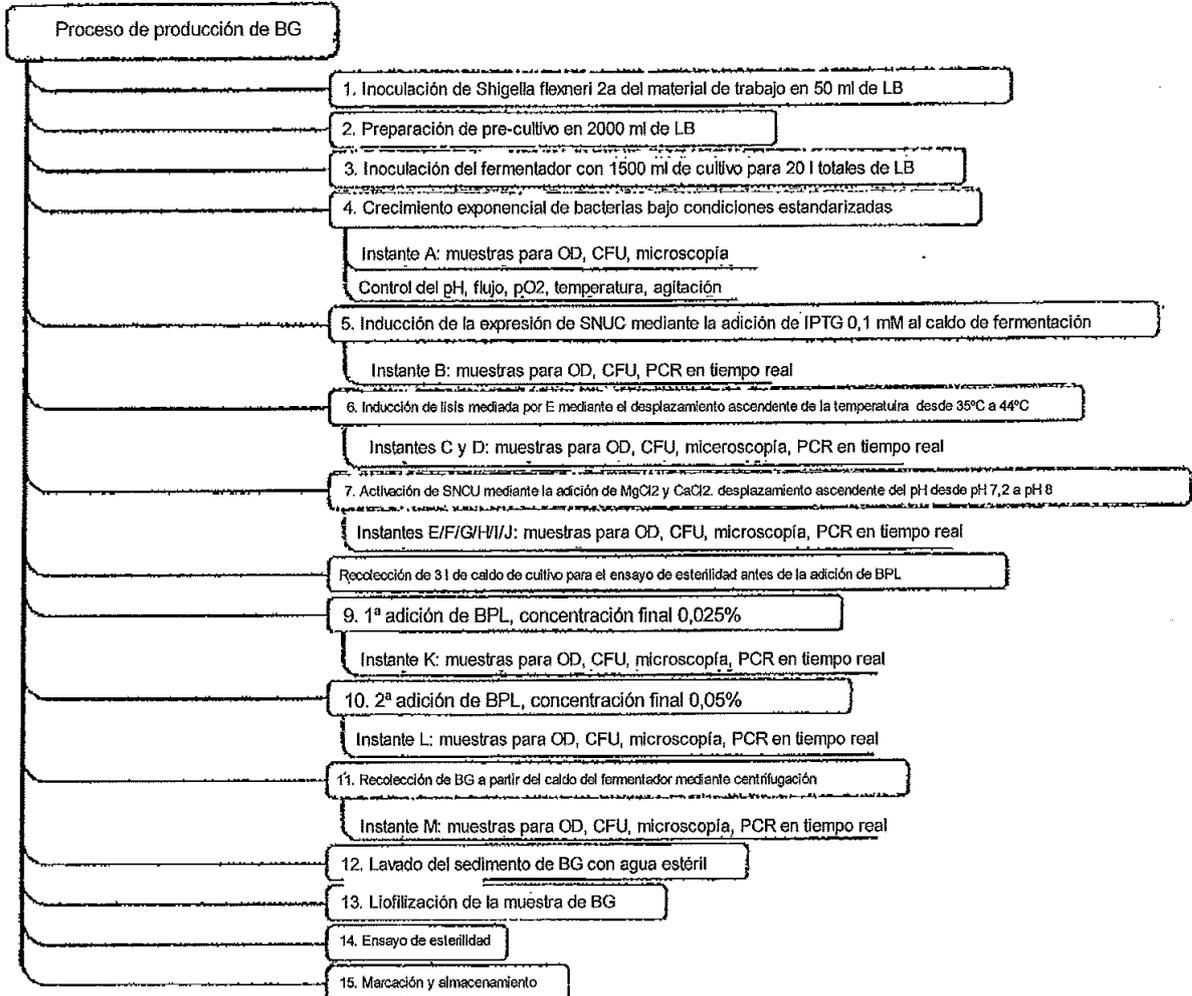


Figura 1

Construcción del plásmido pGLysivb

(Lisis E)

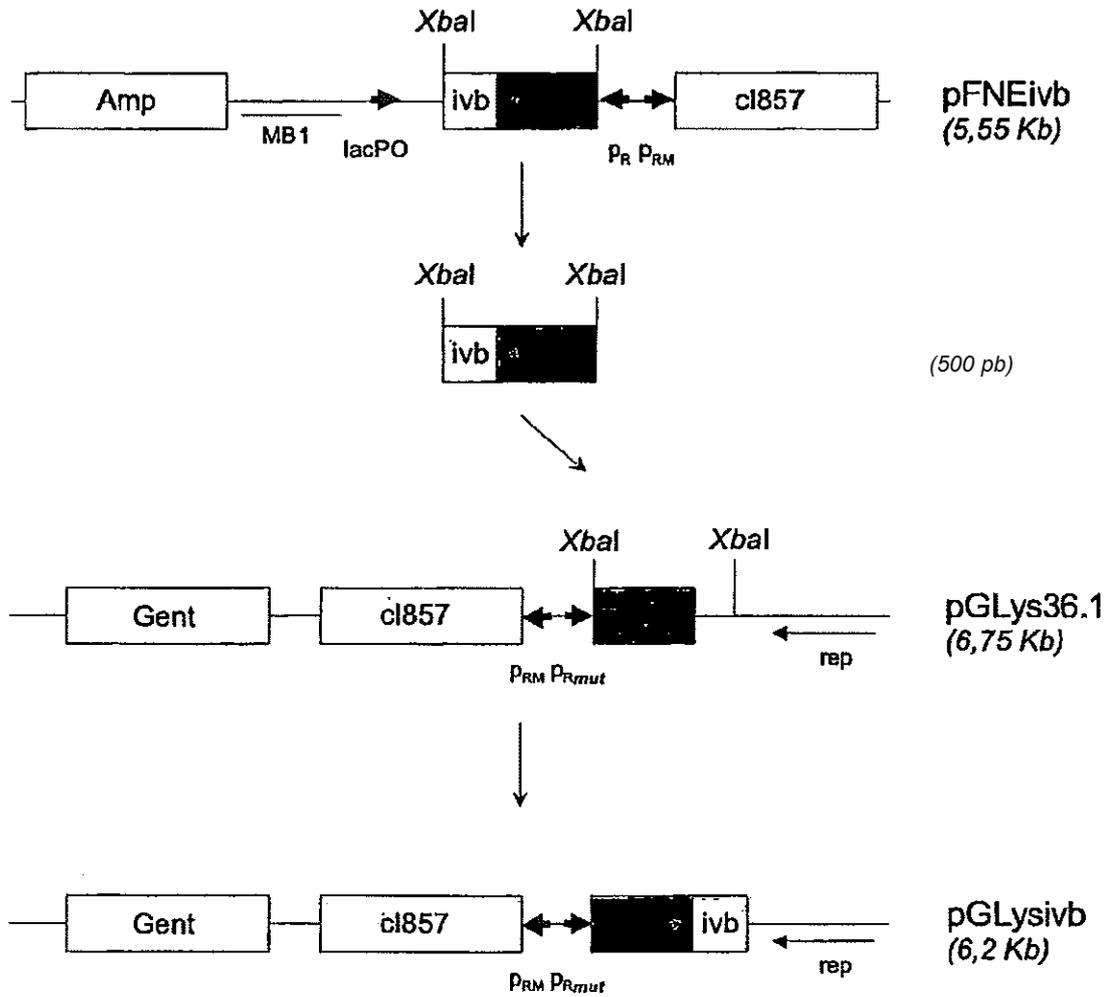


Figura 2

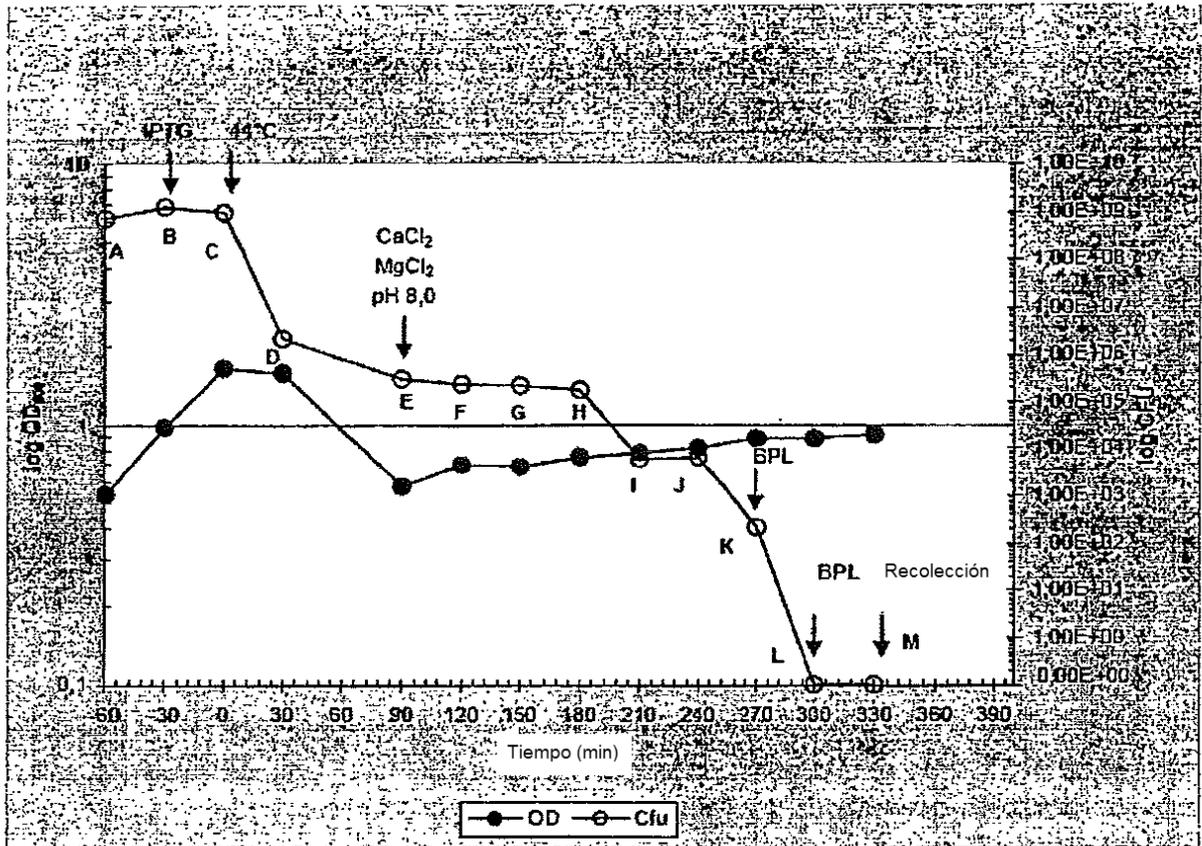


Figura 3

			OD media NM522 pBBRMCS5	OD media NM522 pBBRMCS5	CFU medias NM522 pBBRMCS5	CFU medias NM522 pBBRMCS5
Hora:	Min:		no tratada con BPL	tratada con BPL	no tratada con BPL	tratada con BPL
15:10	100	OD~0,1	0,135			
16:00	50	OD~0,25	0,25		1,63E+08	
16:50	0	OD~0,4	0,4	0,4	1,97E+08	1,97E+08
17:20	30		0,53	0,475	4,44E+08	1,98E+05
17:50	60		0,58	0,505		7,63E+02

estructura básica de E. coli NM522 +/- BPL

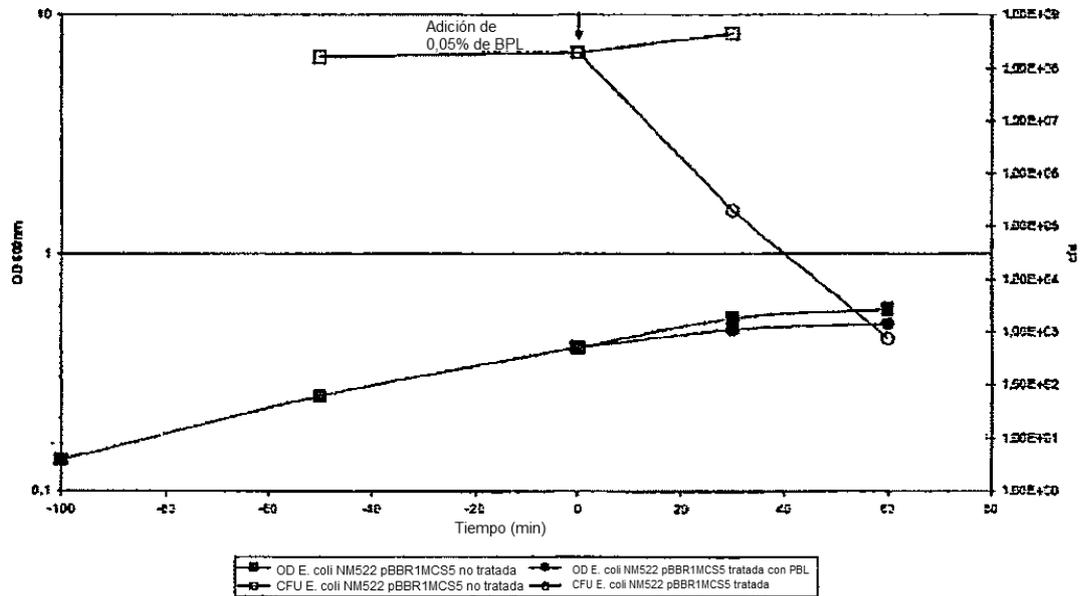


Figura 4A

			OD media NM522 pGLysivb	OD media NM522 pGLysivb	CFU media NM522 pGLysivb	CFU media NM522 pGLysivb
Hora:	Min:		no tratada con BPL	tratada con BPL	no tratada con BPL	tratada con BPL
11:10	100	OD~0.1	0,065			
12:15	35	OD~0.25	0,265		7,87E+07	
12:50	30	OD~0,4	0,425		2,87E+08	
13:20	30		0,3		1,72E+06	
13:50	60		0,2		3,30E+05	
14:20	90		0,19	0,19	1,42E+05	1,42E+05
14:50	120		0,18	0,19	8,63E+04	1,00E-01
15:20	150		0,175	0,235	3,84E+04	1,00E-01

E.coli NM522 pGlysiyb +/-BPL

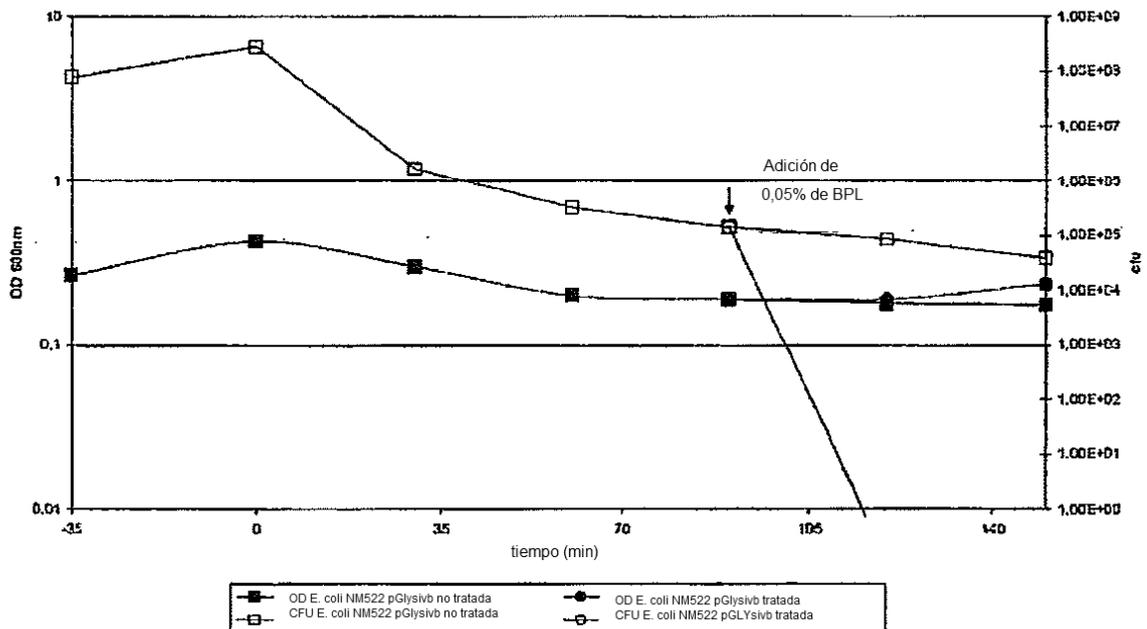


Figura 4B

Estudio de la temperatura sobre
NM522 pGlysiyb tratada con BPL

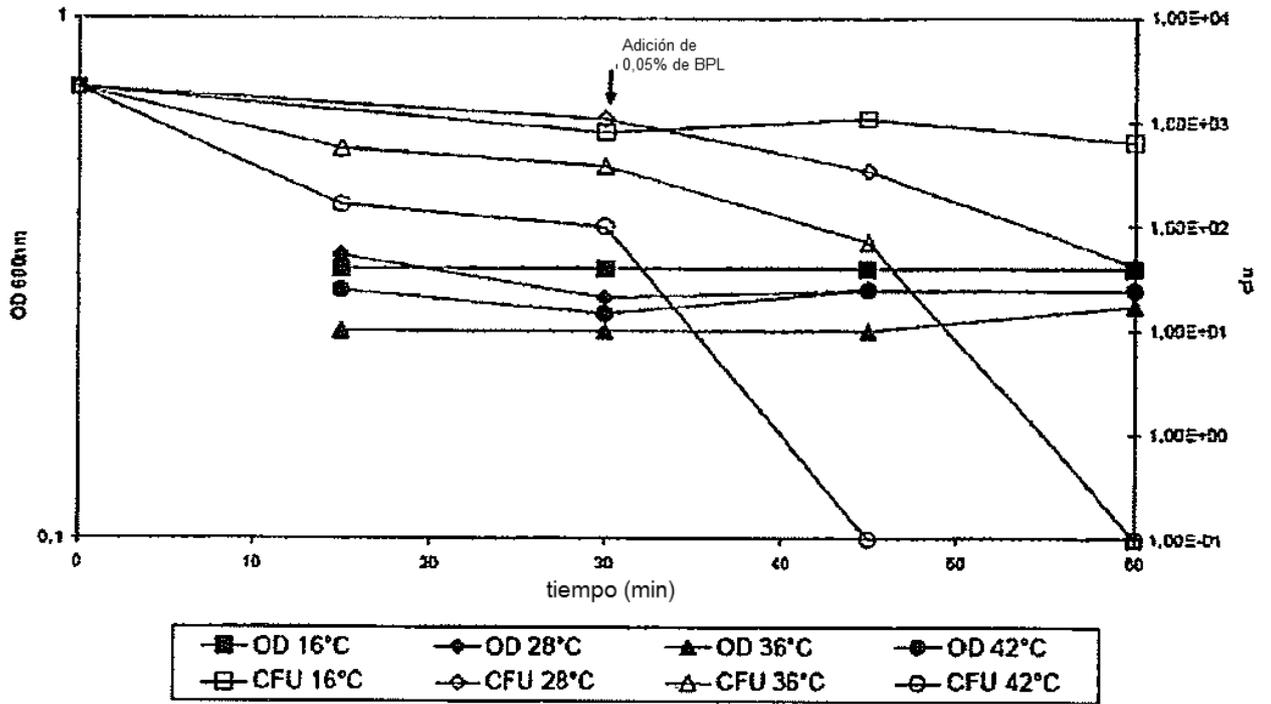


Figura 5

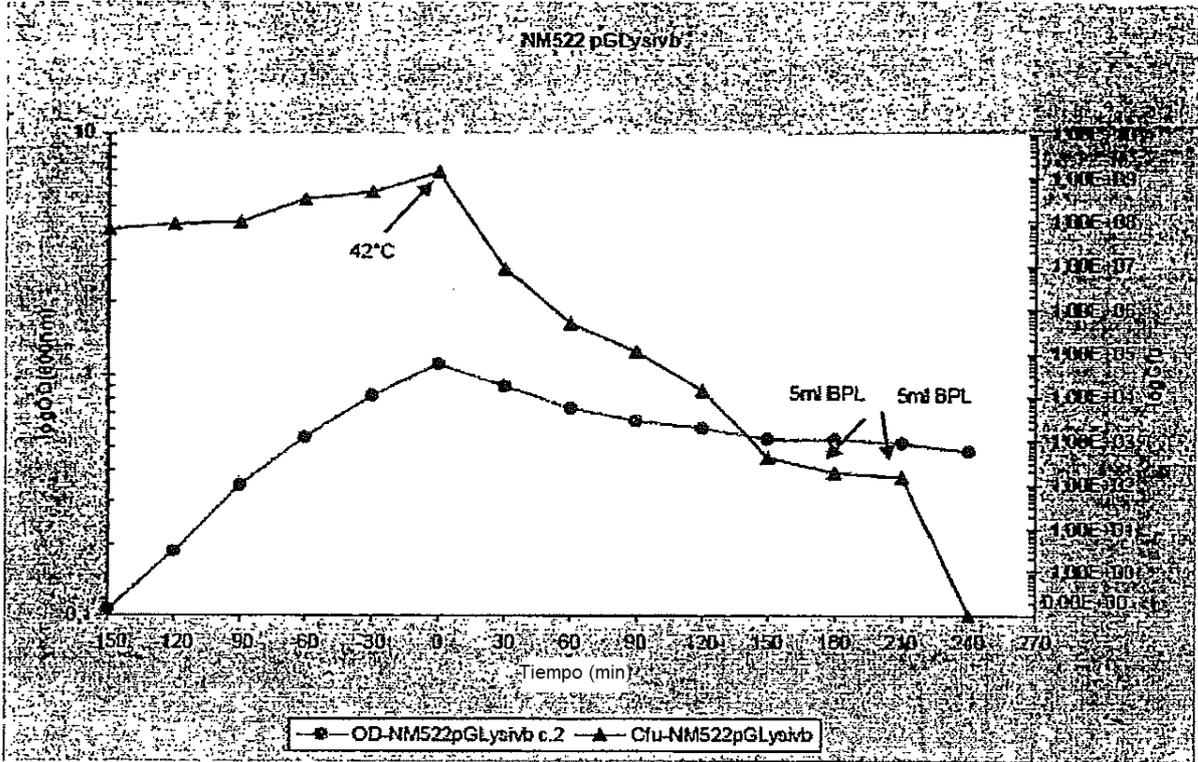


Figura 6A

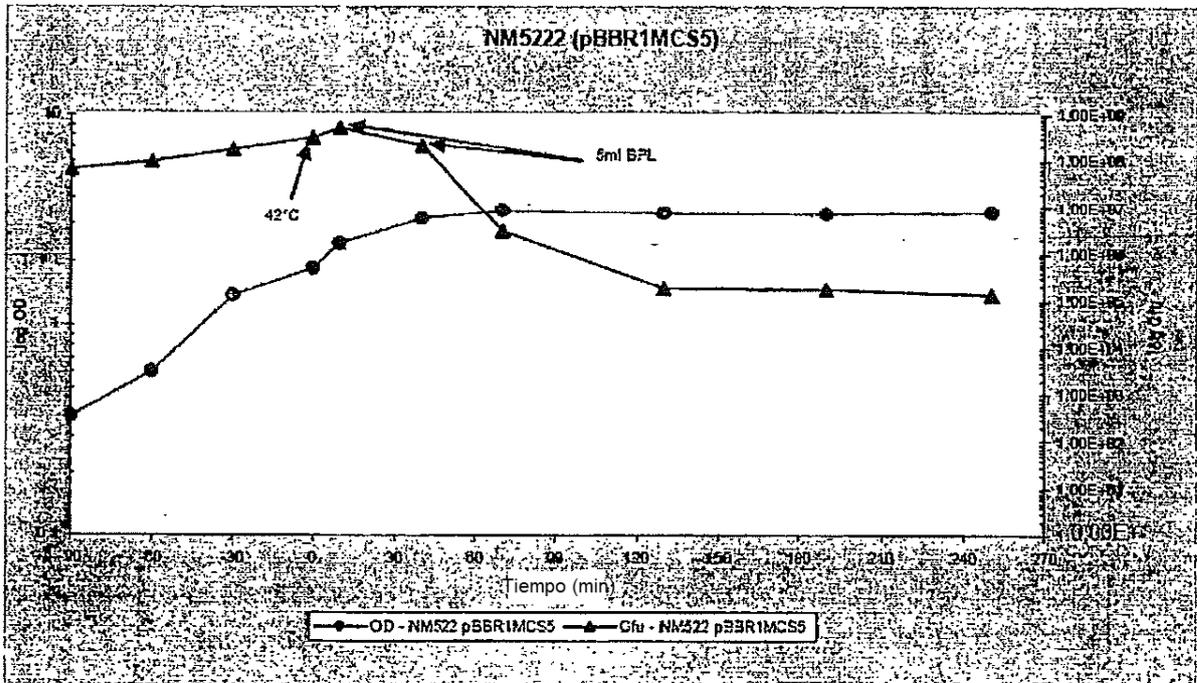


Figura 6B

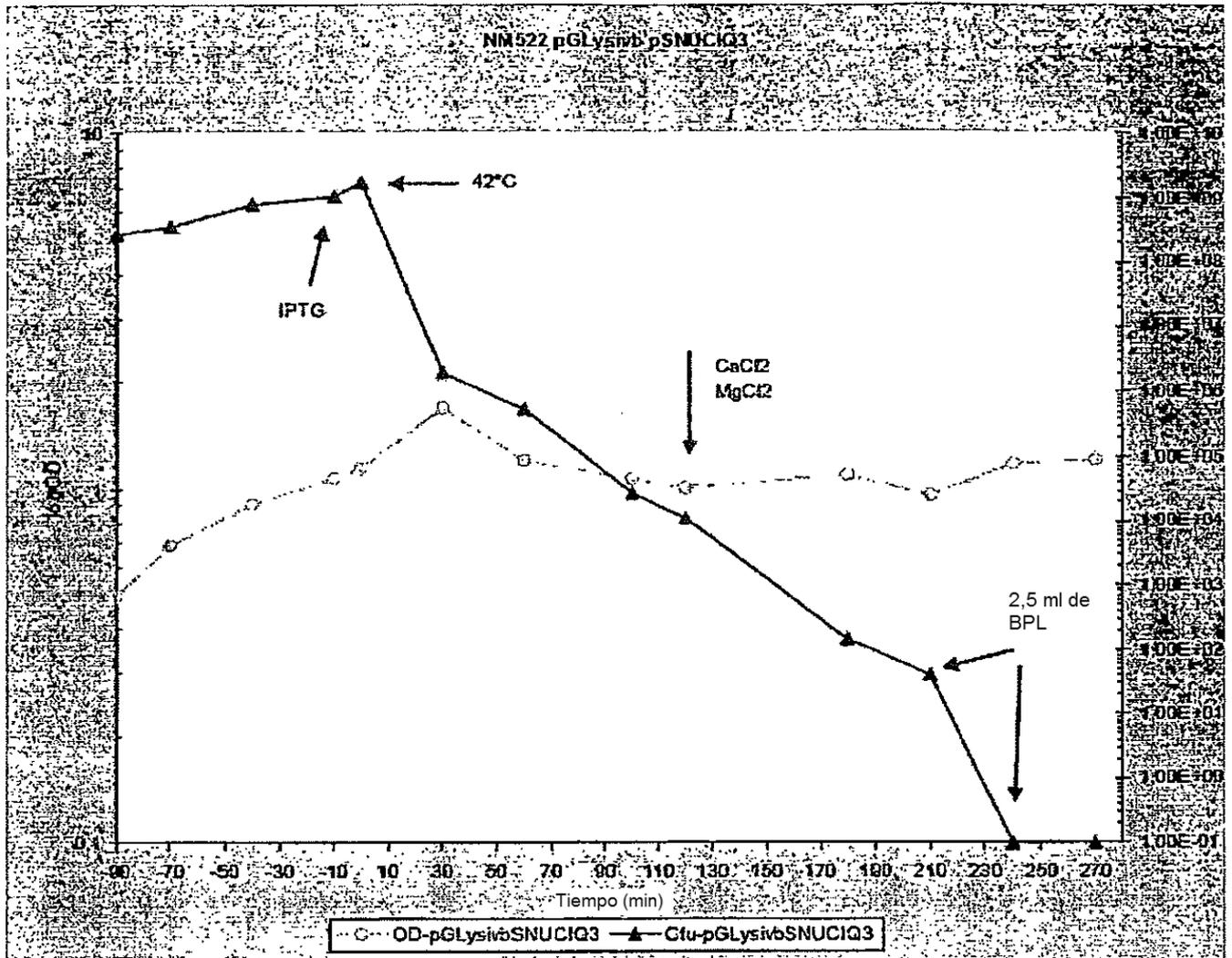


Figura 7

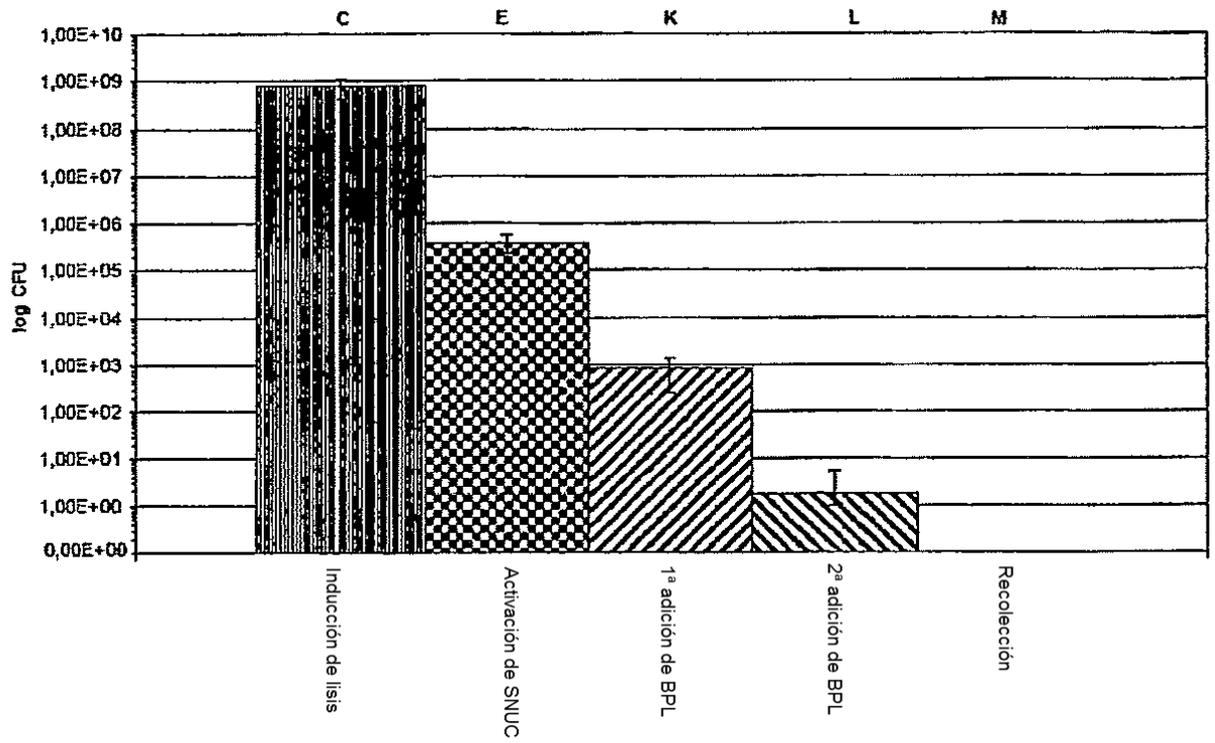


Figura 8

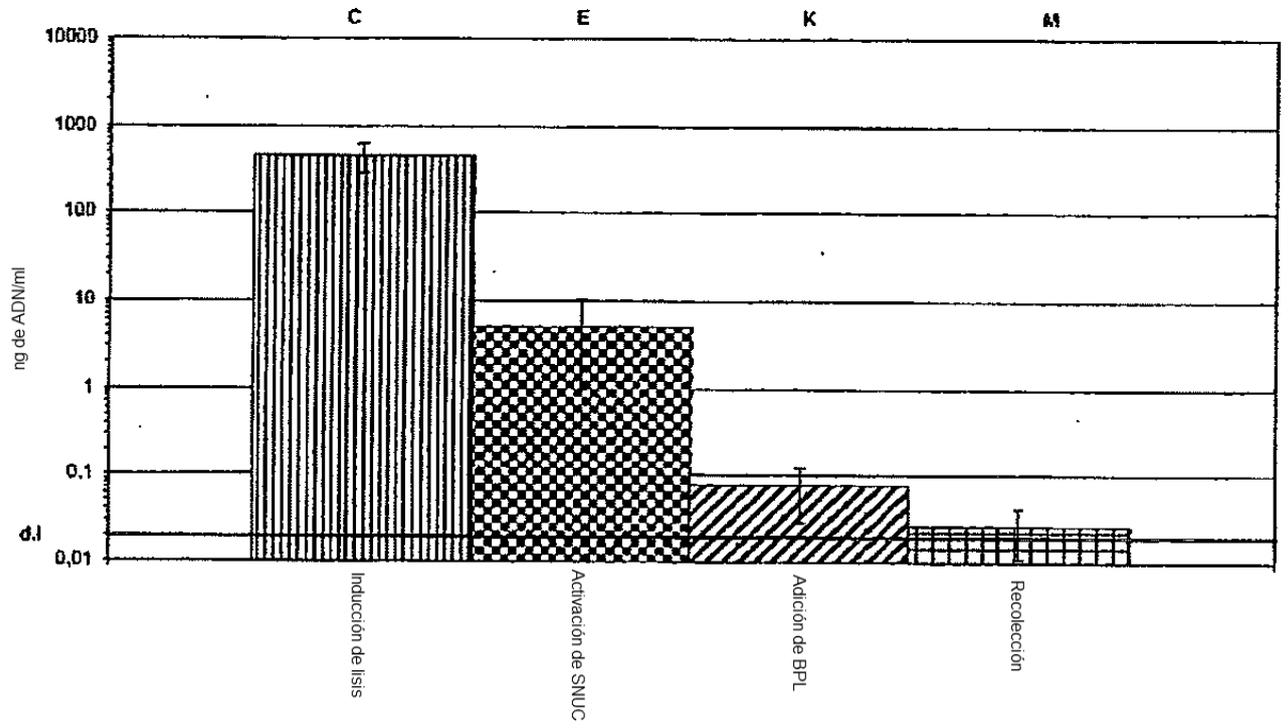


Figura 9

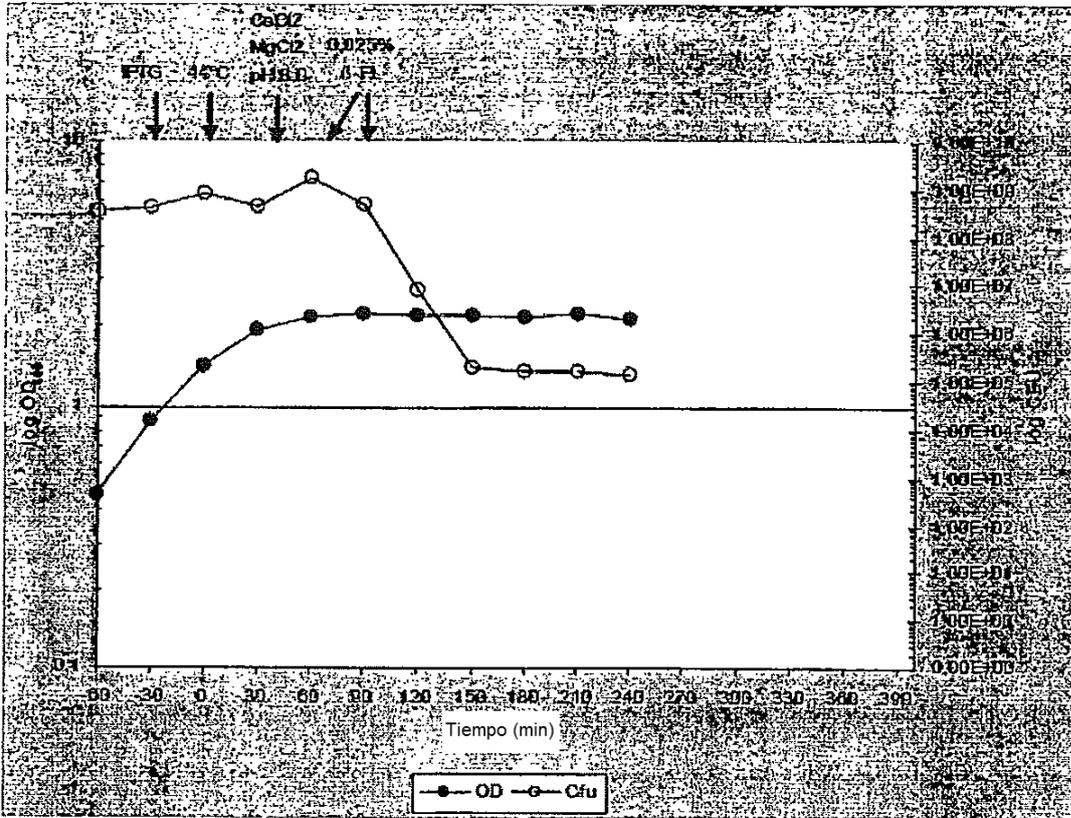


Figura 10A

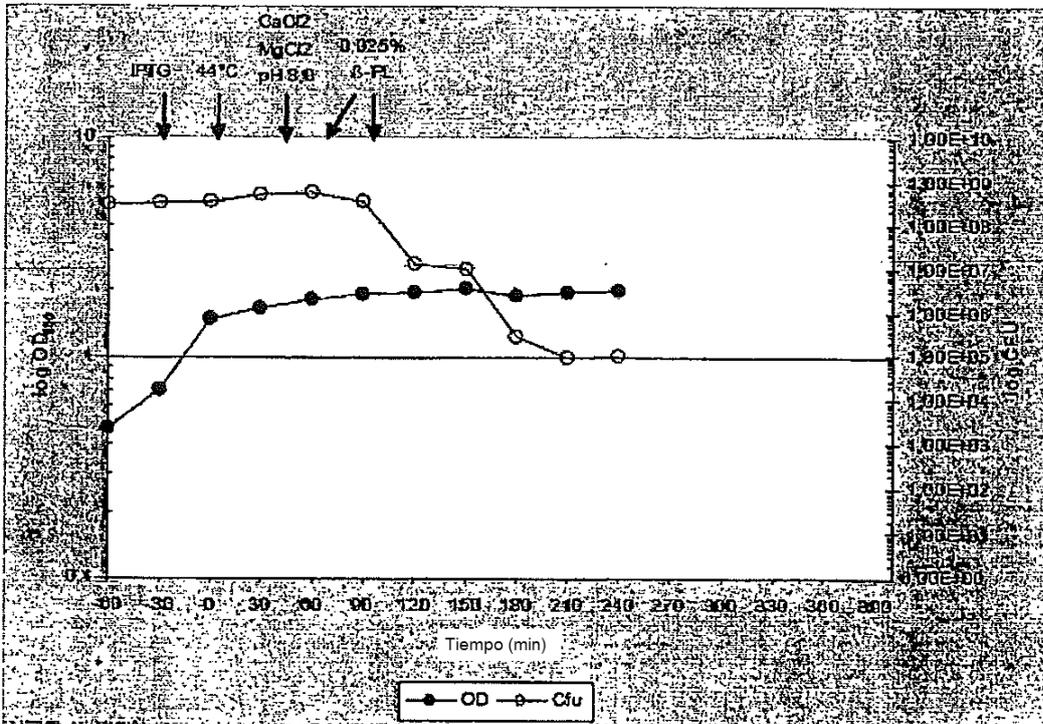


Figura 10B