

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 569 909**

51 Int. Cl.:

C12N 15/09 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.06.2009 E 09770897 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.02.2016 EP 2310502**

54 Título: **Composiciones y métodos del mecanismo de suicidio genético regulado**

30 Prioridad:

10.04.2009 US 168457 P

25.06.2008 US 75687 P

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

13.05.2016

73 Titular/es:

VAXIION THERAPEUTICS, LLC (100.0%)
11585 Sorrento Valley Road, Suite 105
San Diego, CA 92121, US

72 Inventor/es:

GIACALONE, MATTHEW J.;
MALOY, STANLEY y
TSUJI, SHINGO

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 569 909 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

Composiciones y métodos del mecanismo de suicidio genético regulado

5 La presente invención se refiere a una bacteria productora de minicélulas que comprende un gen expresable que codifica un producto génico productor de minicélulas que modula uno o más de formación de septos, fisión binaria y segregación de cromosomas; y un gen expresable que codifica una endonucleasa buscadora donde el gen de la endonucleasa buscadora es un transgén, y donde el cromosoma de la bacteria productora de minicélulas comprende uno o más sitios de reconocimiento de la endonucleasa buscadora; y un método para prepararlas.

10

Antecedentes de la invención**Campo de la invención**

15 Las realizaciones de la presente invención se refieren a bacterias productoras de minicélulas y a un método para prepararlas como se define en las reivindicaciones.

Descripción de la técnica relacionada

20 La siguiente descripción se proporciona para ayudar a comprender la presente descripción, pero no se admite que describa o constituya técnica anterior a la presente descripción. Los contenidos de los artículos, patentes, y solicitudes de patente, y todos los demás documentos e información electrónicamente disponible mencionada o citada en esta solicitud, se incorporan por la presente por referencia en su totalidad en la misma medida que si cada publicación individual se indicara específica e individualmente como incorporada por referencia. Los solicitantes se reservan el derecho a incorporar físicamente en esta solicitud todos y cada uno de los materiales e información de
25 cualquiera de dichos artículos, patentes, solicitudes de patente, u otros documentos.

Las minicélulas son nanopartículas biológicas encapsuladas con membrana (≤ 400 nm) acromosómicas que se forman por bacterias después de una alteración en el aparato de división normal de las células bacterianas. En
30 esencia, las minicélulas son réplicas pequeñas metabólicamente activas de células bacterianas normales con la excepción de que no contienen ADN cromosómico y, por tanto, no se dividen y no son viables. Aunque las minicélulas no contienen ADN cromosómico, moléculas de ADN plasmídico, moléculas de ARN, proteínas nativas y/o expresadas de forma recombinante y otros metabolitos, han demostrado segregar en minicélulas.

35 Durante el último siglo, se han explotado las minicélulas como herramientas para científicos de investigación que estudian la división celular, la replicación plasmídica, la segregación plasmídica, la producción de ARN, la producción de proteínas, el aislamiento de plásmidos, la caracterización de plásmidos, y la producción del factor de virulencia transportado por plásmidos en procariontas.

40 Como resultado de los avances en los campos de microbiología, genética microbiana, y biología molecular, cualquier minicélula dada, independientemente de la especie celular precursora de la cual se obtuvo, ahora puede modificarse por ingeniería y posteriormente usarse como vehículos de suministro o imágenes dirigidos *in vivo* o *in vitro*.

45 Las minicélulas son adecuadas de forma exclusiva como vehículos de suministro e imágenes *in vivo* porque combinan muchas de las ventajas singulares de otras tecnologías de suministro en un único vehículo de suministro versátil. Las minicélulas pueden "modificarse por ingeniería" para encapsularse preferentemente, acoplarse a, o absorber moléculas biológicamente activas, incluyendo diversos ácidos nucleicos, proteínas, y fármacos de molécula pequeña para posterior suministro en aplicaciones médicas tanto terapéuticas como profilácticas. Como se describe en mucho más detalle a continuación, las minicélulas tienen la ventaja añadida, de que pueden dirigirse a tipos
50 específicos de célula, tejido, y órgano, a través del uso de varios enfoques diferentes basados en anticuerpo o afinidad.

Sumario de la invención

55 La presente invención proporciona una bacteria que produce minicélulas que comprende: un gen expresable que codifica un producto génico que produce minicélulas que modula uno o más de la formación septos, fisión binaria, y segregación de cromosomas; y un gen expresable que codifica una endonucleasa buscadora, donde el cromosoma de la bacteria que produce minicélulas comprende uno o más sitios de reconocimiento de la endonucleasa buscadora. En algunas realizaciones, el gen que produce minicélulas es un gen de división celular. El gen de
60 división celular incluye, aunque sin limitación *ftsZ*, *sulA*, *ccdB*, y *sfIC*. En algunas realizaciones el gen que produce minicélulas se expresa bajo el control de un promotor inducible. En algunas realizaciones, el gen de endonucleasa está localizado en el cromosoma de la bacteria productora de minicélulas. De acuerdo con la invención, la endonucleasa es una endonucleasa buscadora. La endonucleasa buscadora incluye, aunque sin limitación, I-Ceul, PI-Scel, I-Chul, I-Cpal, I-Scelll, I-Crel, I-Msol, I-Scell, I-ScelV, I-Csml, I-Dmol, I-Porl, PI-Tiil, PI-Tiill, y PI-Scpl. En
65 algunas realizaciones, la endonucleasa se expresa bajo el control de un promotor inducible. En algunas realizaciones, la bacteria productora de minicélulas es una bacteria Gram-negativa. La bacteria Gram-negativa

incluye, aunque sin limitación, *Campylobacter jejuni*, *Lactobacillus spp.*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Legionella pneumophila*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, y *Escherichia coli*. En algunas realizaciones, la bacteria productora de minicélulas comprende un gen que codifica un producto génico que está implicado en la síntesis de lipopolisacáridos, donde el gen está modificado genéticamente en comparación con un gen de tipo silvestre correspondiente. En algunas realizaciones, el gen es un gen *msbB* que codifica un producto génico que causa que la bacteria produzca una molécula de lípido A alterada en comparación con moléculas de lípido A en una bacteria de tipo silvestre correspondiente. En algunas realizaciones, la molécula de lípido A alterada es deficiente con respecto a la adición de ácido miristóico a la parte de lípido A de la molécula de lipopolisacárido en comparación con moléculas de lípido A en una bacteria de tipo silvestre correspondiente. La bacteria productora de minicélulas puede ser una bacteria Gram-positiva. La bacteria Gram-positiva incluye, aunque sin limitación, *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Bacillus subtilis* o *Bacillus cereus*. En algunas realizaciones, la bacteria productora de minicélulas comprende un gen que está implicado en la recombinación homóloga, donde el gen está modificado genéticamente en comparación con un gen de tipo silvestre correspondiente, donde la bacteria productora de minicélulas es deficiente en reparación de daños en el ADN.

Algunas otras realizaciones proporcionan un método para preparar minicélulas, que comprende cultivar la bacteria productora de minicélulas descrita en este documento y separar sustancialmente las minicélulas de las células precursoras productoras de minicélulas, generando de ese modo una composición que comprende minicélulas. En algunas realizaciones, el método comprende adicionalmente inducir la formación de minicélulas a partir de la célula precursora productora de minicélulas. En algunas realizaciones, el método comprende adicionalmente inducir la expresión del gen que codifica la endonucleasa. En algunas realizaciones, la formación de minicélulas se induce por la presencia de uno o más compuestos químicos seleccionados entre isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG), ramnosa, arabinosa, xilosa, fructosa, melobiosa, y tetraciclina. En algunas realizaciones, la expresión del gen que codifica la endonucleasa se induce por un cambio en la temperatura. En algunas realizaciones, el método comprende adicionalmente purificar las minicélulas de la composición. En algunas realizaciones, las minicélulas se separan sustancialmente de las células precursoras mediante un proceso seleccionado entre el grupo que consiste en centrifugación, ultracentrifugación, gradiente de densidad, inmunofluorescencia e inmunoprecipitación.

Las realizaciones descritas en este documento, pero que no están bajo la invención reivindicada, proporcionan una minicélula eubacteriana que comprende una membrana externa, donde la membrana externa comprende moléculas de lípido A que no tienen resto de ácido miristóico. En algunas realizaciones, la membrana externa de la minicélula eubacteriana descrita en este documento tiene una composición que provoca la reducción de respuestas inmunitarias proinflamatorias en un hospedador mamífero en comparación con la membrana externa de minicélulas eubacterianas que se obtienen de una bacteria de tipo silvestre correspondiente. En algunas realizaciones, la minicélula eubacteriana comprende adicionalmente uno o más compuestos biológicamente activos. En algunas realizaciones, al menos uno de los compuestos biológicamente activos se selecciona entre el grupo que consiste en un radioisótopo, un polipéptido, un ácido nucleico, y una molécula pequeña. El compuesto biológicamente activo puede ser un fármaco de molécula pequeña, un agente de imágenes de molécula pequeña, un agente quimioterapéutico, o una enzima convertidora de profármaco. El compuesto biológicamente activo también puede ser una combinación de un ácido nucleico y una molécula pequeña; una combinación de un agente de imágenes de molécula pequeña y un fármaco de molécula pequeña; una combinación de un fármaco de molécula pequeña, un agente de imágenes de molécula pequeña, y un ácido nucleico; o una combinación de un ácido nucleico y un polipéptido. En algunas realizaciones, la minicélula eubacteriana descrita en este documento comprende adicionalmente un resto de direccionamiento localizado en superficie celular. En algunas realizaciones, el resto de direccionamiento localizado en superficie celular es una proteína de fusión, donde la proteína de fusión es una fusión de un dominio de anclaje de membrana externa eubacteriana y un fragmento de anticuerpo. En algunas realizaciones, el resto de direccionamiento localizado en superficie celular es una proteína de fusión, donde la proteína de fusión es una fusión de IgAP de *Neisseria gonorrhoeae* y un fragmento de anticuerpo que reconoce un antígeno de superficie celular de mamífero. En algunas realizaciones, los antígenos de superficie celular de mamífero se seleccionan entre el grupo que consiste en adipofilina, *AIM-2*, *BCLX (L)*, *BING-4*, *CPSF*, Ciclina D1, *DKK1*, *ENAH*, *Ep-CAM*, *EphA3*, *FGF5*, *G250/MN/CAIX*, *HER-2/neu*, *IL-13R alfa 2*, carboxilo esterasa intestinal, alfa-fetoproteína, *M-CSF*, *MCSP*, *mdm-2*, *MMP-2*, *MUC-1*, *p53*, *PBF*, *PRAME*, *PSMA*, *RAGE-1*, *RGS5*, *RNF43*, *RU2AS*, *secemina 1*, *SOX10*, *STEAP1*, survivina, Telomerasa, *WT1*, *Cdc27*, *CDK4*, *CDKN2a*, *BCR-ABL*, *Barge-1*, *GAGE1-8*, *GnTV*, *HERV-K-MEL*, *KK-LC-1*, *KM-HN-1*, *LAGE-1*, *MAGE-AL*, *MAGE-A2*, *MAGE-A3*, *MAGE-A4*, *MAGE-A6*, *MAGE-A9*, *MAGE-A9*, mucina, *NA-88*, *NY-ESO-1*, *LAGE-2*, *SAGE*, *Sp17*, *SSX-2*, *SSX-4*, *TRAG-3*, *CD-166*, y *TRP2-INT2*.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es un gráfico que muestra los efectos de I-Ceul sobre el crecimiento de cultivo de *E. coli*.

La figura 2 es un gráfico que muestra los efectos de I-Ceul sobre la viabilidad de *E. coli*.

Las figuras 3A y 3B son gráficos de barras que muestran que la sobreexpresión simultánea de *ftsZ* y la inducción de I-Ceul conduce a mayores rendimientos de minicélulas en comparación con mutantes *minCDE* o la sobreexpresión de *ftsZ* solo.

Las figuras 4A-D son imágenes que muestran que la sobreexpresión de *ftsZ* y la inducción del sistema de suicidio basado en I-Ceul causa filamentos aumentados de células precursoras.

La figura 5 es un gráfico de barras que muestra que el sistema de suicidio basado en I-Ceul introduce roturas

cromosómicas bicatenarias irreparables.

La figura 6 es un gráfico de barras que muestra que el sistema de suicidio basado en *I-Ceul* reduce las contaminaciones de células precursoras entre minicélulas purificadas.

5 La figura 7 es un gel de SDS-PAGE teñido con plata que muestra que la delección del gen *msbb* en *S. typhimurium* cambia los perfiles de LPS.

La figura 8 es un gráfico de barras que muestra que la delección de *msbb* causa que células de tipo macrófago de ratón J774.A1 produzcan niveles inferiores de factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) frente a LPS de *S. typhimurium*.

10 La figura 9 muestra la secuencia de reconocimiento de ADN monocatenaria para I-Ceul y el sitio de escisión de ADN bicatenario para I-Ceul.

Descripción detallada

Definiciones

15 La expresión "gen de división celular" usada en este documento se refiere a un gen que codifica un producto génico que participa en el proceso de división celular. Se han descubierto muchos genes de división celular y se han caracterizado en la técnica. Ejemplos de genes de división celular incluyen, aunque sin limitación, *zipA*, *sula*, *secA*, *dicA*, *dicB*, *dicC*, *dicF*, *ftsA*, *ftsI*, *ftsN*, *ftsK*, *ftsL*, *ftsQ*, *ftsW*, *ftsZ*, *minC*, *minD*, *minE*, *segA*, *ccdB*, *sfiC*, y *ddlB*.

20 El término "transgén" usado en este documento se refiere a un gen o material genético que se ha transferido de forma natural o por cualquiera de varias técnicas de ingeniería genética de un organismo a otro. En algunas realizaciones, el transgén es un segmento de ADN que contiene una secuencia génica que se ha aislado de un organismo y se ha introducido en un organismo diferente. Este segmento no nativo de ADN puede retener la capacidad de producir ARN o proteína en el organismo transgénico, o puede alterar la función normal del código genético del organismo transgénico. En algunas realizaciones, el transgén es una secuencia de ADN construida de forma artificial, independientemente de si contiene una secuencia codificante de gen, que se introduce en un organismo en que no se encontraba previamente el transgén.

30 Como se usa en este documento, un agente se dice que se ha "purificado" si su concentración está aumentada, y/o la concentración de uno o más contaminantes indeseados está disminuida, en una composición respecto a la composición de la cual se ha purificado el agente. La purificación por tanto abarca el enriquecimiento de un agente en una composición y/o el aislamiento de un agente a partir de la misma.

35 El término "dominio" o "dominio proteico" usado en este documento se refiere a una región de una molécula o estructura que comparte características físicas y/o químicas comunes. Ejemplos no limitantes de dominios proteicos incluyen regiones transmembrana hidrófobas o de unión a membrana periférica, regiones enzimáticas globulares o receptores, dominios de interacción proteína-proteína, y/o dominios de unión a ácido nucleico.

40 Los términos "Eubacteria" y "procariota" se usan en este documento según se usan estos términos por los expertos en la materia. El término "eubacteriano" y "procariota" usados en este documento abarcan Eubacterias, incluyendo bacterias tanto Gram-negativas como Gram-positivas, virus de procariotas (por ejemplo, bacteriófagos), y parásitos intracelulares obligados (por ejemplo, *Rickettsia*, *Chlamydia*, etc.).

45 El término "ácido nucleico" usado en este documento se refiere a cualquier conjunto de moléculas diversas de ácido nucleico. Un ácido nucleico puede ser un ADNmc, un ADNbc, un ARNmc, un ARNbc, un ARNt (incluyendo un ARNt de uso infrecuente de codones), un ARNm, un ARN ribosómico (ARNr), un ácido peptidonucleico (PNA), un híbrido ADN:ARN, un oligonucleótido antisentido, una ribozima, o un aptámero.

50 El término "sobreexpresión" usado en este documento se refiere a la expresión de un polipéptido o proteína codificado por un ADN en una célula hospedadora, donde el polipéptido o proteína no está presente de forma normal en la célula hospedadora, o donde el polipéptido o proteína está presente en la célula hospedadora a un nivel mayor que el expresado normalmente a partir del gen endógeno que codifica el polipéptido o proteína.

55 El término "modular" como se usa en este documento significa interactuar con una diana directa o indirectamente para alterar la actividad de la diana para regular un proceso biológico. El modo de "modular" incluye, aunque sin limitación, potenciar la actividad de la diana, inhibir la actividad de la diana, limitar la actividad de la diana, o ampliar la actividad de la diana.

60 Descripción

Las minicélulas eubacterianas son muy adecuadas para servir como vectores de suministro e imágenes dirigidos. Como se obtienen de bacterias que son a menudo patogénicas de forma inherente o patogénicas de forma al menos oportunista, es ventajoso que pueda eliminarse funcionalmente cualquier célula precursora contaminante de una población dada antes de administración sistémica *in vivo*, particularmente si se da por vía intravenosa. Por consiguiente, la formulación de minicélulas deseada sería una en que el recuento de células precursoras vivas

residuales fuera lo más bajo posible cuando las minicélulas se procesan y purifican. Un modo para conseguir esto es introducir un mecanismo de suicidio para eliminar las células precursoras residuales después de que se haya completado la etapa de separación física. El perfil de seguridad potenciada reduce los riesgos de infección y sepsis, disminuye la posibilidad de reversiones genéticas a través de eventos de recombinación con otras bacterias y minimiza los riesgos de eventos de inserción en el hospedador. Se prefiere que se eliminen los marcadores de resistencia a antibióticos del cromosoma bacteriano de la cepa celular precursora productora de minicélulas. La eliminación de marcadores de genes de resistencia a antibióticos en cepas productoras de minicélulas de bacterias es deseable para superar los obstáculos reguladores impuestos por la U.S. Food and Drug Administration (FDA) para uso en seres humanos. La FDA solamente tolerará el uso del marcador génico de resistencia a kanamicina con fines de selección para bacterias o cepas de producción bacteriana donde el producto final es pretendido para uso en seres humanos. Además, la FDA requiere ciertas normas para la certificación de análisis de productos farmacéuticos y la formulación final de minicélulas tendría que cumplir las directrices USP e ICH para pureza, ausencia de agregados y ausencia de materia particular. Por tanto, el procesamiento corriente arriba y corriente abajo del producto farmacéutico tendría que estar bajo las actividades de química, fabricación y control (CMC) de la empresa para la producción de productos farmacéuticos.

La necesidad de mejores metodologías de purificación es un obstáculo al desarrollo de minicélulas obtenidas de bacterias patogénicas. Las realizaciones de la presente invención se refieren a la incorporación y uso de un mecanismo de suicidio genético regulado que, tras exposición a las señales apropiadas, introduce roturas bicatenarias irreparables en los cromosomas de células precursoras productoras de minicélulas que provocan muerte de las células precursoras. La activación del mecanismo de suicidio también aumenta los rendimientos de minicélulas en comparación con otras cepas productoras de minicélulas, y convierte simultáneamente todas las células precursoras productoras de minicélulas en un fenotipo filamentoso irreversible. Por tanto, el mecanismo de suicidio descrito en este documento no está limitado a promover la muerte de células bacterianas precursoras que albergan cromosoma, sino que también puede tener otras acciones multifuncionales que actúan en coordinación para mejorar la producción de minicélulas. En algunas realizaciones, el mecanismo de suicidio multifuncional, el sistema "MSM", descrito en este documento funciona eliminando células precursoras que albergan cromosomas. En algunas realizaciones, el sistema "MSM" descrito en este documento funciona aumentando el rendimiento de minicélulas. En algunas realizaciones, el sistema "MSM" descrito en este documento funciona induciendo un fenotipo filamentoso irreversible exclusivamente por células precursoras para ayudar a la separación de las células precursoras de las minicélulas. En algunas realizaciones, el sistema "MSM" descrito en este documento funciona simultáneamente para (i) eliminar células precursoras que albergan cromosomas, (ii) aumentar el rendimiento de minicélulas y (iii) inducir un fenotipo filamentoso irreversible exclusivamente por las células precursoras para ayudar a la separación de las células precursoras de las minicélulas. Las acciones multifuncionales del sistema MSM pueden mejorar la producción de minicélulas y la pureza usando técnicas descritas en este documento.

Algunas realizaciones se refieren a composiciones y métodos para optimizar el rendimiento y pureza de minicélulas producidas cuando se reduce o elimina la cantidad de células precursoras eubacterianas vivas productoras de minicélulas contaminantes viables por la introducción de un mecanismo de suicidio genético multifuncional, el sistema "MSM", en una línea celular precursora productora de minicélulas. Algunas realizaciones también se refieren al uso del sistema MSM para su uso en aplicaciones de biología sintética.

La presencia de células precursoras vivas contaminantes en una preparación final de minicélulas es problemática especialmente para minicélulas producidas a partir de bacterias patogénicas vivas y patogénicas oportunistas. Las cuestiones de seguridad y CMC relacionadas con bacterias precursoras contaminantes son de preocupación cuando se producen agentes biológicos o medicamentos a partir de bacterias que tienen uso pretendido en seres humanos u otros mamíferos a causa de su capacidad de causar enfermedad, inflamación profunda, y en algunos casos, muerte. Las composiciones y métodos para producir minicélulas bacterianas descritos en este documento no solamente mejoran la producción de minicélulas y la pureza, sino que mejoran simultáneamente el perfil de seguridad de las preparaciones de minicélulas para usos *in vivo* y otros usos. Sin limitarse a los siguientes ejemplos, las aplicaciones *in vivo* de preparaciones de minicélulas de alta pureza y seguras pueden usarse en bioimágenes dirigidas y la prevención y tratamiento terapéutico de uno o más cánceres, trastornos genéticos, y enfermedades infecciosas. Algunas realizaciones de la presente descripción se refieren a la incorporación y uso de un mecanismo MSM genético regulado que, tras exposición a las señales apropiadas introduce daño irreparable en los cromosomas de las células precursoras productoras de minicélulas. El mecanismo de suicidio facilita simultáneamente las técnicas de purificación diseñadas para eliminar mejor las células precursoras viables de las preparaciones de minicélulas pretendidas para su uso en una multitud de aplicaciones de suministro dirigido.

La expresión "mecanismo de suicidio genético regulado" usada en este documento se refiere a un mecanismo donde una célula o un grupo de células se estimula por una fuente conocida y externa para producir un producto o productos génicos que son capaces de dañar de forma irreversible un componente biológicamente esencial o proceso celular de una célula de modo que dicha célula o células ya no sean viables ni capaces de recuperarse de dicho evento. La expresión, mecanismo de suicidio multifuncional, MSM, se refiere al uso del mecanismo de suicidio genético regulado para inducir simultáneamente la producción de minicélulas a alto nivel, la muerte de células precursoras y un fenotipo filamentoso exclusivamente en las células precursora durante la inducción del elemento de suicidio.

La expresión "minicélula dirigida" o "suministro dirigido" usada en este documento se refiere a una composición de minicélulas en que dicha minicélula encapsula una o más moléculas bioactivas de elección y presenta restos de direccionamiento en las superficies externas de las minicélulas ya sean las minicélulas (i) completamente intactas, (ii) protoplastos (membrana externa y pared celular retirada) o, (iii) protoplastos (membrana externa retirada o permeabilizada) de modo que dichos restos se unan específicamente a, se unan por, o en algunos otros modos se reconozcan específicamente y suministren de ese modo, se localicen en, o se agreguen dentro de una célula específica, órgano, o tipo tisular para suministrar los contenidos moleculares de dicha minicélula a dicho tipo de célula, tejido u órgano diana *in vitro* o *in vivo*. Este direccionamiento específico pretende usar las minicélulas para suministrar una carga útil a la célula o tejido diana.

Las aplicaciones de suministro *in vivo* usando minicélulas incluyen, aunque sin limitación, suministro dirigido de fármacos de molécula pequeña bioactivos (sinónimo de biológicamente activo), ácidos nucleicos bioactivos, proteínas bioactivas, y lipopolisacáridos bioactivos para producir un "efecto biológico" (sinónimo de respuesta biológica) en un animal. Los efectos biológicos incluyen, aunque sin limitación, un efecto que elimina la célula diana (por ejemplo, una célula cancerosa), reemplaza un gen que podría ser deficiente o disfuncional dentro de un tipo celular particular al que se dirige, reduce la expresión y/o actividad de una proteína o molécula de señalización que está mal regulada en una o más células diana particulares, reduce o aumenta la secreción de hormonas desde una o más células particulares, reduce o aumenta la secreción de proteínas desde una o más células particulares, estimula una respuesta inmunitaria celular adaptativa contra uno o más antígenos, estimula una respuesta humoral adaptativa contra uno o más antígenos, estimula respuestas inmunitarias tanto humorales como celulares adaptativas a partir de uno o más antígenos, estimula o reprime una o más respuestas inmunitarias innatas; un efecto que impacta positiva o negativamente en un proceso biológico animal; y un efecto que impacta en un proceso biológico en un parásito patógeno, bacteria, virus, u otro microbio patógeno para tratar o prevenir una enfermedad en dicho animal. El elemento biológicamente activo no tiene que ser necesariamente inmunogénico en sí mismo para inducir una reacción inmunológica en el animal hospedador, pero puede provocar indirectamente una respuesta inmunitaria como consecuencia de su actividad biológica.

Las minicélulas eubacterianas tienen una ventaja distinta en el suministro ya que pueden modificarse por ingeniería para dirigir y suministrar moléculas bioactivas a tipos celulares específicos *in vivo*. El direccionamiento puede conseguirse acoplando en la superficie de las minicélulas anticuerpos o derivados de anticuerpos específicos para moléculas superficiales de la célula diana. Como alternativa, el direccionamiento puede conseguirse a través de ingeniería genética de cepas precursoras productoras de minicélulas de modo que las minicélulas que producen expresen y presenten en la membrana externa de la minicélula fragmentos de anticuerpo u otros polipéptidos con afinidad por moléculas superficiales específicas de célula diana. En este último caso, el resto de direccionamiento que recubre la superficie de las minicélulas puede fijarse a la membrana preparando una proteína de fusión quimérica entre un resto de direccionamiento de localización de superficie celular y una secuencia de proteína transmembrana, por ejemplo, IgAP de *Neisseria gonorrhoea* (véase a continuación). Las minicélulas que presentan dichos anticuerpos y restos de direccionamiento en su superficie se usan para abordar tipos celulares específicos *in vivo* para suministrar de forma preferente su carga útil bioactiva al tejido, órgano, y tipo celular diana.

Los anticuerpos, o cualquier parte de los mismos, pretendidos para ayudar en el direccionamiento de minicélulas a un tejido, órgano, y tipo celular específico pueden obtenerse de o ser parte de cualquier inmunoglobulina o subclase o inmunoglobulina, incluyendo, aunque sin limitación, IgA, IgM, IgD, IgG, o IgE. Los anticuerpos de cualquier subclase pretendidos para facilitar la función de direccionamiento de las minicélulas pueden estar "humanizados", aunque puede crearse cualquier anticuerpo de cualquier subclase contra un antígeno específico de célula en cualquier animal que se sabe que genera respuestas de anticuerpo a través de inmunidad adaptativa para conseguir el mismo objetivo. En la naturaleza, se generan anticuerpos de modo que contienen dos brazos diferentes con distintas especificidades por sus antígenos respectivos. Sin limitarse por lo siguiente, un resto de direccionamiento que recubre la superficie de las minicélulas podría obtenerse de una biblioteca de presentación en fagos o podría ser una proteína de fusión quimérica obtenida de un fragmento de receptor extracelular que reconoce un ligando en una célula diana.

Los anticuerpos pueden modificarse por ingeniería para que sean independientemente específicos para diferentes antígenos, de modo que un único anticuerpo esté dirigido a dos antígenos diferentes simultáneamente. Esto se menciona como anticuerpo "biespecífico" o resto de direccionamiento "biespecífico". A modo de ejemplo no limitante, los anticuerpos podrían modificarse por ingeniería para que reconocieran componentes superficiales putativos de una minicélula eubacteriana dada (por ejemplo, antígenos O de LPS) en un Fab' o el otro Fab' del anticuerpo biespecífico puede modificarse por ingeniería para que reconozca un antígeno superficial específico de célula tal como los enumerados a continuación. Adicionalmente, los expertos en la materia reconocen fácilmente que dos anticuerpos diferentes, con especificidades diferentes, pueden unirse de forma no covalente acoplándolos a proteína A/G para formar un derivado de anticuerpo biespecífico capaz de adherirse a la superficie de minicélulas donde un anticuerpo dentro del complejo se adhiere específicamente a la superficie de dicha minicélula y el otro anticuerpo se presenta para reconocer específicamente y "dirigirse" de ese modo a una célula, tejido, o tipo de órgano específico *in vivo*. Asimismo, un experto en la materia reconocerá que dos anticuerpos diferentes, con especificidades diferentes, podrían unirse covalentemente usando una miríada de técnicas de entrecruzamiento para conseguir el mismo efecto.

En algunas realizaciones, las minicélulas se "modifican por ingeniería" genética para expresar y presentar proteínas recombinantes de direccionamiento en sus superficies. Esto se ha conseguido satisfactoriamente en *Salmonella enterica* usando proteínas de fusión que contienen un dominio de anclaje a membrana externa antígeno 43- α fusionado a un fragmento de anticuerpo Fv de cadena sencilla (scFv) con especificidad por Chlam 12 o CTP3. En un estudio similar, células de *E. coli* que expresan y presentan fragmentos de anticuerpo Fv de cadena sencilla dirigido hacia epítomos de Coronavirus fusionados con la proteasa IgA localizada en membrana externa de *Neisseria gonorrhoeae* demostraron neutralizar Coronavirus y prevenir infección *in vitro*. Los mismos tipos de estrategias podrían emplearse para generar y presentar proteínas de fusión dirigidas sobre las superficies de minicélulas. Otras proteínas de membrana externa nativas incluyendo LamB, OmpF, OmpC, OmpA, OmpD, PhoE, PAL, y diversas Flagelinas se han usado como dominios de anclaje a membrana y presentación en miembros de la familia *Enterobacteriaceae* gram-negativos. En líneas generales, podría usarse el mismo enfoque para expresar y presentar fragmentos de anticuerpos sobre la superficie de minicélulas obtenidas de cualquier miembro de la familia *Enterobacteriaceae* o *Bacillaceae* de modo que dichas minicélulas se convirtieran en vehículos de suministro dirigido "específicos" para antígenos presentes en la superficie de tipos de células, tejidos u órganos implicados en diversas indicaciones clínicas. Conseguir este objetivo es cuestión de crear una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión entre una proteína de membrana externa putativa o predicha o secuencia de localización de membrana externa y un anticuerpo derivado de anticuerpo, u otra secuencia polipeptídica con afinidad por una molécula superficial presente en un tipo dado de célula, tejido u órgano.

Otra ventaja en el uso de minicélulas como vehículos de suministro (dirigidos o no dirigidos) es que pueden suministrarse moléculas bioactivas en combinación. Por ejemplo, se ha demostrado que las minicélulas pueden generar de forma satisfactoria respuestas inmunitarias humorales contra un antígeno heterólogo cuando se usan como vehículo de suministro para vacunas de ADN plasmídico. Cuando se usaron minicélulas para suministrar simultáneamente tanto una vacuna de ADN como la proteína correspondiente, se mejoraron enormemente las respuestas humorales tras ello, lo que ilustra los beneficios de la flexibilidad de las minicélulas con respecto a opciones de suministro. De un modo similar, las minicélulas se usan para encapsular y suministrar combinaciones de diferentes tipos de ácido nucleico tan como ADN plasmídico o diversas moléculas de ARN de interferencia antisentido (por ejemplo, ARNhc, ARNip) específicas para diferentes transcritos de ARNm de modo que se silencien varios genes en un único evento de suministro. Las minicélulas también se usan para suministrar dos o más fármacos de molécula pequeña de forma simultánea de modo que se aborden varias dianas intracelulares en un único evento de suministro.

Algunas realizaciones descritas en este documento describen una minicélula eubacteriana dirigida capaz de suministrar varias clases de carga útil bioactiva en concierto o de forma singular donde la preparación final de minicélulas está sustancialmente libre de cualquier célula precursora contaminante viable restante en virtud de los efectos combinados de un mecanismo de suicidio genético inducible aplicado a técnicas convencionales de separación.

1. Producción de minicélulas

Las minicélulas son nanopartículas biológicas encapsuladas en membrana, acromosómicas (≤ 400 nm) que se forman por las bacterias después de una alteración en el aparato normal de división de las células bacterianas. En esencia, las minicélulas son réplicas metabólicamente activas pequeñas de células bacterianas normales con la excepción de que no contienen ADN cromosómico y por tanto no se dividen y no son viables. Aunque las minicélulas no contienen ADN cromosómico, la capacidad de los plásmidos, ARN, proteínas expresadas nativas y/o de forma recombinante, y otros metabolitos han demostrado todos segregarse en minicélulas. Algunos métodos de construcción de cepas bacterianas productoras de minicélulas se analizan en detalle en la solitud de patente de Estados Unidos n.º 10/154,951, presentada el 24 de mayo de 2002.

Las alteraciones en la coordinación entre la replicación de los cromosomas y la división celular conducen a formación de minicélulas desde la región polar de la mayoría de procariotas con forma de bastoncillo. La alteración de la coordinación entre la replicación de los cromosomas y la división celular puede facilitarse a través de la sobreexpresión de algunos de los genes implicados en la formación del septo y la fisión binaria. Como alternativa, pueden producirse minicélulas en cepas que albergan mutaciones en genes que modulan la formación del septo y la fisión binaria. Mecanismos alterados de segregación de cromosomas también pueden conducir a formación de minicélulas como se ha demostrado en muchos procariotas diferentes.

Asimismo, puede conseguirse la producción de minicélulas mediante la sobreexpresión o mutación de genes implicados en la segregación de cromosomas nacientes en células hijas. Por ejemplo, mutaciones en los loci *parC* o *mukB* de *E. coli* han demostrado producir minicélulas. Ambos afectan a las diferentes etapas necesarias en el proceso de segregación de cromosomas en *Enterobacteriaceae*. Al igual que los genes de división celular descritos en este documento, la manipulación de los niveles de tipo silvestre de cualquier gen dado implicado en el proceso de segregación de cromosomas que provoca producción de minicélulas tendrá efectos similares en otros miembros de la familia.

Como los procesos de división celular y replicación de cromosomas son tan críticos para la supervivencia, existe un alto nivel de conservación genética y funcional entre miembros de la familia procariota con respecto a genes responsables de estos procesos. La sobreexpresión o mutación de un gen de división celular capaz de dirigir la producción de minicélulas en un miembro de la familia, puede usarse para producir minicélulas en otra. Por ejemplo, se ha demostrado que la sobreexpresión del gen *FtsZ* de *E. coli* en otros miembros de la familia *Enterobacteriaceae* tales como *Salmonella spp.*, y *Shigella spp.*, así como otros miembros de la clase tales como *Pseudomonas spp.*, provocará niveles similares de producción de minicélulas.

Lo mismo puede demostrarse en cepas productoras de minicélulas basadas en mutación de la familia *Enterobacteriaceae*. Por ejemplo, la delección de locus *min* en cualquier miembro de la familia *Enterobacteriaceae* provoca producción de minicélulas. Los genes de división celular de las *Enterobacteriaceae* en que una mutación puede conducir a formación de minicélulas incluyen, aunque sin limitación los genes *min* (MinCDE). Aunque la producción de minicélulas a partir de cepas mutantes *min* es posible, estas cepas tienen valor comercial limitado en términos de ser cepas de producción. La razón de esto es que cepas con delecciones o mutaciones en los genes *min* fabrican minicélulas a niveles constitutivamente bajos. Esto presenta dos problemas en términos de comercialización y economías de escala. El primero es que los rendimientos de minicélulas a partir de estas cepas son bajos, lo que aumenta el coste de producción. El segundo es que los rendimientos de minicélulas son muy variables con las cepas mutantes y la variabilidad lote a lote tiene enormes impactos sobre los costes variables de producción asociados con el control de calidad de fabricación y garantías de regulación. El uso de las cepas mutantes para producir minicélulas que tengan moléculas biológicamente activas encapsuladas tales como proteínas, ARN, ADN, y otros metabolitos para suministro fabricadas primero por las células precursoras de modo que las minicélulas producidas encapsulen dichas moléculas biológicamente activas es problemático. La aparición de producción de minicélulas en cepas mutantes no puede controlarse y sucede a un nivel bajo de modo que el resultado final es que algunas minicélulas no contendrán moléculas biológicamente activas mientras que otras contendrán cantidades ampliamente variables de moléculas biológicamente activas. Estos inconvenientes cuando se toman en conjunto o por separado restringen en gran medida la posibilidad de usar estas cepas mutantes para producir minicélulas a rendimientos y/o calidades comercialmente viables.

Se prefieren cepas productoras de minicélulas que sobreexpresen genes de división celular ("sobreexpresadoras") sobre cepas basadas en mutación porque el fenotipo de producción de minicélulas es controlable cuando los genes de división celular a sobreexpresarse se colocan bajo el control de un sistema promotor eubacteriano inducible u otro sistema promotor eubacteriano activo de forma condicionada. La producción de minicélulas a partir de cepas que sobreexpresan el gen de división celular *ftsZ* se descubrió por los investigadores que estaban identificando genes de división celular esenciales en *E. coli* usando estudios de complementación basados en plásmido. En estos estudios, el gen *ftsZ* estaba presente en más de 10 copias por célula. Se demostró que la presencia de múltiples copias génicas de *ftsZ* producía minicélulas y células con filamentos extremadamente largos. Finalmente, esta transición al fenotipo filamentoso irreversible impacta negativamente en los rendimientos de minicélulas a partir de cepas que sobreexpresan *ftsZ* a partir de plásmidos de múltiples copias, aunque la cantidad de minicélulas producida aún es mayor que la de cualquier cepa mutante. Ya se ha demostrado que reduciendo la cantidad de copias génicas de *ftsZ* a una única duplicación cromosómica, la cantidad de minicélulas producidas aumenta sobre aquellas cepas en que *ftsZ* está localizado en plásmidos de múltiples copias y que el fenotipo filamentoso es menos profundo. Por tanto, algunas composiciones preferidas son cepas productoras de minicélulas inducibles que sobreexpresan el gen *ftsZ* a partir de una copia duplicada integrada de forma cromosómica de *ftsZ*. El gen *ftsZ* duplicado usado puede suministrarse directamente de la especie de bacteria en que se está modificando por ingeniería el fenotipo de producción de minicélulas y también puede suministrarse a partir de la secuencia génica de *ftsZ* de otra especie de bacteria. A modo de ejemplo no limitante, puede usarse la sobreexpresión del gen *ftsZ* de *Escherichia coli* para general minicélulas a partir de *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*. Las cepas resultantes comprenden el gen *ftsZ* de tipo silvestre y una copia diferente, redundante e inducible del gen *ftsZ* en el cromosoma y el mecanismo o mecanismos de suicidio genético inducible descritos en mayor detalle a continuación.

Este enfoque de fenotipo inducible para la producción de minicélulas tiene varias ventajas diferentes sobre los sistemas mutantes. La primera es que como no hay mutaciones genéticas en estas cepas, no existe presión selectiva durante el crecimiento normal y las células del cultivo mantienen una fisiología muy estable y normal hasta que se induce el fenotipo de minicélulas. El resultado final es que las cepas productoras de minicélulas inducibles son más sanas y más estables, lo que finalmente provoca rendimientos mayores de minicélulas como se muestra en la figura 3. Otra ventaja distinta del uso del enfoque de fenotipo inducible para la producción de minicélulas es en casos en que tienen que usarse minicélulas para suministrar moléculas biológicamente activas tales como proteínas, ARN, ADN, y otros metabolitos que pueden fabricarse por las células precursoras productoras de minicélulas por sí mismas de modo que las minicélulas que se producen encapsulen esas moléculas biológicamente activas. En estos casos, un método preferido es inducir la formación de la molécula o moléculas biológicamente activas dentro de las células precursoras antes de inducir el fenotipo de minicélulas de modo que todas las minicélulas producidas contengan suficientes cantidades de la molécula o moléculas deseadas a encapsularse para suministro. Estas ventajas, cuando se usan en combinación, producen una mayor calidad y cantidad de minicélulas. A modo de ejemplo no limitante, los genes de división que pueden sobreexpresarse para producir minicélulas en la familia *Enterobacteriaceae* incluyen, aunque sin limitación, *FtsZ*, *MinE*, *SulA*, *CcdB*, y *SfiC*. Una composición preferida es tener una o más copias duplicadas de uno o más genes de división celular bajo el control de un promotor inducible

que se integra de forma estable en el cromosoma de una cepa eubacteriana dada. Esta misma estrategia podría realizarse si el casete del gen de división celular inducible estuviera presente en un plásmido, cósmido, cromosoma artificial bacteriano (BAC), bacteriófago recombinante u otra molécula de ADN episómico presente en la célula. También pueden usarse homólogos de estos genes o productos génicos de otros organismos.

El nuevo sistema MSM inducible descrito en este documento aumenta los rendimientos de minicélulas de las cepas de minicélulas inducibles incluso más. La activación del sistema MSM produce aumentos mayores de 10 veces en los rendimientos de minicélulas en comparación con otras cepas que simplemente sobreproducen *ftsZ* para promover la formación de minicélulas (ejemplo 3). Es posible combinar el sistema MSM con las cepas productoras de minicélulas que albergan una o más mutaciones o una o más deleciones en el MinCDE. Una realización preferida es una en que el sistema MSM controla el fenotipo productor de minicélulas inducible, aumenta los rendimientos de minicélulas, provoca daño celular irreparable, y también promueve un fenotipo filamentoso entre la población de células precursoras. Una combinación génica MSM preferida está compuesta por una cepa productora de minicélulas inducible que sobreexpresa *ftsZ* o cualquier homólogo funcional del mismo y la expresión inducible de una endonucleasa buscadora, preferiblemente el gen *I-Ceul* del alga *Chlamydomonas moewusii* como se describe en más detalle a continuación.

Los fenotipos productor de minicélulas y de suicidio de las células precursoras/filamentación que resulta de la activación del sistema MSM inducible no están limitados a la familia *Enterobacteriaceae* pero pueden reproducirse en cualquier bacilo con forma de bastoncillo incluyendo aquellos de origen Gram-negativo y Gram-positivo. Por ejemplo, se han estudiado en gran detalle cepas productoras de minicélulas de *Bacillus subtilis* y otros miembros de *Bacillaceae*. Similares a las cepas productoras de minicélulas dentro de la familia *Enterobacteriaceae*, todas las cepas productoras de minicélulas de la familia *Bacillaceae* son el resultado de mutaciones en o la sobreexpresión de genes implicados en la división celular o el proceso de segregación de cromosomas. Por lo tanto, existen suficientes evidencias para apoyar la idea de que la manipulación de genes conservados implicados en los procesos de división celular o segregación de cromosomas de cualquier familia o género de bacilos con forma de bastoncillo puede ser útil para crear cepas productoras de minicélulas entre otros miembros de la misma familia o género de organismos. Asimismo, y como se demuestra por la tabla 1 (a continuación), la clase de genes útiles en la creación del sistema MSM puede reconocer y destruir los cromosomas de muchas especies bacterianas diferentes gram-negativas y gram-positivas con forma de bastoncillo.

Promotor inducible

Puede usarse un promotor inducible para regular la expresión génica activando o desactivando la transcripción génica en ciertas fases de desarrollo de un organismo. La actividad de estos promotores puede inducirse por la presencia o ausencia de factores bióticos o abióticos.

Los promotores inducibles incluyen, aunque sin limitación, promotores regulados de forma química y promotores regulados de forma física. La actividad transcripcional de promotores incluyendo promotores regulados de forma química puede regularse por la presencia o ausencia de uno o más compuestos químicos. Los compuestos químicos incluyen, aunque sin limitación, moléculas pequeñas, ácidos nucleicos, polipéptidos, y proteínas. Ejemplos no limitantes del compuesto químico son isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG), ramnosa, arabinosa, xilosa, fructosa, melobiosa, tetraciclina, alcohol, esteroides, metal, y otros compuestos. Los promotores regulados de forma física incluyen promotores cuya actividad transcripcional está regulada por la presencia o ausencia de uno o más factores físicos, tales como agua o estrés salino, iluminación, luz u oscuridad, radiación, temperaturas bajas o altas, oxígeno, y nitrógeno.

2. Separación de minicélulas de células precursoras y purificación de minicélulas

Como las minicélulas se obtienen de bacterias que a menudo son patógenicas de forma inherente o al menos patógenicas oportunistas, es ventajoso que se elimine funcionalmente cualquier célula precursora contaminante de una población dada antes de la administración. De forma convencional, las células precursoras vivas se han eliminado a través de medios físicos o medios biológicos.

Los medios físicos incluyen el uso de procedimientos de separación basados en centrifugación, metodologías de filtración, metodologías de cromatografía, gradiente de densidad, inmunoafinidad, inmunoprecipitación o cualquier combinación de las mismas. Aunque son eficaces, cada una tiene sus inconvenientes y ninguna metodología de separación física se ha adaptado completamente a eliminar células precursoras viables de las minicélulas. Finalmente, para producción comercial, las metodologías de filtración o una combinación de las mismas es la técnica más preferible a causa de su simplicidad, viabilidad, bajo coste, y aumento en escala. Sin embargo, los actuales esquemas de filtración están limitados porque muchas células precursoras contaminantes pasan a través de los filtros; y aunque esto puede evitarse, se ve comprometido en la reducción del rendimiento final de minicélulas. Finalmente, el diseño y uso de factores biológicos que influyen en el tamaño de las células precursoras y la viabilidad junto con las metodologías convencionales de filtración producirá la mejor eliminación de células vivas. Como se muestra a continuación, el sistema MSM descrito en este documento permite el desarrollo inducible de células precursoras filamentosas alargadas que pueden separarse más fácilmente de los minicélulas durante la

producción.

La eliminación biológica se consigue por, aunque sin limitación, la lisis preferente de células precursoras, el uso de cepas precursoras auxotróficas, el tratamiento con antibióticos, el tratamiento con radiación UV, la privación de ácido diaminopimélico (DAP), la adsorción selectiva de células precursoras, y el tratamiento con otros agentes que dañan el ADN.

La lisis preferente de células precursoras está mediada normalmente por la inducción del ciclo lítico de un profago lisogénico. En el caso de cepas productoras de minicélulas, lo más útil es usar un profago que sea competente en lisis pero defectuoso en reinfección, de modo que las minicélulas no se infecten posteriormente y se lisen durante la activación del fenotipo lítico. Como alternativa y a modo de ejemplo no limitante, pueden expresarse genes individuales tales como los clasificados como miembros de la familia del gen holin, para conseguir niveles similares de lisis sin las preocupaciones sobre la reinfección inherente al uso de profagos lisogénicos. Ambos enfoques están limitados por el hecho de que el evento de lisis, independientemente del método usado para conseguirlo, expulsa cantidades inaceptables de endotoxina libre al medio. La retirada de dichas cantidades grandes de endotoxina libre consume mucho tiempo, soporta variabilidad lote a lote, y finalmente es prohibitiva en costes.

El uso de cepas auxotróficas genera preocupaciones sobre la revisión y por tanto puede usarse solamente en casos donde las minicélulas se tienen que producir a partir de cepas comensales o no patogénicas de bacterias. Por tanto, su aplicación está limitada con respecto a su uso como método para la eliminación de células precursoras vivas en la producción de minicélulas.

El tratamiento de preparaciones de minicélulas con antibióticos genera preocupaciones acerca del desarrollo de resistencia a antibióticos, especialmente cuando se preparan minicélulas a partir de cepas precursoras patogénicas o patogénicas oportunistas. Los asuntos de regulación y los costes también pueden ser de gran preocupación cuando se usan antibióticos para eliminar células precursoras de una serie dada de producción de minicélulas.

El tratamiento con irradiación UV puede ser útil en la eliminación de células precursoras vivas en una serie de producción de minicélulas con la excepción del hecho de que la irradiación con UV es aleatoria y provoca alta variabilidad de un lote a otro. Además, este método no se prefiere cuando se usan minicélulas para suministrar ácidos nucleicos terapéuticos o profilácticos ya que la irradiación con UV no discrimina cuando daña aleatoriamente los ácidos nucleicos. Por ejemplo, un ADN plasmídico también podría ser muy susceptible a daño en el ADN por irradiación UV y puede volverse ineficaz aunque aún se suministre de forma eficaz por las minicélulas.

La privación de DAP puede ser útil en la eliminación de células precursoras vivas con la excepción de que ese enfoque está limitado por la cantidad de especies en que puede usarse. En otras palabras, no todas las especies de células precursoras capaces de producir minicélulas requieren DAP para la supervivencia, en cuyo caso este enfoque no tiene consecuencias. La reversión de las cepas dependientes de DAP también es una preocupación con este enfoque.

Las metodologías de adsorción selectiva aún tienen que explorarse con respecto a la purificación de minicélulas de células precursoras viables. La adsorción selectiva se define como cualquier proceso en que las células precursoras se adsorban de forma preferente a un sustrato en virtud de su afinidad por su sustrato. A modo de ejemplo no limitante, pueden explotarse interacciones proteína-proteína de alta afinidad para este uso. A modo de ejemplo no limitante, la proteína de membrana externa Invasina de la especie gram-negativa *Yersinia pseudotuberculosis* tiene una alta afinidad por motivos RGD incluidos en la secuencia proteica de Beta-integrinas. El gen que codifica la invasina bajo el control de un promotor inducible podría introducirse fácilmente en una cepa productora de minicélulas. Las minicélulas pueden producirse a partir de esta cepa antes de la activación de la expresión del gen de invasina de modo que las minicélulas producidas no expresen o presenten invasina sobre su superficie celular. Una vez producida la cantidad deseada de minicélulas a partir de dicha cepa, a las células viables dentro del cultivo se les podría dar la señal para producir la proteína invasina de modo que la invasina se exprese solamente y presente en células viables. Una vez expresada la invasina sobre la superficie de células precursoras viables, puede adsorberse fácilmente a un sustrato recubierto con Beta-integrinas o motivos RGD incluidos en un polipéptido sintético u otra proteína recombinante. Una vez absorbida, las minicélulas pueden purificarse selectivamente de las células precursoras viables por varios medios diferentes dependientes del tipo de sustrato usado. Los sustratos incluyen, aunque sin limitación, columnas cromatográficas en fase sólida usadas en aplicaciones de filtración por gravedad, perlas magnéticas, columnas de intercambio iónico, o columnas de HPLC. Este enfoque está limitado por la desventaja de que ninguna interacción proteína-proteína individual funcionará para todas las especies de células precursoras productoras de minicélulas. Por ejemplo, el enfoque de invasina-integrina descrito anteriormente sería útil para la mayoría de los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* Gram-negativos pero no para su uso con miembros de la familia *Bacillaceae* Gram-positivos productores de minicélulas.

El uso del fenotipo filamentosos mencionado previamente de cepas precursoras productoras de minicélulas presenta una ventaja muy distinta en términos de asistencia en tecnologías convencionales de separación física basadas en tamaño tales como filtración porque aumenta preferentemente el tamaño de las células vivas contaminantes desde una longitud de ~1 μM hasta longitudes de ~10-15 μM . Las minicélulas, sin embargo, permanecen en su tamaño

típico de ~400 nM. La disparidad aumentada en el tamaño entre las minicélulas y células precursoras filamentosas simplifica enormemente y obvia los esquemas de filtración como método preferido de eliminación de células precursoras viables. La filamentación puede inducirse en eubacterias con forma de bastoncillo por varios medios y el más común incluye conferir estrés fisiológico a las células mediante la adición de altas concentraciones de sales o aumentando o disminuyendo el pH del cultivo, la sobreexpresión de genes de división celular (tales como los genes *fts* como se ha descrito anteriormente), y la inducción de la respuesta SOS. La inducción de la respuesta a estrés SOS en bacterias normalmente se induce mediante la introducción de daño cromosómico significativo aunque otros mecanismos han demostrado funcionar. El problema con la aplicación de estrés fisiológico a un cultivo de células para inducir filamentación es que no todas las células dentro de la población responden de forma igual al estrés, lo que conduce a variaciones en el tamaño que varía de células precursoras que no se ven afectadas en absoluto a aquellas células que están parcialmente filamentadas hasta aquellas que están completamente filamentadas. Esta respuesta desigual entre la población limita este enfoque con respecto a la reproducibilidad entre series de purificación. Lo mismo es cierto para la inducción de la respuesta a SOS mediante la adición de un agente exógeno que daña el ADN porque no todas las células en la población responderán de forma igual al agente y producirán filamentos.

Dadas todas las limitaciones de los enfoques biológicos enumerados anteriormente, existe una gran necesidad de desarrollar un método universalmente fiable y eficaz para eliminar las células precursoras productoras de minicélulas viables para mejorar el perfil de seguridad de las minicélulas para aplicaciones *in vivo*. Para este fin, las realizaciones de la presente invención abordan esta necesidad y proporcionan métodos capaces de dañar de forma irreparable los cromosomas de células precursoras productoras de minicélulas viables mediante el uso de un mecanismo de suicidio genético regulado no descrito previamente. La activación del mecanismo de suicidio genético elimina simultánea e irreversiblemente las células induciendo al mismo tiempo un fenotipo filamentosamente útil para ayudar en las técnicas convencionales de separación basadas en filtración de minicélulas de las células precursoras contaminantes vivas.

Un modo preferido y nuevo para asegurar que todas las células productoras de minicélulas precursoras viables de una población quedarán uniformemente filamentosas es modificar por ingeniería genética en el cromosoma de cepas productoras de minicélulas un gen o conjunto de genes bajo el control de un promotor inducible que tras la activación con un inductor causará filamentación que se consigue con el sistema MSM descrito en este documento (ejemplo 4). Se determinó que la activación del mecanismo de suicidio genético (MSM) descrito en este documento causa profunda filamentación (ejemplo 4). Por tanto, las realizaciones de la presente invención superan las cuestiones de uniformidad presentes con otros enfoques para filamentación asegurando que cualquier célula viable (una célula con un cromosoma) quede filamentada a voluntad. Es deseable evitar los problemas de expresión del mecanismo de suicidio asociados con la captación de inductor y otros factores fisiológicos que afectan a las actividades del promotor para asegurar que todas las células en una población dada sufrirán suicidio cuando se les da las señales apropiadas. Para eliminar insuficientes actividades promotoras y asegurar que cada célula dentro de la población quedará filamentada, un sistema promotor preferido para activar el mecanismo de suicidio genético está termorregulado, tal como el usado por el sistema promotor CI857ts. Algunas realizaciones comprenden una cepa bacteriana gram-negativa o gram-positiva que contiene un ácido nucleico que comprende adicionalmente un gen que codifica un gen productor de minicélulas (preferiblemente *FtsZ*) que está unido de forma funcional a señales de expresión procariotas inducibles, y un segundo ácido nucleico que comprende un gen que codifica un gen suicida que no lisa las células precursoras (preferiblemente la endonucleasa buscadora *I-Ceul*) que está unido de forma funcional a señales de expresión procariotas inducibles (preferiblemente CI857ts). Las señales procariotas de expresión ligadas al gen productor de minicélulas y el gen de suicidio pueden estar bajo el control de las mismas señales procariotas de expresión o diferentes señales procariotas de expresión. Además, el gen productor de minicélulas y el gen suicida pueden estar localizados en el mismo ácido nucleico o diferentes ácidos nucleicos dentro de una célula, uno de los cuales puede ser un ácido nucleico episómico (por ejemplo, plásmido). En algunas realizaciones, el gen productor de minicélulas y el gen suicida están unidos de forma funcional en una fusión transcripcional (es decir, en el mismo transcrito de ARNm) y bajo el control de señales comunes de expresión procariota inducible. Tanto el gen productor de minicélulas como el gen suicida pueden estar localizados en más de una copia de gen por célula.

En algunas realizaciones, las minicélulas se separan sustancialmente de las células precursoras productoras de minicélulas en una composición que comprende minicélulas. Después de la separación, las composiciones que comprenden las minicélulas están al menos aproximadamente un 99,9 %, 99,5 %, 99 %, 98 %, 97 %, 96 %, 95 %, 94 %, 93 %, 92 %, 91 %, 90 %, 89 %, 88 %, 87 %, 86 %, 85 %, 84 %, 83 %, 82 %, 81 %, 80 %, 79 %, 78 %, 77 %, 76 %, 75 %, 74 %, 73 %, 72 %, 71 %, 70 %, 65 %, 60 %, 55 %, 50 %, 45 %, 40 %, 35 % o 30 % libres de células precursoras productoras de minicélulas.

3. Métodos para inducir daño cromosómico irreparable

El concepto de que cantidades irreparables de daño al cromosoma de una célula dada provocará muerte celular irreversible se ha ilustrado mejor mediante el uso de irradiación UV. La irradiación UV causa la formación de dímeros de timina entre nucleótidos adyacentes de timina en una molécula dada de ADN. Si la cantidad de dímeros de timina alcanza un nivel umbral donde están disponibles cantidades insuficientes de las proteínas implicadas en la

reparación del ADN de estos aductos, la célula efectivamente morirá. Sin embargo, como se ha mencionado anteriormente, este enfoque está muy limitado a causa de su ausencia de especificidad entre los sitios de formación de aductos dentro del cromosoma, sus efectos no sesgados sobre todos los tipos de ácido nucleico, y la variabilidad independiente del tiempo de exposición.

El daño irreparable al cromosoma también puede conseguirse mediante la sobreexpresión de endonucleasas. Las endonucleasas pueden escindir ADN bicatenario en sitios de escisión específicos de secuencia. La escisión puede provocar productos de escisión con extremo romo o escalonado dependientes de la enzima de restricción empleada.

4. Gen I-Ceul de *Chlamydomonas moewusii*

La enzima de restricción I-Ceul codificada por el ADN de cloroplastos (SEQ ID NO: 1) del alga *Chlamydomonas moewusii* es particularmente útil para introducir daño irreparable al cromosoma de una amplia gama de cepas precursoras productoras de minicélulas eubacterianas. I-Ceul pertenece a una familia única de enzimas de restricción Tipo I codificadas por intrones habitualmente conocidas como endonucleasas buscadora. La enzima de restricción buscadora I-Ceul escinde específicamente dentro de la secuencia conservada de 15-19 pares de bases de los sitios del operón *rrn* (SEQ ID NO: 2) del ARN ribosómico 23S (ARNr). Como las secuencias del ARNr 23S están tan conservadas entre las eubacterias, I-Ceul puede usarse para introducir daño cromosómico irreparable entre una amplia gama de especies de células precursoras productoras de minicélulas. Los sitios del ARNr 23S están localizados en cualquier parte de 4-10 posiciones distintas en la mayoría de eubacterias (véase la tabla 1), un intervalo de sitios que soportaría el daño irreparable. Normalmente, ningún sitio de ARNr 23S está localizado dentro de la secuencia de moléculas de ADN plasmídico comunes y por tanto I-Ceul puede usarse para eliminar células precursoras permitiendo al mismo tiempo la propagación y segregación de plásmidos en minicélulas con la intención de suministrarlas como carga útil terapéutica o profiláctica. Además, la endonucleasa buscadora I-Ceul funciona de forma más eficaz a 42-47 °C, haciendo de este modo que sea adecuada de forma exclusiva para su uso con un sistema promotor termorregulado tal como el sistema promotor CI857ts del fago lambda. El sistema promotor CI857ts se inactiva a temperaturas por debajo de 39 °C y cuando se cambia a 42-45 °C se vuelve extraordinariamente muy activo lo que permite una exposición rápida, prolongada y uniforme de cada célula precursora productora de minicélulas dentro del cultivo a I-Ceul. La activación de este sistema promotor es en gran medida independiente de muchos factores fisiológicos prohibitivos tales como la captación de inductor.

TABLA 1. Lista de sitios de reconocimiento de I-Ceul dentro de diferentes genomas eubacterianos

Bacteria	Sitios de reconocimiento	Número ATCC
<i>Escherichia coli</i> K12 MG1655	7	ATCC 47076
<i>Escherichia coli</i> W3110	7	ATCC 27325
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 cepa Sakai	7	ATCC BAA-460
<i>Shigella dysenteriae</i> Sd197	7	N/A
<i>Shigella flexneri</i> 2a cepa 2457T	7	ATCC 700930
<i>Shigella boydii</i> Sb227	7	N/A
<i>Shigella sonnei</i> Ss046	7	N/A
<i>Salmonella enterica</i> serovar. <i>Typhi</i> Ty2	7	ATCC 700931
<i>Salmonella enterica</i> serovar. <i>Typhimurium</i> LT2	7	ATCC 700720
<i>Salmonella enterica</i> subespecie <i>Enterica</i> serovar. <i>Choleraesuis</i> cepa SC-B67	7	N/A
<i>Salmonella enterica</i> subespecie <i>Enterica</i> serovar. <i>Paratyphi A</i>	7	ATCC 9150
<i>Salmonella enterica</i> subespecie <i>Enterica</i> serovar. <i>Paratyphi B</i> cepa SPB7	7	ATCC BAA-1250
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA7	4	N/A
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	4	ATCC 15692
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> UCBPP-PA 14	4	N/A
<i>Pseudomonas entomophila</i> cepa L48	7	N/A
<i>Pseudomonas putida</i> F1	6	ATCC 700007
<i>Pseudomonas stutzeri</i> A1501	4	N/A
<i>Vibrio cholerae</i> 0395 cromosoma 2	8	ATCC 39541
<i>Vibrio cholerae</i> O1 biovar. <i>eltor</i> cepa N16961 cromosoma 1	7	ATCC 39315
<i>Yersinia pestis</i> Angola	7	N/A
<i>Neisseria meningitidis</i> MC58	4	ATCC BAA-335
<i>Neisseria meningitidis</i> serogrupo C FAM18	4	ATCC 700532

<i>Neisseria gonorrhoeae</i> FA1090	4	ATCC 700825
<i>Listeria monocytogenes</i> cepa EGDe	6	ATCC BAA-679
<i>Legionella pneumophila</i> subespecie <i>pneumophila</i> cepa Philadelphia 1	3	ATCC 33152
<i>Staphylococcus aureus</i> subespecie <i>aureus</i> cepa MRSA252	5	N/A
<i>Staphylococcus aureus</i> subespecie <i>aureus</i> Mu3	5	ATCC 700698
<i>Staphylococcus epidermidis</i> FDA cepa PCI 1200	5	ATCC 12228
<i>Streptococcus pyogenes</i> M1 GAS	6	ATCC 700294
<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6	4	ATCC BAA-255
<i>Enterococcus faecalis</i> V583	4	ATCC 700802
<i>Clostridium botulinum</i> A cepa ATCC 19397	8	ATCC 19397
<i>Clostridium botulinum</i> A cepa ATCC 3502	9	ATCC 3502
<i>Clostridium difficile</i> 630	11	ATCC BAA-1382

Originalmente se aisló I-Ceul de *Chlamydomonas moewusii* para digerir moléculas de ADN cromosómico eubacteriano purificado para análisis de genoma por electroforesis en gel de campo pulsado. Está disponible en el mercado para uso de investigación y se ha explotado durante años por los microbiólogos que estudian las ordenaciones de los genomas, reordenamientos genómicos, la realización de clonación BAC, y la realización de otros análisis de ADN cromosómico eubacteriano. I-Ceul y sus miembros de la familia de Tipo I son únicos porque no se ven afectados por diferentes patrones de metilación del ADN que puede variar enormemente entre las eubacterias. Por tanto, I-Ceul puede usarse en una amplia gama de diferentes cepas precursoras productoras de minicélulas. A modo de ejemplo no limitante, I-Ceul se ha usado *in vitro* para analizar los genomas de *Salmonella*, *Shigella*, *E. coli*, *Pseudomonas spp.*, *Aeromonas spp.*, *Clostridium spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Bacillus spp.*, y *Neisseria spp.*, todos con eficacia equivalente.

Además, I-Ceul es un miembro de la subfamilia de endonucleasas buscadoras conocida como la familia LAGLIDADG. Los miembros de esta familia ascienden a más de 100 y todos contienen el motivo de secuencia de aminoácidos conservado LAGLIDADG que sirve como interfaz de interacción de homodímeros así como la formación y función del sitio activo.

I-Ceul y las otras enzimas de restricción de Tipo I no son tan rigurosas como las endonucleasas de restricción de Tipo II más típicas con respecto a la secuencia en la que reconocen y realizan sus reacciones respectivas de escisión. Aunque algunas bases dentro de la secuencia de 15-19 pares de bases son esenciales para la escisión, otras son prescindibles. Por tanto, ciertas variaciones en la secuencia de 15-19 pares de bases podrían modificarse por ingeniería de modo que difirieran en secuencia en bases no críticas pero aún fueran sitios funcionales de escisión. Dichos sitios podrían modificarse por ingeniería e introducirse en el cromosoma o cromosomas de cepas precursoras productoras de minicélulas tal cual. Estos sitios de escisión modificados también servirían como dianas reconocidas por I-Ceul *in vivo* o *in vitro* y podrían usarse para introducir daño irreparable al cromosoma.

5. El uso de equivalentes funcionales de I-Ceul

Como se ha mencionado previamente, el gen I-Ceul de *Chlamydomonas moewusii* es un miembro de una subclase de endonucleasas buscadoras conocida como la familia LAGLIDADG. Por tanto, algunas realizaciones incluyen la construcción y utilización de un mecanismo de suicidio genético similar utilizando uno de los otros miembros de la familia de la endonucleasa constitutiva LAGLIDADG. Los miembros de LAGLIDADG que pueden sustituirse por I-Ceul incluyen, aunque sin limitación, PI-Scel, I-Chul, I-Cpal, I-Scelll, I-Crel, I-Msol, I-Scell, I-ScelV, I-Csml, I-Dmol, I-Port, PI-TIill, PI-TIill, y PI-Scpl.

Otra subfamilia de endonucleasas buscadoras de Tipo I se llama familia GIY-YIG. Los miembros de esta familia, incluyen, aunque sin limitación, la endonucleasa del bacteriófago T4 I-TevI, Am atpasa-6, y SegA.

Otra subfamilia más de endonucleasas buscadoras de Tipo I se llama la familia H-N-H y sus miembros incluyen, aunque sin limitación, Eco CoE8, Eco CoE9, Eco CoE2, Eco Mcr, I-Hmul, I-TevIII, Cpc1 gpII, Cpc2 gpII, Avi gpII, Sob gpII, y Sce gpII.

La última subfamilia de endonucleasas buscadoras de Tipo I se llama la familia de caja His-Cys y sus miembros incluyen, aunque sin limitación, I-Dirl, I-Naal, y I-Ppol.

Todas y cada una de las 4 clases de endonucleasas buscadoras y sus respectivas secuencias diana de ADN o variantes funcionales de las mismas pueden usarse para construir un sistema de suicidio genético regulado descrito en este documento para su uso en la eliminación de células precursoras viables contaminantes de las minicélulas.

6. La sobreexpresión de *ftsZ* en combinación con la activación del mecanismo de suicidio genético respeta las cepas productoras de micicélulas de alto rendimiento

Como se muestra en la figura 3, la activación simultánea de I-Ceul y la inducción del fenotipo productor de micicélulas funcionaba en concierto para obtener efectos positivos sobre la producción y rendimiento de micicélulas así como una viabilidad disminuida y filamentación de células precursoras contaminantes. El ejemplo 3 muestra cepas productoras de micicélulas de alto rendimiento ya que la cantidad de micicélulas producidas aumentaba 10 veces cuando se sobreexpresaban simultáneamente *ftsZ* y I-Ceul. Las cepas productoras de micicélulas de alto rendimiento se definieron como aquellas que generaban 10^9 o más micicélulas a partir de un cultivo de partida de 100 ml. Además de generar altos rendimientos de micicélulas, las células precursoras se volvían uniformemente filamentosas tras la activación de los genes I-Ceul y *ftsZ* como se muestra en la figura 4. El fenotipo filamentososo resultante es un factor que se explota para facilitar mejor los esquemas de purificación de micicélulas basados en filtración.

7. Recombinación homóloga y otras rutas de reparación del daño del ADN

Las rutas de recombinación homóloga en eubacterias están muy conservadas en términos de función y mecanismo de acción. Esencialmente, la recombinación homóloga de ADN está mediada por la introducción de una rotura bicatenaria en ADN dúplex seguido por actividad exonucleasa 5' a 3' que crea salientes de ADN monocatenario a usarse en un proceso dependiente de enzima conocido como invasión de hebra. Durante la invasión de hebra, las regiones homólogas de dos moléculas de ADN dúplex diferentes forman apareamiento de bases entre sí. La síntesis de nuevo ADN reemplaza la región o regiones degradadas por exonucleasas y el resultado es una estructura de ADN heterodúplex de 4 brazos de vida corta llamada unión Holliday. La unión Holliday se somete a un proceso dependiente de helicasa conocido como migración de ramificación donde el centro de la estructura de ADN heterodúplex puede desplazarse desde su posición original hasta cualquier otra posición a lo largo de la longitud de cualquiera de los 4 brazos de la unión Holliday. Una vez estabilizada, la unión Holliday heterodúplex se "resuelve" por enzimas llamadas resolvasas y se producen dos moléculas de ADN dúplex diferentes. En algunos casos, se transfieren cantidades significativas de ADN desde una molécula de ADN a otra, de ahí el término recombinación.

Se sabe que, en algunos casos, la reparación de la rotura bicatenaria está mediada a través de las rutas de recombinación homóloga de eubacterias. Como se ha indicado previamente, I-Ceul y los otros miembros de la familia de endonucleasa buscadora de Tipo I introducen roturas bicatenarias y dichas roturas se someten a reparación por recombinación homóloga. Por tanto, la eliminación de la capacidad de la célula de realizar recombinación homóloga también elimina la posibilidad de que las roturas bicatenarias introducidas por un miembro de la familia de endonucleasa buscadora de Tipo I se reparen. La reparación del cromosoma es esencial para la recuperación en el caso de roturas bicatenarias y, por tanto, el uso de mutantes nulos o condicionales para la ruta de recombinación homóloga junto con dicho mecanismo de suicidio genético sería de gran beneficio en la reducción de células precursoras productoras de micicélulas contaminantes viables. Algunas realizaciones proporcionan el uso de rutas de recombinación y reparación de daño del ADN para evitar que las células que contienen el mecanismo de suicidio genético reparen cualquier lesión cromosómica introducida como resultado de la activación del mecanismo de suicidio.

En la familia de eubacterias *Enterobacteriaceae*, los genes implicados en recombinación homóloga o cualquier etapa del proceso descrito en este documento que pueden mutarse, inactivarse, hacer que se expresen de forma condicional, o modificarse de cualquier modo para ayudar en la eliminación de células precursoras productoras de micicélulas contaminantes viables tras la activación del mecanismo de suicidio genético incluyen, aunque sin limitación, *recA*, *recBCD*, *uvrABC*, *lexA*, *recN*, *recQ*, *recR*, *ruv*, *gyrAB*, *helD*, *lig*, *polA*, *ssb*, *recO*, *mutH*, *mutL*, *mutS*, *topA*, *uvrD*, *xseA*, *srfA*, *recF*, *recJ*, *recE*, *recT*, *rusA*, *dam*, *dut*, *xth*, o *rdgB*. Cualquier homólogo de dichos genes puede alterarse en otros géneros y familias eubacterianas diferentes.

Las mutaciones que afectan a la expresión de estos genes pueden presentarse de forma individual o en combinación entre sí. Los niveles de transcripción de dicho gen o genes pueden verse afectados por delección cromosómica, alteración del promotor, remplazo del promotor, modificación del promotor, o interferencia del promotor mediada por ARN. La traducción de dicho gen o genes puede verse afectada por la expresión de ARNm antisentido, ARNh_c, ARNi_p o por modificación de la secuencia de Shine Dalgarno. La función de dicho producto o productos génicos puede verse afectada por la sobreexpresión de una o más versiones negativas dominantes de dicho gen o genes u otros supresores de dicho gen o genes de modo que se altere la función.

Algunas realizaciones proporcionan el remplazo de todos y cada uno de los genes implicados en las rutas de recombinación homóloga y reparación de roturas bicatenarias enumeradas anteriormente con un alelo de dicho gen o genes que es un mutante sensible a temperatura bien caracterizado. En un ejemplo ilustrativo de esto, el producto génico, RecA por ejemplo, funcionaría normalmente a temperaturas por debajo de 39 °C de modo que permitiría el crecimiento normal, fisiología, y producción de micicélulas pero no funcionaría a temperaturas superiores a 39 °C de modo que cuando la temperatura del cultivo productor de micicélulas se cambiara a 42-45 °C para inactivar el gen I-Ceul, las moléculas RecA presentes dentro de la célula serían incapaces de realizar su función o funciones necesarias a un nivel suficiente para ayudar en la reparación de lesiones cromosómicas bicatenarias. Este enfoque

facilita la eliminación eficaz de I-Ceul proporcionando al mismo tiempo otro nivel de garantía en la eliminación de células precursoras productoras de minicélulas viables no proporcionando a la célula ningún mecanismo de reparación.

5 En algunas realizaciones, la copia de tipo silvestre de gen *lexA* se reemplaza con un alelo mutante deficiente en escisión. La proteína LexA es un regulador global de los genes de respuesta a SOS en eubacterias y actúa como represor para genes dentro de ese regulón por ocupación yuxtapuesta de los sitios de inicio de la transcripción dentro de las regiones promotoras de los genes de respuesta a SOS. Por tanto, cuando el represor de LexA se une a las regiones promotoras de los genes de respuesta a SOS, los genes se inactivan como resultado de la inaccessibilidad del factor de transcripción debido a la impedancia estérica mediada por LexA. En el caso de que las células se sometan a estrés tal como el proporcionado cuando se introducen roturas en ADN cromosómico bicatenario, LexA se escinde. Como resultado de la escisión, LexA ya no puede unirse y reprimir la actividad de los genes de respuesta a SOS. La escisión puede suceder a través de dos mecanismos. El primero es escisión mediado por RecA que se estimula por la actividad de las proteínas RecA en presencia de ADN monocatenario. Se produce ADN monocatenario por el complejo de exonucleasa RecBCD como secuencia muy próxima de eventos inmediatamente después de la introducción de roturas cromosómicas bicatenarias. El segundo mecanismo se llama "autoescisión" y sucede de forma espontánea en una reacción intramolecular en respuesta a cambios en la temperatura o pH. Ambos mecanismos de escisión dependen de la actividad serina proteasa mediada por el resto de serina en la posición del aminoácido 119 (S-119) y el resto de lisina en la posición del aminoácido 156 (L-156). La escisión sucede entre el resto de alanina en la posición del aminoácido 84 (A-84) y el resto de glicina adyacente en la posición de aminoácido 85 (G-85). El alelo mutante deficiente en escisión bien caracterizado del gen *LexA* llamado *LexA3* y su equivalente *LexA33* puede usarse con algunas realizaciones de la presente invención.

8. Minicélulas de direccionamiento

25 Después de la producción, actividad del mecanismo del suicidio genético, y posterior purificación, las minicélulas se usan como vehículos de suministro dirigido. Las minicélulas que presentan anticuerpos, derivados de anticuerpo y otros restos de direccionamiento sobre sus superficies se usan para dirigirse a tipos celulares específicos *in vivo* para suministrar de forma preferente sus cargas útiles bioactivas al tipo de tejido, órgano, y célula diana.

30 Los anticuerpos, o cualquier parte de los mismos, pretendidos para ayudar en el direccionamiento de minicélulas a un tipo de tejido, órgano, y célula específico pueden obtenerse o ser parte de cualquier subclase de inmunoglobulina incluyendo, aunque sin limitación, IgA, IgM, IgD, IgG, o IgE. Los anticuerpos de cualquier subclase pretendidos para facilitar la función de direccionamiento de minicélulas pueden "humanizarse", aunque cualquier anticuerpo o cualquier subclase contra un antígeno específico de célula pueden generarse en cualquier animal que se sabe que genera respuestas de anticuerpo a través de inmunidad adaptativa para conseguir el mismo objetivo. En la naturaleza, se generan anticuerpos de modo que contengan dos brazos diferentes con distintas especificidades por sus antígenos respectivos.

40 Los anticuerpos pueden modificarse por ingeniería para que sean independientemente específicos para diferentes antígenos, de modo que un único anticuerpo se dirija a dos antígenos diferentes simultáneamente. A modo de ejemplo no limitante, los anticuerpos podrían modificarse por ingeniería para reconocer componentes superficiales putativos de una minicélula eubacteriana dada (por ejemplo, antígenos O de LPS) en un brazo y el otro brazo puede modificarse por ingeniería para que reconozca un antígeno superficial específico de célula. En este enfoque, las moléculas superficiales de la minicélula que serían de uso incluyen, aunque sin limitación, moléculas de origen natural tales como lipopolisacáridos (LPS), proteínas de membrana externa (OMP), proteínas flagelares, proteínas pilus, y porinas. Como alternativa, las cepas precursoras productoras de minicélulas pueden modificarse por ingeniería para que expresen y presenten moléculas proteicas o de LPS sobre sus superficies que no son de origen natural o existen en otros organismos de modo que dicha molécula se reconozca por uno o más brazos de un anticuerpo usado para acoplar anticuerpos de direccionamiento u otros restos de direccionamiento a las superficies de las minicélulas. Por ejemplo, una proteína modificada por ingeniería para que exprese y presente el epítipo FLAG podría diseñarse y utilizarse de modo que un brazo o anticuerpo reconozca el epítipo FLAG y el otro pueda reconocer un antígeno selectivo de célula específico de elección. Adicionalmente, los expertos en la materia reconocen fácilmente que dos anticuerpos diferentes, con especificidades diferentes, pueden unirse de forma no covalente acoplándolos a proteína A/G para formar un derivado de anticuerpo biespecífico capaz de adherirse a la superficie de minicélulas donde un anticuerpo dentro del complejo se adhiere específicamente a la superficie de dicha minicélula y el otro anticuerpo se presenta para reconocer específicamente y de ese modo "dirigirse a" un tipo de célula, tejido, u órgano específico *in vivo*. Asimismo, un experto en la materia reconocerá que dos anticuerpos diferentes, con especificidades diferentes, podrían unirse covalentemente usando una miríada de técnicas de entrecruzamiento para conseguir el mismo efecto. Todos estos enfoques potenciales para el direccionamiento los reconocen fácilmente los expertos en la materia.

65 De forma alternativa y preferible a la adición exógena de anticuerpos y derivados de anticuerpo, las minicélulas pueden "modificarse por ingeniería" para que expresen y presenten proteínas recombinantes de direccionamiento sobre sus superficies creando proteínas de fusión de membrana externa que presentan restos de direccionamiento basados en polipéptido. Esto puede conseguirse usando cualquiera de las proteínas de membrana externa de

bacterias Gram-negativas aunque algunas proteínas de membrana externa o regiones de las mismas son más adecuadas para presentación. Esto se ha conseguido satisfactoriamente en *Salmonella enterica* usando proteínas de fusión que contienen un dominio de anclaje a membrana externa de antígeno 43- α fusionado a un fragmento de anticuerpo FcV de cadena sencilla con especificidad por Chlam 12 o CTP3. En un estudio similar, células de *E. coli* que expresaban y presentaban fragmentos de anticuerpo FcV de cadena sencilla dirigidos hacia epítomos de Coronavirus fusionados a la proteasa de IgA (IgAP) autotransportadora, localizada en membrana externa de *Neisseria gonorrhoeae* demostraron neutralizar Coronavirus y prevenir la infección *in vitro*. Los mismos tipos de estrategias podrían emplearse para generar y presentar proteínas de fusión dirigidas sobre las superficies de minicélulas. Otras proteínas de membrana externa nativas incluyendo LamB, OmpF, OmpC, OmpA, OmpD, PhoE, PAL, y diversas Flagelinas se han usado como dominios de anclaje a membrana y presentación en miembros de la familia de *Enterobacteriaceae* gram-negativos. Generalmente, el mismo enfoque podría usarse para expresar y presentar fragmentos de anticuerpos sobre la superficie de minicélulas derivadas de cualquier miembro de la familia *Enterobacteriaceae* o *Bacillaceae* de modo que dichas minicélulas lleguen a ser vehículos de suministro dirigido "específicos" para antígenos presentes sobre la superficie de tipos de célula, tejido, u órgano implicados en diversas indicaciones clínicas. Un experto en la materia reconocerá que conseguir este objetivo es cuestión de crear una secuencia de ácido nucleico que codifique una proteína de fusión entre una proteína de membrana externa putativa o predicha o una secuencia de localización de membrana externa y un anticuerpo, derivado de anticuerpo, u otra secuencia polipeptídica con afinidad por una molécula superficial presente en un tipo dado de célula, tejido, u órgano.

Una realización preferida para presentar anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, y cualquiera de los otros restos de direccionamiento basados en polipéptido descritos en este documento sobre la superficie de minicélulas es por fusión con una membrana externa de la familia de "autotransportadores". Los autotransportadores monoméricos que pertenecen al sistema de secreción de la subclase de Tipo 5 de autotransportadores (habitualmente clasificados como Tipo 5a) son los más preferidos. De esos autotransportadores clasificados como de Tipo 5a, se prefiere la proteasa de IgA (IgAP) de *Neisseria gonorrhoeae*. El dominio pasajero autotransportador de IgAP se reemplaza fácilmente por cadenas de anticuerpo ligeras y pesadas variables que se espacian por una corta secuencia enlazadora de prolina de 8-10 repeticiones. Las secuencias de cadenas pesadas (VH) y ligeras (VL) variables se identifican fácilmente, se aíslan, secuencian, y clonan a partir de hibridomas de células B o cualquier otra fuente convencional de ADN o ARN recombinante de secuencia de cadena ligera y pesada variable como reconocerá fácilmente un experto en la materia. Varios fragmentos diferentes de anticuerpo y tipos de fragmento de anticuerpo se han presentado y caracterizado usando el sistema IgAP en *E. coli* aunque este enfoque es completamente nuevo con respecto a su uso para abordar tipos de tejidos, órganos, o células junto con el uso en minicélulas. Por tanto, identificando anticuerpo

Un experto en la materia reconocerá que existen otros métodos por los cuales podría conseguirse el direccionamiento de minicélulas a tipos específicos de célula, órgano, o tejido además de la presentación de anticuerpos o derivados de anticuerpo que tienen especificidad por antígenos superficiales específicos de células sobre la superficie de las minicélulas. Uno de dichos métodos es expresar y presentar en la superficie más externa de las minicélulas, polipéptidos no derivados de anticuerpo dirigidos a antígenos específicos de célula. Estos polipéptidos pueden obtenerse, aunque sin limitación, de secuencias de origen natural o partes útiles de las mismas y secuencias obtenidas de forma sintética.

Las secuencias de origen natural incluyen aquellas que son conocidas en la técnica por interactuar con un antígeno de superficie específico de célula. Ejemplos de estos tipos de interacciones incluyen, aunque sin limitación, interacciones de ligando y receptores de origen natural tales como la interacción de VEGF y el receptor de VEGF bien caracterizada. Por ejemplo, los receptores de VEGF presentados sobre las superficies de células endoteliales u otras células podrían abordarse por el recubrimiento de minicélulas con dominios de unión a receptor de la proteína VEGF, proporcionando por tanto un resto de direccionamiento para suministrar minicélulas a células endoteliales. Esto sería una alternativa al uso de un fragmento scFv de un anticuerpo antirreceptor de VEGF como resto de direccionamiento. En algunas realizaciones, las mismas moléculas localizadas en superficie de origen natural de la minicélula enumeradas anteriormente pueden modificarse por ingeniería usando técnicas convencionales de biología molecular para crear proteínas de fusión que resienten la parte o partes de unión de estos ligandos de modo que dichas minicélulas ahora sean capaces de reconocer específicamente, localizar, y suministrar sus cargas útiles respectivas a tipos celulares, tejidos, y órganos específicos de interés.

Las moléculas sintéticas que se unen selectivamente a antígenos de superficie específicos de célula, tales como antígenos de superficie de célula de mamífero, pueden identificarse e incorporarse en algunas realizaciones de la presente invención para servir como restos de direccionamiento. Por ejemplo, las secuencias peptídicas identificadas por biblioteca de presentación en fago pueden clonarse fácilmente como fusiones con cualquier otra proteína de membrana externa de minicélula nativa como se ha descrito anteriormente para servir como moléculas de direccionamiento. Asimismo, pueden acoplarse moléculas sintéticas de direccionamiento a la superficie de minicélulas usando conjugación química convencional o técnicas de entrecruzamiento.

Las células cancerosas, en particular, son muy buscadas entre los tipos celulares que pueden abordarse usando minicélulas. Muchos cánceres presentan variantes de proteínas de superficie celular u otros marcadores de

superficie celular inmunológicamente distinguibles conocidos de forma colectiva como antígenos específicos de tumor o a veces mencionados como antígenos selectivos de tumor (TSA). Muchos anticuerpos que reconocen específicamente TSA, y secuencias de ácido nucleico de las regiones variables de los mismos, ya son conocidos en la técnica. Cualquiera de estos anticuerpos puede usarse de un modo exógeno con la invención o, como alternativa, puede expresarse como una proteína de fusión unida a membrana y presentarse sobre la superficie de la minicélula como se ha descrito anteriormente. Se han identificado muchos TSA para los cuales no hay actualmente disponibles anticuerpos y, por lo tanto, las secuencias de ácido nucleico de las regiones variables de esos anticuerpos. Sin embargo, los métodos para producir anticuerpos contra TSA son bien conocidos en la técnica y los métodos descritos en este documento están diseñados de modo que todos y cada uno de los anticuerpos contra TSA, o cualquier otro antígeno de superficie específico de célula, pueda incorporarse en la composición descrita.

Los antígenos selectivos de tumor incluyen, aunque sin limitación, adipoflina, *AIM-2*, *BCLX(L)*, *BING-4*, *CPSF*, *Ciclina D1*, *DKK1*, *ENAH*, *Ep-CAM*, *EphA3*, *FGF5*, *G250/MN/CAIX*, *HER-2/neu*, *IL-13R alfa 2*, carboxilo esterasa intestinal, alfa-fetoproteína, *M-CSF*, *MCSP*, *mdm-2*, *MMP-2*, *Mum-1*, *p53*, *PBF*, *PRAME*, *PSMA*, *RAGE-1*, *RGS5*, *RNF43*, *RU2AS*, *secemina 1*, *SOX10*, *STEAP1*, *survivina*, *Telomerasa*, *WT1*, *Cdc27*, *CDK4*, *CDKN2a*, *BCR-ABL*, *Barge-1*, *GAGE1-8*, *GnTV*, *HERV-K-MEL*, *KK-LC-1*, *KM-HN-1*, *LAGE-1*, *MAGE-A1*, *MAGE-A2*, *MAGE-A3*, *MAGE-A4*, *MAGE-A6*, *MAGE-A9*, *MAGE-A9*, mucina, *NA-88*, *NY-ESO-1*, *LAGE-2*, *SAGE*, *Sp17*, *SSX-2*, *SSX-4*, *TRAG-3*, y *TRP2-INT2*.

Además de abordar células cancerosas y tumores derivados de las mismas, las realizaciones de la presente invención también abarcan cualquier tipo celular que presente uno o más antígenos selectivos de superficie celular. Por ejemplo, son deseables minicélulas de direccionamiento al páncreas para suministrar fármacos contra la diabetes, o minicélulas de direccionamiento a células dendríticas o cualquier subclase de las mismas para suministrar proteínas, carbohidratos, o ácidos nucleicos que codifiquen antígenos para su uso en el desarrollo de vacunas o regulación de la inmunidad innata. Se ha descrito anteriormente un sistema de direccionamiento basado en VEGF para células endoteliales. Asimismo, son deseables minicélulas de direccionamiento para tipos celulares específicos del epitelio de la mucosa, tal como las placas de Peyer del intestino delgado.

9. Tipos de carga útil

Las minicélulas eubacterianas son capaces de encapsular y suministrar varias clases de compuestos biológicamente activos que tienen beneficio terapéutico, profiláctico, o de diagnóstico a un animal. Los tipos de los compuestos biológicamente activos (cargas útiles) que pueden suministrarse por las minicélulas incluyen, aunque sin limitación, moléculas pequeñas, ácidos nucleicos, polipéptidos, radioisótopos, lípidos, lipopolisacáridos, y cualquier combinación de los mismos.

La expresión "molécula pequeña" usada en este documento incluye cualquier resto químico u otro resto que pueda actuar para afectar a los procesos biológicos en un sentido positivo o negativo. Las moléculas pequeñas pueden incluir cualquiera de varios agentes terapéuticos actualmente conocidos y usados, o pueden ser moléculas pequeñas sintetizadas en una biblioteca de dichas moléculas con el fin de detectar una o más funciones biológicas. Las moléculas pequeñas se distinguen de las macromoléculas por el tamaño. Las moléculas pequeñas descritas en este documento habitualmente tienen un peso molecular menor de aproximadamente 5.000 dalton (Da), referiblemente menor de aproximadamente 2.500 Da, más preferiblemente menor de 1.000 Da, mucho más preferiblemente menor de aproximadamente 500 Da.

Las moléculas pequeñas incluyen, sin limitación, compuestos orgánicos, peptidomiméticos y conjugados de los mismos. Como se usa en este documento, la expresión "compuesto orgánico" se refiere a cualquier compuesto basado en carbono diferente a las macromoléculas ácidos nucleicos y polipéptidos. Además de carbono, los compuestos orgánicos pueden contener calcio, cloro, flúor, cobre, hidrogeno, hierro, potasio, nitrógeno, oxígeno, azufre y otros elementos. Un compuesto orgánico puede estar en una forma aromática o alifática. Ejemplos no limitantes de compuestos orgánicos incluyen acetonas, alcoholes, anilinas, carbohidratos, monosacáridos, oligosacáridos, polisacáridos, aminoácidos, nucleósidos, nucleótidos, lípidos, retinoides, esteroides, proteoglicanos, cetonas, aldehídos, grasas saturadas, insaturadas y poliinsaturadas, aceites y grasas, alquenos, ésteres, éteres, tioles, sulfuros, compuestos cíclicos, compuestos heterocíclicos, imidazoles y fenoles. Un compuesto orgánico como se usa en este documento también incluye compuestos orgánicos nitrados y compuestos orgánicos halogenados (por ejemplo, clorados).

"Moléculas pequeñas" pueden ser sintéticas, de origen natural, y pueden estar purificadas de una fuente natural. Las moléculas pequeñas incluyen, aunque sin limitación, fármacos de molécula pequeña y agentes de imágenes de molécula pequeña. Los tipos de fármacos de molécula pequeña incluyen aquellos que previenen, inhiben, estimulan, imitan, o modifican un proceso biológico o bioquímico dentro un tipo de célula, tejido u órgano para el beneficio de un animal que padece una enfermedad, sea somática, germinal, infecciosa, o de otro tipo. Ejemplos de fármacos incluyen agentes quimioterapéuticos (fármacos contra el cáncer), antibióticos, antiviricos, antidepresivos, anti-histaminas, anticoagulantes, y cualquier otra clase o subclase de los mismos en enumerados la Physicians Desk Reference. Las moléculas pequeñas también incluyen la clase de moléculas conocida colectivamente como fluoróforos. Las minicélulas que encapsulan fluoróforos y presentan restos de direccionamiento específicos de célula

pueden usarse para imágenes *in vivo* de tipos de células, tejidos, órganos, o tumores en un animal. Los fluoróforos de molécula pequeña incluyen, aunque sin limitación, DAPI, Cybr Gold, Cybr Green, Bromuro de etidio, Alexa Fluor, Texas Red, CFSE, y similares. Los agentes quimioterapéuticos de molécula pequeña pueden dirigirse y suministrarse a tejidos, células, y órganos usando minicélulas que presentan moléculas de direccionamiento. La expresión "agente quimioterapéutico" usada en este documento se refiere a agentes antineoplásicos, anti-metastásicos, anti-angiogénicos, y otros agentes anti-hiperproliferativos. De forma simple, un "agente quimioterapéutico" se refiere a un agente químico pretendido para destruir células y tejidos. Dichos agentes incluyen, aunque sin limitación: (1) agentes que dañan el ADN y agentes que inhiben la síntesis de ADN tales como antraciclinas (doxorubicina, donorrubicina, epirubicina), agentes alquilantes (bendamustina, busulfán, carboplatino, carmustina, cisplatino, clorambucilo, ciclofosfamida, dacarbazina, hexametilmelamina, ifosfamida, lomustina, mecloretamina, melfalán, mitotano, mitomicina, pipobromano, procarbazona, estrepto-zocina, tiotepa, y trietilenmelamina), derivados de platino (cisplatino, carboplatino, cis diaminadichloroplatino), inhibidores de telomerasa y topoisomerasa (Camptosar), (2) agentes que despolimerizan la tubulina tales como taxoides (Paclitaxel, docetaxel, BAY 59-8862), (3) antimetabolitos tales como capecitabina, clorodeoxiadenosina, citarabina (y su forma activada, ara-CMP), arabinósido de citosina, dacarbazina, floxuridina, fludarabina, 5-fluorouracilo, 5-DFUR, gemcitabina, hidroxiurea, 6-mercaptopurina, metotrexato, pentostatina, trimetrexato, y 6-tioguanina (4) agentes anti-angiogénicos (Avastin, talidomida, sunitinib, lenalidomida), agentes de alteración vascular (flavonoides/flavonas, DMXAA, derivados de combretastatina tales como CA4DP, ZD6126, AVE8062A, etc.), (5) agentes biológicos tales como anticuerpos o fragmentos de anticuerpo (Herceptin, Avastin, Panorex, Rituxan, Zevalin, Mylotarg, Campath, Bexar, Erbitux, Lucentis), y (6) terapia endocrina tal como inhibidores de aromatasa (4-hidroandrostendiona, exemestano, aminoglutetimida, anastrozol, letozol), anti-estrógenos (Tamoxifeno, Toremifeno, Raioxifeno, Faslodex), esteroides tales como dexametasona, (7) inmunomoduladores: citoquinas tales como IFN-beta e IL2, inhibidores de integrinas, otras proteínas de adhesión y metaloproteinasas de matriz, (8) inhibidores de la histona desacetilasa, (9) inhibidores de la transducción de señales tales como inhibidores de tirosina quinasas tipo imatinib (Gleevec), (10) inhibidores de proteína de choque térmico, (11) retinoides tales como ácido todo trans-retinoico, (12) inhibidores de receptores del factor de crecimiento o los propios factores de crecimiento, (13) compuestos anti-mitóticos tales como navelbina, Paclitaxel, taxotere, vinblastina, vincristina, vindesina, y vinorelbina, (14) antiinflamatorios tales como inhibidores de COX y (15) reguladores del ciclo celular tales como reguladores de los puntos de control e inhibidores de telomerasa.

Los ácidos nucleicos incluyen ADN y ARN y sus equivalentes estructurales tales como moléculas de ARN o moléculas de ADN que utilizan estructuras de fosfoliato en oposición a las estructuras fosfodiéster de origen natural. Las moléculas de ADN incluyen ADN episómico (no localizado en o parte del cromosoma de la célula hospedadora) e incluyen ADN plasmídico, ADN de cósmido, ADN de bacteriófago, y cromosomas artificiales bacterianos (BAC). Las moléculas de ADN codifican proteínas como se describe por el dogma central de la biología molecular. Por tanto el ADN puede codificar proteínas de cualquier origen, naturales o sintéticas. Asimismo, el ADN puede modificarse por ingeniería para que contenga "secuencias promotoras" que se reconocen por la maquinaria de la célula hospedadora para activar la expresión de dichas proteínas codificadas. Las secuencias promotoras pueden ser específicas de célula, específicas de tejido, o específicas de inductor. Los inductores son señales aplicadas de forma exógena que ayudan a activar dichos promotores para producir dichas proteínas. Los inductores pueden ser de naturaleza química o física. Muchos sistemas promotores son conocidos para los expertos en la materia ya que son las secuencias que los vuelven funcionales. Secuencias de expresión procariotas preferidas incluyen, aunque sin limitación, el sistema pRHA, el sistema pBAD, el sistema de la polimerasa T7, el sistema pLac y su miríada de derivados, el sistema pTet, y el sistema Cl857ts. Los sistemas promotores eucariotas preferidos incluyen, aunque sin limitación, el promotor de CMV, el sistema promotor de SV40, y el sistema promotor de BGH. Los ARN incluyen, aunque sin limitación, ARN mensajero (ARNm), ARN transferente (ARNt), y ARN nucleares pequeños. Muchos ARN, clasificados como ARN antisentido, incluyen, aunque sin limitación, ARN interferentes pequeños (ARNip), ARN de horquilla corta (ARNhc), y ARN antisentido de longitud completa. También se incluyen los microARN.

Las proteínas se componen de polipéptidos y están codificadas por ADN. Las proteínas pueden ser biológicamente funcionales, tales como enzimas o proteínas de señalización. Las proteínas pueden ser estructurales, tal como es el caso de la actina y similares. Las proteínas pueden servir como inmunógenos o pueden servir para otros fines terapéuticos (tales como suministro o restauración enzimática en una célula diana, tejido, órgano, o animal). Las proteínas pueden ayudar a la transferencia intracelular post-endocitosis de otros tipos de carga útil. Por ejemplo, proteínas tales como listeriolisina O de *Listeria monocytogenes* pueden emplearse para facilitar la transferencia de la carga útil de las minicélulas desde el compartimento o compartimentos endocíticos de una célula diana al citosol de una célula diana. Las proteínas también pueden ser enzimas convertidoras de profármacos.

Todos y cada uno de estos tipos de carga útil pueden usarse en combinación o individualmente a discreción del usuario. Un experto en la materia apreciará y reconocerá las combinaciones que tienen que usarse para cada fin.

10. Reducción de la toxicidad de LPS

Las cuestiones de seguridad que rodean a la inmunogenicidad y efectos pirogénicos de los lipopolisacáridos (LPS), un componente constitutivo de la membrana externa de las minicélulas habitualmente mencionado como endotoxina,

se aborda ventajosamente para fomentar la viabilidad comercial de las composiciones de suministro dirigidas basadas en minicélulas. Estas cuestiones de seguridad se abordan ventajosamente además de abordar las cuestiones de seguridad que giran alrededor de la posible contaminación de las composiciones de suministro dirigidas basadas en minicélulas para su uso *in vivo* con células precursoras productoras de minicélulas viables. La molécula o moléculas de LPS están compuestas esencialmente por tres partes. La primera parte es el par de cadenas de hidrocarburo que anclan la molécula a la capa exterior de la membrana exterior que se llaman colectivamente la parte de "Lípido A" de la molécula. La segunda es una serie de restos de azúcar habitualmente mencionada como "núcleo interior". El núcleo interior es diferente de un género a otro pero es idéntico entre los miembros dentro del género. Por ejemplo, *Salmonella* y *Shigella* tienen diferentes estructuras de núcleo interno porque no son miembros del mismo género mientras que *Salmonella typhi* y *Salmonella typhimurium* comparten las mismas estructuras de núcleo interno porque ambas son miembros del género *Salmonella*. El tercer componente de la molécula de LPS, habitualmente llamado el "antígeno O" es una serie de moléculas de azúcar, cuya longitud de cadena, estructura de ramificaciones, secuencia, y composición varía enormemente entre las bacterias, incluso entre miembros del género. Se han identificado y secuenciado muchos genes implicados en la síntesis de lipopolisacáridos. Por ejemplo, los grupos génicos *rfa* contienen muchos de los genes de la síntesis del núcleo de LPS, que incluye al menos 17 genes.

Aunque la molécula de LPS como conjunto es muy pirogénica, el principal contribuyente a la pirogenicidad con respecto a los tres componentes descritos anteriormente, es el componente de lípido A. El componente de lípido A ha demostrado unirse a y activar receptores tipo Toll, una familia de moléculas de señalización presentes sobre la superficie de células de mamífero que ayudan a reconocer patrones moleculares asociados a patógenos específicos (PAMP) de los cuales LPS es un miembro clásico. Los potentes efectos pirogénicos de lípido A están mediados por una parte específica de la molécula de lípido A que comprende un grupo ácido miristólico unido a una de las cadenas de hidrocarburo. En bacterias gram-negativas, este grupo ácido miristólico se añade por un único gen no esencial habitualmente mencionado como *msbB*. Eliminando el gen *msbB*, el componente de ácido miristólico se elimina, y se reduce drásticamente la pirogenicidad de la molécula o moléculas de LPS. Este enfoque se ha explotado para reducir la toxicidad de LPS en serovariantes de *Salmonella* vivas atenuadas que resultan colonizar regiones hipóxicas dentro de tumores como terapia experimental contra el cáncer usada en ensayos clínicos en seres humanos. El mismo gen *msbB* o su equivalente funcional, conduce a toxicidad reducida del LPS incorporado en minicélulas, cuando se deleta de la cepa o cepas productoras de minicélulas precursoras. La toxicidad reducida del LPS ha demostrado provocar la reducción de respuestas inmunitarias proinflamatorias en un hospedador mamífero.

Como se muestra en las FIGURAS 7 y 8, la delección satisfactoria de *msbB* en una cepa de *Salmonella* productora de minicélulas dio lugar a minicélulas con toxicidad reducida medida por la producción de TNF α por macrófagos murinos cultivados expuestos a minicélulas producidas a partir de cepas que albergan mutaciones en *msbB* frente a aquellas minicélulas producidas a partir de cepas de tipo silvestre.

11. Retirada de endotoxina libre

En la mayoría de las aplicaciones *in vivo*, es deseable retirar cualquier endotoxina libre, principalmente en forma de LPS libre, de la composición. En general, la retirada de endotoxinas grandes puede facilitarse por las tecnologías de filtración y metodologías empleadas. Como ejemplo, una etapa de filtración sin salida captura las minicélulas y permite que las moléculas más pequeñas tales como LPS pasen a través del filtro de membrana, eliminando de ese modo de forma eficaz una gran mayoría de endotoxina libre. Es deseable conseguir niveles de endotoxina para aplicaciones *in vivo* que estén en o por debajo de los niveles indicados por la United States Food and Drug Administration (www.fda.gov). Otros enfoques convencionales y bien descritos que pueden usarse en lugar de o junto con la retirada de endotoxinas basada en filtración son diferentes metodologías cromatográficas, inmunocromatográficas, y de inmunoprecipitación. En el caso de métodos de base inmunológica, un método típico es usar un anticuerpo u otro resto que reconozca específicamente y se una a la parte de lípido A de la molécula de LPS. La ventaja en abordar este segmento de la molécula de LPS es doble. La primera ventaja es que el lípido A se expone solamente cuando se libera LPS de la membrana externa de las minicélulas y por tanto crea una desviación selectiva hacia la retirada de solamente endotoxina libre frente a la retirada de minicélulas intactas. En segundo lugar, están disponibles muchos anticuerpos anti-lípido A disponibles en el mercado. El acoplamiento de anticuerpos a una matriz sólida o semisólida tal como una columna o perlas magnéticas tiene la ventaja adicional de que la endotoxina libre puede absorberse o adsorberse de forma fácil y selectiva a la matriz para facilitar mejor la retirada de endotoxina de las composiciones de minicélulas. Los niveles de endotoxina en las preparaciones finales pueden determinarse sedimentando las minicélulas y analizando el sobrenadante para los niveles de endotoxina usando el ensayo cuantitativo de lisado de amebocito limulus (LAL).

12. Composiciones farmacéuticas

Otro aspecto de la presente invención se refiere a composiciones, incluyendo, aunque sin limitación, composiciones farmacéuticas. El término "composición" usado en este documento se refiere a una mezcla que comprende al menos un vehículo, preferiblemente un vehículo fisiológicamente aceptable, y una o más composiciones de minicélulas. El término "vehículo" usado en este documento se refiere a un compuesto químico que inhibe o evita la incorporación

del péptido o péptidos biológicamente activos en las células o tejidos. Un vehículo normalmente es una sustancia inerte que permite que un ingrediente activo se formule o componga en una forma de dosificación adecuada (por ejemplo, una píldora, una cápsula, un gel, una película, un comprimido, una micropartícula (por ejemplo, una microesfera), una solución; una pomada; una pasta, un aerosol, un goteo, un coloide o una emulsión etc.). Un "vehículo fisiológicamente aceptable" es un vehículo adecuado para su uso en condiciones fisiológicas que no anula (reduce, inhibe, o evita) la actividad biológica y propiedades del compuesto. Por ejemplo, el dimetilsulfóxido (DMSO) es un vehículo que facilita la captación de muchos compuestos orgánicos en las células o tejidos de un organismo. Preferiblemente, el vehículo es un vehículo fisiológicamente aceptable, preferiblemente un vehículo farmacéutica o veterinariamente aceptable, en que se dispone la composición de minicélulas.

Una "composición farmacéutica" se refiere a una composición donde el vehículo es un vehículo farmacéuticamente aceptable, mientras que una "composición veterinaria" es una donde el vehículo es un vehículo veterinariamente aceptable. La expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" o "vehículo veterinariamente aceptable" usados en este documento incluyen cualquier medio o material que no sea biológicamente indeseable o indeseable de otro modo, es decir, el vehículo puede administrarse a un organismo junto con una composición de minicélulas sin causar ningún efecto biológico indeseable o interactuar de un modo perjudicial con el complejo o cualquiera de sus componentes o el organismo. Se proporcionan ejemplos de reactivos farmacéuticamente aceptables en The United States Pharmacopeia, The National Formulary, United States Pharmacopeial Convention, Inc., Rockville, Md. 1990.

Las expresiones "cantidad terapéuticamente eficaz" o "cantidad farmacéuticamente eficaz" significan una cantidad suficiente para inducir o lograr una respuesta medible en la célula diana, tejido, o cuerpo de un organismo. Lo que constituye una cantidad terapéuticamente eficaz dependerá de diversos factores, que el facultativo entendido tendrá en cuenta para llegar al régimen deseado de dosificación.

Las composiciones pueden comprender adicionalmente otros componentes químicos, tales como diluyentes y excipientes. Un "diluyente" es un compuesto químico diluido en un disolvente, preferiblemente un disolvente acuoso, que facilita la disolución de la composición en el disolvente, y también servir para estabilizar la forma biológicamente activa de la composición o uno o más de sus componentes. Se utilizan sales disueltas en soluciones tamponadas como diluyentes en la técnica. Por ejemplo, diluyentes preferidos son soluciones tamponadas que contienen una o más sales diferentes. Una solución tamponada preferida es solución salina tamponada con fosfato (particularmente junto con composiciones pretendidas para administración farmacéutica), ya que imita las condiciones salinas de la sangre humana. Como las sales tamponantes no pueden controlar el pH de una solución a bajas concentraciones, un diluyente tamponado raramente modifica la actividad biológica de un péptido biológicamente activo.

Un "excipiente" es cualquier sustancia más o menos inerte que puede añadirse a una composición para conferir una propiedad adecuada, por ejemplo, una consistencia adecuada o para formar un fármaco. Los excipientes y vehículos adecuados incluyen, en particular, cargas tales como azúcar, incluyendo lactosa, sacarosa, manitol, o sorbitol, preparaciones de celulosa tales como, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, agar, pectina, goma xantana, goma guar, goma de garrofin, ácido hialurónico, caseína, almidón de patata, gelatina, goma de tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, poliacrilato, carboximetilcelulosa sódica, y/o polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea, también pueden incluirse agentes disgregantes, tales como polivinilpirrolidona reticulada, agar, o ácido alginico o una sal del mismo tal como alginato sódico. Otros excipientes y vehículos adecuados incluyen hidrogeles, hidrocoloides gelificables, y quitosano. Pueden usarse microesferas y microcápsulas de quitosano como vehículos. Véase el documento WO 98/52547 (que describe formulaciones de microesferas para dirigir compuestos al estómago, comprendiendo las formulaciones un núcleo interior (que incluye opcionalmente un hidrocoloide gelificado) que contiene uno o más ingredientes activos, una membrana compuesta de un polímero insoluble en agua (por ejemplo, etilcelulosa) para controlar la tasa de liberación del ingrediente o ingredientes activos, y una capa externa compuesta por un polímero catiónico bioadhesivo, por ejemplo, un polisacárido catiónico, una proteína catiónica, y/o un polímero catiónico sintético; patente de Estados Unidos n.º 4.895.724. Normalmente, la quitosano se reticula usando un agente adecuado, por ejemplo, glutaraldehído, glioxal, epiclorhidrina, y succinaldehído. Las composiciones que emplean quitosano como vehículo pueden formularse en diversas formas de dosificación, incluyendo píldoras, comprimidos, micropartículas, y microesferas, incluyendo aquellas que proporcionan liberación controlada del ingrediente o ingredientes activos. Otros polímeros catiónicos bioadhesivos adecuados incluyen gelatina ácida, poligalactosamina, poliaminoácidos tales como polilisina, polihistidina, poliornitina, compuestos policuaternarios, prolamina, poliimina, dietilaminoetildextrano (DEAE), DEAE-imina, DEAE-metacrilato, DEAE-acrilamida, DEAE-dextrano, DEAE-celulosa, poli-p-aminoestireno, polioxitano, copolimmetacrilatos, poliamidoaminas, almidones catiónicos, polivinilpiridina, y politiodietilaminometileno.

Las composiciones pueden formularse de cualquier modo adecuado. Las composiciones de minicélulas pueden dispersarse de forma uniforme (homogénea) o no uniforme (heterogénea) en el vehículo. Las formulaciones adecuadas incluyen formulaciones secas y líquidas. Las formulaciones secas incluyen polvos secados por congelación y liofilizados, que son particularmente muy adecuados para suministro en aerosol a las fosas nasales o el pulmón, o para almacenamiento a largo plazo seguido por reconstitución en un diluyente adecuado antes de su administración. Otras formulaciones secas preferidas incluyen aquellas donde una composición descrita en este documento se comprime en una forma de comprimido o píldora adecuada para administración oral o se compone en

una formulación de liberación sostenida. Cuando la composición está pretendida para administración oral, pero tiene que suministrarse al epitelio en los intestinos, se prefiere que la formulación se encapsule con un recubrimiento entérico para proteger la formulación y evitar la liberación prematura de las composiciones de minicélulas incluidas en la misma. Como apreciarán los expertos en la materia, las composiciones de la invención pueden colocarse en cualquier forma adecuada de dosificación. Las píldoras y comprimidos representan algunas de dichas formas de dosificación. Las composiciones también pueden encapsularse en cualquier cápsula adecuada u otro material de recubrimiento, por ejemplo, por compresión, inmersión, recubrimiento por lavado, secado por pulverización, etc. Las cápsulas adecuadas incluyen aquellas hechas de gelatina y almidón. A su vez, dichas cápsulas pueden recubrirse con uno o más materiales adicionales, por ejemplo, y recubrimiento entérico, si se desea. Las formulaciones líquidas incluyen formulaciones acuosas, geles, y emulsiones.

Algunas realizaciones preferidas se refieren a composiciones que comprenden un recubrimiento bioadhesivo, preferiblemente un mucoadhesivo. Un "recubrimiento bioadhesivo" es un recubrimiento que permite que una sustancia (por ejemplo, una composición de minicélulas) se adhiera a una superficie biológica o sustancia mejor de lo que sucedería en ausencia del recubrimiento. Un "recubrimiento mucoadhesivo" es un recubrimiento bioadhesivo preferido que permite que una sustancia, por ejemplo, una composición, se adhiera mejor a la mucosa de lo que sucedería en ausencia del recubrimiento. Por ejemplo, pueden recubrirse partículas micronizadas (por ejemplo, partículas que tienen un diámetro medio de aproximadamente 5, 10, 25, 50, o 100 μm) con un mucoadhesivo. Las partículas recubiertas después pueden ensamblarse en una forma de dosificación adecuada para suministro a un organismo. Preferiblemente, y dependiendo de la localización donde se exprese el resto de transporte de superficie celular a dirigir, la forma de dosificación entonces se recubre con otro recubrimiento para proteger la formulación hasta que alcance la localización deseada, donde el mucoadhesivo posibilita que la formulación se retenga mientras la composición interacciona con el resto de transporte de superficie de la célula diana.

Las composiciones descritas en este documento pueden administrarse a cualquier organismo, preferiblemente un animal, preferiblemente un mamífero, ave, pez, insecto, o arácnido. Los mamíferos preferidos incluyen animales bovinos, caninos, equinos, felinos, ovinos, y porcinos, y primates no humanos. Los seres humanos son particularmente preferidos. Existen múltiples técnicas de administración y suministro de un compuesto en la técnica incluyendo, aunque sin limitación, administración oral, rectal (por ejemplo, un enema o supositorio), en aerosol (por ejemplo, para suministro nasal o pulmonar), parenteral, y tópica. Preferiblemente, se suministran cantidades suficientes del péptido biológicamente activo para conseguir el efecto pretendido. La cantidad particular de composición a suministrar dependerá de muchos factores, incluyendo el efecto a conseguir, el tipo de organismo al cual se suministra la composición, la vía de suministro, el régimen de dosificación, y la edad, salud, y sexo del organismo. Por tanto, la dosificación particular de una composición incorporada en una formulación dada se deja a discreción del experto en la materia.

Los expertos en la materia apreciarán que cuando las composiciones de la presente invención se administran como agentes para conseguir un resultado biológico deseado particular, que puede incluir uno o más efectos terapéuticos o protectores (incluyendo vacunación), puede ser posible combinar las proteínas de fusión con un vehículo farmacéutico adecuado. La elección del vehículo farmacéutico y la preparación de la proteína de fusión como agente terapéutico o protector dependerán del uso pretendido y modo de administración. Las formulaciones y métodos de administración adecuados para agentes terapéuticos incluyen aquellos para suministro oral, pulmonar, nasal, bucal, ocular, dérmico, rectal, o vaginal.

Dependiendo del modo de suministro empleado, la entidad funcional dependiente de contexto puede suministrarse en diversas formas farmacéuticamente aceptables. Por ejemplo, la entidad funcional dependiente de contexto puede suministrarse en forma de un sólido, solución, emulsión, dispersión, micela, liposoma, y similares, incorporada en una píldora, cápsula, comprimido, supositorio, aerosol, goteo, o pulverización. Las píldoras, comprimidos, supositorios, aerosoles, polvos, gotas, y pulverizaciones pueden tener estructuras complejas de múltiples capas y tener un gran intervalo de tamaños. Los aerosoles, polvos, gotas, y pulverizaciones pueden variar de pequeños (1 micrómetro) a grandes (200 micrómetros) de tamaño.

Las composiciones farmacéuticas descritas en este documento pueden usarse en forma de un sólido, un polvo liofilizado, una solución, una emulsión, una dispersión, una micela, un liposoma, y similares, donde la composición resultante contiene uno o más de los compuestos de la presente invención, como ingrediente activo, en mezcla con un vehículo o excipiente orgánico o inorgánico adecuado para aplicaciones enterales o parenterales. El ingrediente activo puede componerse, por ejemplo, con los vehículos farmacéuticamente aceptables no tóxicos habituales para comprimidos, gránulos, cápsulas, supositorios, soluciones, emulsiones, suspensiones, y cualquier otra forma adecuada para su uso. Los vehículos que pueden usarse incluyen glucosa, lactosa, manosa, goma arábiga, gelatina, manitol, pasta de almidón, trisilicato de magnesio, talco, almidón de maíz, queratina, sílice coloidal, almidón de patata, urea, triglicéridos de longitud de cadena media, dextranos, y otros vehículos adecuados para su uso en la fabricación de preparaciones, en forma sólida, semi-sólida, o líquida. Además, pueden usarse agentes auxiliares, estabilizantes, espesantes y colorantes y perfumes. Ejemplos de un agente seco estabilizante incluye triulosa, preferiblemente a concentraciones del 0,1 % o mayores (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 5.314.695). El compuesto activo se incluye en la composición farmacéutica en una cantidad suficiente para producir el efecto deseado sobre el proceso o estado de las enfermedades.

13. Producción de otros agentes biológicos basados en células

Aunque la descripción hasta ahora ha sido para la mejor purificación de minicélulas con respecto a la relación de minicélulas a células precursoras viables, ciertamente no está limitada únicamente a esta aplicación. Adicionalmente, la presente descripción puede usarse en la producción de otros agentes biológicos basados en células como medio para eliminar células viables de producción. A modo de ejemplo no limitante, la presente descripción puede ser útil en la producción y preparación de enzimas y otras proteínas, ácidos nucleicos, fantasmas bacterianos, lípidos, biopelículas, azúcares, y moléculas pequeñas.

Para este fin, la presente descripción aborda esta necesidad ya que proporciona un método capaz de dañar de forma irreparable los cromosomas de células precursoras viables mediante el uso de un mecanismo de suicidio genético regulado que no se ha descrito previamente.

14. Uso del sistema MSM en biología sintética

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso del sistema MSM en el campo de biología sintética. Como se usa en este documento, "biología sintética" incluye la construcción y uso de un ácido nucleico competente en replicación, un "genoma sintético" o un "cromosoma sintético", donde dicho ácido nucleico comprende un conjunto mínimo de genes necesario para el crecimiento sostenido en medio definido. Los genomas sintéticos pueden incluir uno o más genes de los necesarios para constituir un conjunto mínimo de genes, todos y cada uno de los cuales pueden encontrarse o no juntos en la naturaleza. Los genomas sintéticos pueden crearse usando un enfoque de sustracción mediado por transposón donde un genoma de partida tiene sus genes no esenciales retirados o reemplazados a través de una combinación de una o más alteraciones mediadas por transposón y una o más recombinaciones homólogas. La recombinaciones o recombinaciones homólogas pueden suceder de forma natural, o pueden facilitarse por una miríada de sistemas de recombinación incluyendo, aunque sin limitación, el sistema de recombinasa Red, el sistema *loxP*, el sistema de recombinas *cre* y similares. Como alternativa, el genoma sintético puede crearse usando un enfoque aditivo donde dicho genoma sintético se diseña de forma racional y se construye *de novo*. Los genomas sintéticos construidos usando el enfoque *de novo* aditivo pueden, pero no lo necesitan, construirse primero *in silico*. Es deseable que el genoma sintético comprenda adicionalmente un gen o conjunto de genes que provoquen un fenotipo discreto y deseado. Por ejemplo, un nuevo organismo que puede metabolizar hidrocarburos para producir biocombustible tales como hidrógeno, etanol, o biodiesel podría crearse y comercializarse mediante la introducción de un genoma sintético que contiene un gen o conjunto de genes capaces de dicho metabolismo en un microorganismo sustituto. Otros ejemplos incluyen, aunque sin limitación, la creación de microorganismos que pueden fijar dióxido de carbono directamente de la atmósfera, producir subproductos industrialmente relevantes o precursores para los mismos (por ejemplo, sulfito para la producción de ácido sulfúrico), o capaces de añadir moléculas beneficiosas o de retirar moléculas tóxicas del entorno.

Una vez construido, el genoma sintético puede introducirse en una célula derivada de un microorganismo, incluyendo, aunque sin limitación, una bacteria, usando técnicas convencionales de transformación, donde el genoma sintético reemplaza al genoma original del microorganismo sustituto. Un método para asegurar que el genoma sintético ha reemplazado al genoma original es a través de la incorporación de un marcador genético selectivo, incluyendo, aunque sin limitación, un gen de resistencia a antibióticos, y seleccionando los transformantes estables. Otras metodologías de selección conocidas para los expertos en la materia serán fácilmente reconocidas y aplicables como estrategias alternativas de selección. Las estrategias de selección pueden aplicarse individualmente o en una pluralidad. El orden de selección es únicamente a criterio del usuario y puede impartirse en cualquier orden, temperatura, y condición de crecimiento.

Para asegurar la eliminación del genoma original del microorganismo sustituto, se prefiere que el cromosoma o cromosomas de dicho microorganismo sustituto se destruyan o se dañen de forma irreparable en algún punto durante la transformación del genoma sintético. Preferiblemente, la destrucción irreparable del cromosoma o cromosomas sería inducible y sucedería antes de la introducción del genoma sintético en el microorganismo sustituto. El sistema MSM descrito en este documento facilita la destrucción inducible e irreparable del cromosoma o cromosomas de la bacteria y se utiliza fácilmente como mecanismo por el cual destruir el cromosoma o cromosomas originales de la célula sustituta antes de la introducción del genoma sintético. La naturaleza modular del sistema MSM es ventajosa porque permite que el sistema se emplee en numerosas cepas de bacterias incluyendo, aunque sin limitación, las enumeradas en la Tabla 1.

15. El uso de minicélulas bacterianas en biología sintética

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de minicélulas bacterianas como célula sustituta para su uso en aplicaciones de biología sintética en oposición a una bacteria con un cromosoma que se ha dañado irreparablemente por el sistema MSM. Las minicélulas son células anucleadas derivadas directamente de células bacterianas precursoras. Como las células bacterianas no están compartimentadas en comparación con las células eucariotas, toda la maquinaria de síntesis y replicación del ADN necesaria para replicar un genoma sintético también está presente dentro de la minicélula. La ventaja es que la minicélula, por definición, ya ha "perdido" el cromosoma precursor. Las minicélulas, igual que la bacteria celular completa, se transforman con genomas sintéticos y otros

tipos de ácido nucleico usando procedimientos convencionales de transformación y selección fácilmente reconocidos por los expertos en la materia. La selección de transformantes puede realizarse como se ha descrito anteriormente.

La sobreexpresión de proteínas de la maquinaria de síntesis y replicación del ADN por la célula precursora productora de minicélulas antes de la inducción de la formación de minicélulas asegurará que el genoma sintético ya esté sintetizado por la minicélula tras la transformación proporcionando una abundancia de dichos componentes mediante segregación en las minicélulas. Por tanto, dichas minicélulas están enriquecidas con la maquinaria de síntesis y replicación del ADN antes de la transformación. Por ejemplo, en *E. coli*, los genes implicados en la replicación del cromosoma incluyen, aunque sin limitación, *dnaA*, *dnaB*, *dnaC*, *ssb*, *dnaG*, *polA*, *dnaE*, *dnaQ*, *hole*, *dnaX*, *dnaN*, *dnaX*, *holA*, *holB*, *holC*, *hold*, *lig*, *gyrA*, y *gyrB*. Estos genes y sus equivalentes funcionales pueden sobreexpresarse por la célula precursora productora de minicélulas antes de la inducción del fenotipo de minicélulas de modo que se encapsulen en las minicélulas. Los genes de replicación y síntesis pueden sobreexpresarse en cualquier combinación y pueden estar presentes en el cromosoma de la línea celular precursora o en un elemento de ácido nucleico episómico tal como un plásmido, cósmido, BAC, y similares.

Asimismo, los genes implicados en el reparto de cromosomas, segregación, y división celular *per se* pueden sobreexpresarse y empaquetarse en la minicélula de modo que dichas minicélulas tengan capacidad de repartir los cromosomas, segregación y división celular como requisito final para completar la construcción de un organismo sintético.

La síntesis del genoma sintético requiere energía en forma de moléculas de adenosina trifosfato (ATP) y nucleótidos libres (por ejemplo, adenina, citosina, guanina, timina, y uracilo o cualquiera de sus derivados nucleosídicos o nucleotídicos). Estas moléculas difunden de forma pasiva a través de las bicapas lipídicas de minicélulas bacterianas y pueden añadirse de nuevo para suplementar las minicélulas transformadas hasta que se establezca el genoma sintético y se replique de forma independiente. La producción de polipéptido o polipéptidos a partir de lo recién introducido requiere aminoácidos libres para incorporarlos en las cadenas polipeptídicas nacientes. Los aminoácidos libres se añaden de nuevo a minicélulas recién transformadas para suplementar dichas minicélulas con suficientes aminoácidos libres de modo que soporten la síntesis de proteína naciente desde el genoma sintético. Una vez se han sintetizado niveles suficientes de proteínas metabólicas a partir del genoma sintético por las minicélulas recién transformadas, los aminoácidos pueden retirarse ya que dichas minicélulas ahora son capaces de producir sus propios almacenes de aminoácidos para la síntesis de proteínas.

Las minicélulas derivadas de cualquier fuente procarionta pueden usarse para la construcción de un organismo sintético usando los mecanismos descritos en este documento.

16. Preparaciones de minicélulas

Algunas realizaciones proporcionan un método para reducir la cantidad de células precursoras productoras de minicélulas eubacterianas viables para mejorar la seguridad de las preparaciones de minicélulas pretendidas para aplicaciones de suministro *in vivo* con respecto a la cantidad de partículas infecciosas administradas. Algunas realizaciones comprenden una cepa bacteriana gram-negativa o gram-positiva que contiene un ácido nucleico que codifica un gen productor de minicélulas (por ejemplo, *ftsZ*) que está unido de forma funcional a señales de expresión procarionta inducible, y un segundo ácido nucleico que comprende un gen que codifica un gen de suicidio que no lisa las células precursoras (por ejemplo, la endonucleasa buscadora I-Ceul) que está unido de forma funcional a señales de expresión procarionta inducible (por ejemplo, CI857ts). Las señales de expresión procarionta unidas al gen productor de minicélulas y el gen de suicidio pueden estar bajo el control de las mismas señales de expresión procarionta o diferentes señales de expresión procarionta. Además, el gen productor de minicélulas y el gen de suicidio pueden estar localizados en el mismo ácido nucleico o diferentes ácidos nucleicos dentro una célula, uno de los cuales puede ser ácido nucleico episómico (por ejemplo, plásmido). Aún más, el gen productor de minicélulas y el gen de suicidio pueden estar unidos de forma funcional en una fusión transcripcional (es decir, en el mismo transcrito de ARNm) y bajo el control de señales comunes de expresión procarionta inducible. Tanto el gen productor de minicélulas como el gen de suicidio pueden estar localizados en más de una copia génica por célula. Células eubacterianas que contiene el sistema MSM tienen la capacidad de (i) producir altos rendimientos de minicélulas (mayores de 10^9 por 100 ml de cultivo que ha crecido en matraces de agitación normales, FIGURA 3), (ii) introducir daño celular irreparable que no lisa las células (FIGURAS 1-2, 5-6), y (iii) entrar en el fenotipo filamentoso irreversible (FIGURA 4).

Las minicélulas pretendidas para su uso en aplicaciones de suministro *in vivo* se producen a partir de una cepa eubacteriana que contiene dicho mecanismo de suicidio genético MSM regulado. Una vez producida la cantidad deseada de minicélulas necesaria según dicha aplicación, el mecanismo de suicidio genético (MSM) se activaría mediante la exposición a un estímulo conocido, preferiblemente un cambio en la temperatura, y se permitiría suficiente tiempo para introducir daño irreparable a los cromosomas de dichas células, volviendo de ese modo a dichas células inviables.

Algunas realizaciones de la presente invención se refieren a la inducción del fenotipo de producción de minicélulas usando el sistema MSM a partir de una cepa productora de minicélulas eubacteriana preferiblemente de, aunque sin

limitación, la familia *Enterobacteriaceae* que contiene una molécula de ADN que codifica un gen o producto génico terapéutico o perjudicial, de modo que la minicélula resultante contenga dicha molécula de ADN mediante encapsulación. Después de la producción de la cantidad deseada de minicélulas a partir de un cultivo y condición dados, se estimularía la activación del mecanismo de suicidio genético después de exposición de dicho cultivo o células a una señal conocida. La señal se aplicaría en cada etapa del proceso de purificación para asegurar una eliminación máxima de las células viables en la preparación final.

Algunas realizaciones de la presente invención se refieren a la inducción del fenotipo de producción de minicélulas a partir de una cepa productora de minicélulas eubacteriana optimizada de, aunque sin limitación, la familia *Enterobacteriaceae* que contiene cualquier subclase de ARN, incluyendo, aunque sin limitación, ARNip, ARN antisentido, ribozimas, ARNhc, y miARN de modo que la minicélula resultante contenga una cantidad enriquecida de dichas moléculas de ARN mediante encapsulación. Después de la producción de la cantidad deseada de minicélulas a partir de dicho cultivo y condición, la activación del mecanismo de suicidio genético (MSM) se estimularía después de la exposición de dicho cultivo o células a una señal conocida. La señal se aplicaría en cada etapa del proceso de purificación para asegurar una eliminación máxima de células viables en la preparación final.

Algunas realizaciones de la presente invención se refieren a la inducción del fenotipo de producción de minicélulas a partir de una cepa productora de minicélulas eubacteriana optimizada de, aunque sin limitación, la familia *Enterobacteriaceae* que contiene una molécula proteica, de modo que la minicélula resultante contenga dicha molécula proteica mediante encapsulación. Después de la producción de la cantidad deseada de minicélulas a partir de un cultivo y condición dados, se estimularía la activación del mecanismo de suicidio genético después de exposición de dicho cultivo o células a una señal conocida. La señal se aplicaría en cada etapa del proceso de purificación para asegurar una eliminación máxima de las células viables en la preparación final.

Algunas realizaciones de la presente invención se refieren a la inducción del fenotipo de producción de minicélulas a partir de una cepa productora de minicélulas eubacteriana optimizada de, aunque sin limitación, la familia *Enterobacteriaceae* que contiene una combinación predeterminada y deliberada de moléculas de ADN que codifican un gen o producto génico terapéutico o perjudicial, cualquier subclase de ARN, y/o proteínas, de modo que la minicélula resultante contenga dicha combinación de moléculas mediante encapsulación. Después de la producción de la cantidad deseada de minicélulas a partir de un cultivo y condición dados, se estimularía la activación del mecanismo de suicidio genético después de exposición de dicho cultivo o células a una señal conocida. La señal se aplicaría en cada etapa del proceso de purificación para asegurar una eliminación máxima de las células viables en la preparación final.

Algunas realizaciones de la presente invención se refieren a la inducción del fenotipo de producción de minicélulas a partir de una cepa productora de minicélulas eubacteriana optimizada de, aunque sin limitación, la familia *Enterobacteriaceae* de modo que pueda "cargarse" con moléculas pequeñas que comprenden, aunque sin limitación, un fármaco, un profármaco, o una hormona después de purificación. Después de la producción de la cantidad deseada de minicélulas "vacías" a partir de un cultivo y condición dados, se estimularía la activación del mecanismo de suicidio genético después de exposición de dicho cultivo o células a una señal conocida. La señal se aplicaría en cada etapa del proceso de purificación para asegurar una eliminación máxima de las células viables en la preparación final. Después de la purificación, las minicélulas se "cargarían" con dicha moléculas o moléculas pequeñas por incubación en una alta concentración de dicha molécula pequeña a una temperatura que varía de 4 a 65 °C.

Algunas realizaciones de la presente invención se refieren a la inducción del fenotipo de producción de minicélulas a partir de una cepa productora de minicélulas eubacteriana optimizada de, aunque sin limitación, la familia *Bacillaceae* que contiene una molécula de ADN que codifica un gen o producto génico terapéutico o perjudicial, de modo que la minicélula resultante contenga dicha molécula de ADN mediante encapsulación. Después de la producción de la cantidad deseada de minicélulas a partir de un cultivo y condición dados, se estimularía la activación del mecanismo de suicidio genético después de exposición de dicho cultivo o células a una señal conocida. La señal se aplicaría en cada etapa del proceso de purificación para asegurar una eliminación máxima de las células viables en la preparación final.

Algunas realizaciones de la presente invención se refieren a la inducción del fenotipo de producción de minicélulas a partir de una cepa productora de minicélulas eubacteriana optimizada de, aunque sin limitación, la familia *Bacillaceae* que contiene cualquier subclase de ARN, incluyendo, aunque sin limitación, ARNip, ARN antisentido, ribozimas, ARNhc, y miARN de modo que la minicélula resultante contenga una cantidad enriquecida de dichas moléculas de ARN mediante encapsulación. Después de la producción de la cantidad deseada de minicélulas a partir de dicho cultivo y condición, se estimularía la activación del mecanismo de suicidio genético después de exposición de dicho cultivo o células a una señal conocida. La señal se aplicaría en cada etapa del proceso de purificación para asegurar una eliminación máxima de las células viables en la preparación final.

Algunas realizaciones de la presente invención se refieren a la inducción del fenotipo de producción de minicélulas a partir de una cepa productora de minicélulas eubacteriana optimizada de, aunque sin limitación, la familia *Bacillaceae* que contiene una molécula proteica, de modo que la minicélula resultante contenga dicha molécula

proteica mediante encapsulación. Después de la producción de la cantidad deseada de minicélulas a partir de un cultivo y condición dados, se estimularía la activación del mecanismo de suicidio genético después de exposición de dicho cultivo o células a una señal conocida. La señal se aplicaría en cada etapa del proceso de purificación para asegurar una eliminación máxima de las células viables en la preparación final.

5 Algunas realizaciones de la presente invención se refieren a la inducción del fenotipo de producción de minicélulas a partir de una cepa productora de minicélulas eubacteriana optimizada de, aunque sin limitación, la familia *Bacillaceae* que contiene una combinación predeterminada y deliberada de moléculas de ADN que codifican un gen o producto génico terapéutico o perjudicial, cualquier subclase de ARN, y/o proteínas, de modo que la minicélula resultante contenga dicha combinación de moléculas mediante encapsulación. Después de la producción de la cantidad deseada de minicélulas a partir de un cultivo y condición dados, se estimularía la activación del mecanismo de suicidio genético después de exposición de dicho cultivo o células a una señal conocida. La señal se aplicaría en cada etapa del proceso de purificación para asegurar una eliminación máxima de las células viables en la preparación final.

15 Algunas realizaciones de la presente invención se refieren a la inducción del fenotipo de producción de minicélulas a partir de una cepa productora de minicélulas eubacteriana optimizada de, aunque sin limitación, la familia *Bacillaceae* de modo que pueda "cargarse" con moléculas pequeñas que comprenden, aunque sin limitación, un fármaco, un profármaco, o una hormona después de purificación. Después de la producción de la cantidad deseada de minicélulas "vacías" a partir de un cultivo y condición dados, se estimularía la activación del mecanismo de suicidio genético después de exposición de dicho cultivo o células a una señal conocida. La señal se aplicaría en cada etapa del proceso de purificación para asegurar una eliminación máxima de las células viables en la preparación final. Después de la purificación, las minicélulas se "cargarían" con dicha moléculas o moléculas pequeñas por incubación en una alta concentración de dicha molécula pequeña a una temperatura predeterminada.

25 En una realización, el nivel de contaminación con células precursoras productoras de minicélulas es de 1 en 10^7 minicélulas.

30 En otra realización, el nivel de contaminación con células precursoras productoras de minicélulas es de 1 en 10^8 minicélulas.

En otra realización, el nivel de contaminación con células precursoras productoras de minicélulas es de 1 en 10^9 minicélulas.

35 En otra realización, el nivel de contaminación con células precursoras productoras de minicélulas es de 1 en 10^{10} minicélulas.

En otra realización, el nivel de contaminación con células precursoras productoras de minicélulas es de 1 en 10^{11} minicélulas.

40 En otra realización, el nivel de contaminación con células precursoras productoras de minicélulas es de 1 en 10^{12} minicélulas.

45 En otra realización, el nivel de contaminación con células precursoras productoras de minicélulas es de 1 en 10^{13} minicélulas.

En otra realización, el nivel de contaminación con células precursoras productoras de minicélulas es de 1 en 10^{14} minicélulas.

50 En otra realización, el nivel de contaminación con células precursoras productoras de minicélulas es de 1 en 10^{15} minicélulas.

En otra realización, el nivel de contaminación con células precursoras productoras de minicélulas es de 1 en 10^{16} minicélulas.

55 Salvo que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que el comprendido habitualmente por un experto en la materia.

60 Ejemplos

Ejemplo 1

Efectos de I-Ceul sobre el crecimiento de *E. coli*

65 Se transformaron células de *E. coli* TOP10 con el vector de expresión pVX-55 (SEQ ID NO: 6). El vector de expresión pVX-55 contiene un gen I-Ceul bajo el control del sistema promotor pRHA inducible por ramnosa. El

cultivo celular de *E. coli* transformado se cultivó en caldo LB suplementado con Kanamicina (50 µg/ml). Se añadió glucosa (0,2 %) al cultivo celular a las 0 horas, y se añadió ramnosa (10 mM) al cultivo celular a las 2,22 horas y DO de 0,3. Se controló el crecimiento de la bacteria midiendo la absorbancia a 600 nm. La FIGURA 1 muestra que el crecimiento del cultivo celular de *E. coli* se redujo significativamente mediante la inducción de la endonucleasa buscadora I-Ceul.

Ejemplo 2

Efectos de I-Ceul sobre la viabilidad de *E. coli*

Se transformaron células de *E. coli* TOP10 con el vector de expresión pVX-55. El vector de expresión pVX-55 contiene un gen I-Ceul bajo el control del sistema promotor pRHA inducible por ramnosa. Las células de *E. coli* se cultivaron en caldo LB con Kanamicina (50 µg/ml) suplementado con glucosa (0,2 %) o ramnosa (10 mM) antes de aplicarse puntualmente sobre placas de agar LB. Se determinaron las poblaciones de células viables (CFU/ml) mediante recuentos de colonias en placas de agar LB. No se observó recuperación de las colonias. La FIGURA 2 muestra que la cantidad de células de *E. coli* viables se redujo significativamente mediante la inducción de la endonucleasa buscadora I-Ceul.

Ejemplo 3

La sobreexpresión simultánea de *ftsZ* y la inducción de I-Ceul (MSM) condujo a mayores rendimientos de minicélulas

Se cultivó una cepa de *E. coli* que contenía *ftsZ* inducible por IPTG y la mutación de delección *minCDE* en medio LB. Se integraron una construcción *ftsZ* (*Ptac::ftsZ*) y una construcción *ftsZ* con el sistema de suicidio basado en I-Ceul inducible por calor (*Ptac::ftsZ* Ω *C1857ts::I-Ceul*) en el sitio *attB λ* en el cromosoma de las células *E. coli* productoras de minicélulas, respectivamente. Las producciones de minicélulas en la cepa *Ptac::ftsZ* se realizaron a 37 °C y los productos de minicélulas de la cepa *Ptac::ftsZ* Ω *C1857ts::I-Ceul* se realizaron a 42 °C para inducir el sistema de suicidio basado en I-Ceul. Las minicélulas se purificaron mediante purificaciones diferenciales. La Figura 3A muestra las cantidades de minicélulas purificadas de cada ml de cultivos LB usados para las producciones de minicélulas. La Figura 3B muestra las relaciones de rendimientos de minicélulas de las cepas *ftsZ* inducibles por IPTG frente a la cepa *minCDE*-. Las Figuras 3A y 3B demuestran que cuando se sobreexpresaban simultáneamente *ftsZ* y I-Ceul en las células productoras de minicélulas, la cantidad de minicélulas producida aumentaba en 36 veces en comparación con la cepa *minCDE*- y aumentaba 10 en comparación con la sobreexpresión de *ftsZ* en solitario.

Ejemplo 4

La sobreexpresión de *ftsZ* y la inducción del sistema de suicidio basado en I-Ceul (MSM) causaba filamentación celular

Se cultivó una cepa de *E. coli* VAX813 con el sistema de producción de minicélulas *ftsZ* inducible y el sistema de suicidio I-Ceul inducible por calor (pVX-66 (SEQ ID NO: 5); *Ptac::ftsZ* Ω *C1857ts::I-Ceul*) en medio LB. A D.O. A600 de 0,1, se indujo la producción de proteína *FtsZ* y I-Ceul elevando la temperatura hasta 42 °C. Después de 24 horas de inducción, las células se tiñeron con Gram. La Figura 4A muestra que la cepa de *E. coli* cultivada a 30 °C en presencia de glucosa (0,2 %) suprime la sobreexpresión de I-Ceul y *ftsZ*. En la Figura 4B, se añadió IPTG (20 mg/ml) para sobreexpresar *ftsZ*, pero se suprimió la expresión de I-Ceul incubando a 30 °C. En la Figura 4C, se indujo la expresión de I-Ceul a 42 °C, pero se suprimió la sobreexpresión de *ftsZ* por glucosa. La Figura 4D muestra que la sobreexpresión simultánea de *ftsZ* y la inducción de I-Ceul causan filamentación más extensiva de las células en comparación con la sobreexpresión de *ftsZ* en la Figura 4B y la inducción de la expresión de I-Ceul en solitario en la Figura 4C. Por consiguiente, además de generar altos rendimientos de minicélulas, la sobreexpresión simultánea de *ftsZ* y I-Ceul tiene la ventaja de posibilitar que las células precursoras productoras de minicélulas se vuelvan uniformemente filamentosas, lo que puede facilitar mejor los esquemas de purificación de minicélulas basados en filtración.

Ejemplo 5

La inducción del sistema de suicidio basado en I-Ceul (MSM) causaba acumulación de células con extremos de ADN 3' OH marcados con TUNEL lo que indica roturas cromosómicas bicatenarias

Se cultivó la cepa de *E. coli* VAX813, que contiene el sistema MSM bajo el control de los sistemas promotores *C1857ts* y pTac (pVX-66; *Ptac::ftsZ* Ω *C1857ts::I-Ceul*, que controla la expresión de I-Ceul y *ftsZ*, respectivamente) a 30 °C o 42 °C en medio LB suplementado con IPTG durante 24 horas. Las células se tiñeron con TUNEL (FITC) en los puntos temporales indicados. Como control comparativo, las células también se tiñeron con contraste con FM-464 (tiñe todas las células) de modo que se cuantificara el porcentaje de células positivas a TUNEL entre la población total mediante FACS. La Figura 5 muestra que el sistema de suicidio basado en I-Ceul introducía satisfactoriamente roturas cromosómicas bicatenarias irreparables en las células precursoras productoras de

minicélulas, y provocaba la muerte de más del 70 % de la población celular en 12 horas después de la inducción de I-Ceul.

Ejemplo 6

El sistema de suicidio basado en I-Ceul reducía las contaminaciones de células precursoras entre las minicélulas purificadas

Se integró *ftsZ* inducible por IPTG en el sitio *attB λ* en el cromosoma de *E. coli* para preparar una cepa de *E. coli* productora de minicélulas (*Ptac::ftsZ*) mediante sobreexpresión de *ftsZ*. También se integró el sistema de suicidio basado en I-Ceul inducible por calor en el sitio *attB λ* junto con el *ftsZ* inducible por IPTG usando el plásmido de integración pVX-66 66 (pVX-66; *Ptac::ftsZ Ω C1857ts::I-Ceul*) para preparar una cepa suicida de *E. coli* productora de minicélulas (*Ptac::ftsZ Ω C1857ts::I-Ceul*). El sistema de suicidio I-Ceul se activó incubando a 42 °C. Se produjeron minicélulas en medio LB suplementado con IPTG y se purificaron mediante purificaciones diferenciales. Las minicélulas purificadas se propagaron en placas de agar LB suplementadas con glucosa (0,2 %) para examinar la presencia de células *E. coli* precursoras vivas. Después de 48 horas de incubación a 30 °C, se contaron las colonias y se calcularon las concentraciones de células precursoras contaminantes como unidades formadoras de colonias (CFU) en 10¹⁰ minicélulas. La Figura 6 muestra que la activación del sistema de suicidio basado en I-Ceul reducía la contaminación de células precursoras en más de 800 veces.

Ejemplo 7

La delección de *msbB* en *S. typhimurium* cambiaba los perfiles de LPS

Se purificó LPS de cepas de *S. Typhimurium* con *msbB* de tipo silvestre (WT) y *msbB* deleccionado (*msbB*-). La delección de *msbB* se realizó por sustitución de *msbB* con FRT-*cat*-FRT mediante el sistema de recombinasa λ Red (Red Swap). Primero se trataron células secadas con acetona con DNasa I y RNasa A seguido por tratamientos con Proteinasa K. Después se extrajo LPS mediante extracción con agua caliente-fenol. Se purificó LPS mediante diálisis frente a agua. Se separó LPS purificado con electroforesis en gel de SDS-PAGE y se tiñeron con plata. El LPS de los mutantes *MsbB* tiene lípido A sin grupo miristoilo. La ausencia del grupo miristoilo reduce el peso molecular que puede visualizarse por desplazamientos en los patrones de la banda de LPS. La Figura 7 muestra que la delección del gen *msbB* provocaba perfiles alterados de LPS en la cepa mutante de *S. typhimurium* en comparación con la cepa de *S. typhimurium* de tipo silvestre.

Ejemplo 8

La delección de *msbB* causa que células tipo macrófago de ratón J774.A1 produzcan menos cantidades de factor de necrosis tumoral α (TNF α) frente a LPS de *S. Typhimurium*

Se purificó LPS de cepas de *S. Typhimurium* con *msbB* de tipo silvestre (WT) y cepas de *S. Typhimurium* que albergan la mutación de delección *msbB*, respectivamente. Se incubaron células tipo macrófago de ratón J774.A1 (10⁶ células) con 0,1 ng de cada tipo de LPS purificado durante 12 horas. Se determinó la concentración de TNF α mediante ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). La Figura 8 muestra que la delección de *msbB* en una cepa de *Salmonella* productora de minicélulas dio lugar a minicélulas con toxicidad reducida medida por la producción de TNF- α por macrófagos murinos cultivados.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Vaxiion Therapeutics, Inc.
Maloy, Stanley
Tsuji, Shingo
Giacalone, Matthew

<120> COMPOSICIONES Y MÉTODOS DEL MECANISMO DE SUICIDIO GENÉTICO REGULADO

<130> VAX.017A

<150> 61/075687
<151> 25-06-2008

<150> 61/168457
<151> 10-04-2009

<160>6

<170> FastSEQ for Windows Versión 4.0

ES 2 569 909 T3

<210> 1
 <211> 657
 <212> ADN
 <213> *Chlamydomonas moewusii*

5

<400> 1
 atgtcaaact ttatacttaa accgggcgaa aaactacccc aagacaaaact agaagaatta 60
 aaaaaaatta atgatgctgt taaaaaacg aaaaatttct caaataactt gattgactta 120
 agaaaaacttt tcaaattga cgaagtccaa gtaacttctg aatcaaaaact ctttttagct 180
 ggttttttag aaggtgaagc ttctctaaat attagcacta aaaagctcgc tacttctaaa 240
 tttggtttgg tggttgatcc tgaattcaat gtgactcaac atgtcaatgg ggttaaagtg 300
 ctttatttag cattagaagt atttaaaaca gggcgtattc gtcataaaaag tggtagtaat 360
 gcaactttag ttttaactat tgacaatcgt caaagtttgg aagaaaaagt aattcctttt 420
 tatgaacaat atgttgttgc cttcagttct ccagaaaaag tcaaactgtg agctaatttt 480
 aaagctttgt tagaattatt taataatgac gctcaccaag atttagaaca attggtaaac 540
 aaaatcctac caatttggga tcaaatgcgt aaacaacaag gacaaagtaa cgaaggcttt 600
 cctaatttag aagcagctca agactttgct cgtaattata aaaaaggtat aaagtag 657

10

<210> 2
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> Sitio de reconocimiento de ADN monocatenario /-Ceul

20

<400> 2
 cgtaactata acggctctaa ggtagcgaa 29

25

<210> 3
 <211> 383
 <212> PRT
 <213> *Escherichia coli*
 <400> 3

Met	Phe	Glu	Pro	Met	Glu	Leu	Thr	Asn	Asp	Ala	Val	Ile	Lys	Val	Ile
1				5					10					15	
Gly	Val	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Asn	Ala	Val	Glu	His	Met	Val	Arg	Glu
			20				25						30		

Arg Ile Glu Gly Val Glu Phe Phe Ala Val Asn Thr Asp Ala Gln Ala
 35 40 45
 Leu Arg Lys Thr Ala Val Gly Gln Thr Ile Gln Ile Gly Ser Gly Ile
 50 55 60
 Thr Lys Gly Leu Gly Ala Gly Ala Asn Pro Glu Val Gly Arg Asn Ala
 65 70 75 80
 Ala Asp Glu Asp Arg Asp Ala Leu Arg Ala Ala Leu Glu Gly Ala Asp
 85 90 95
 Met Val Phe Ile Ala Ala Gly Met Gly Gly Gly Thr Gly Thr Gly Ala
 100 105 110
 Ala Pro Val Val Ala Glu Val Ala Lys Asp Leu Gly Ile Leu Thr Val
 115 120 125
 Ala Val Val Thr Lys Pro Phe Asn Phe Glu Gly Lys Lys Arg Met Ala
 130 135 140
 Phe Ala Glu Gln Gly Ile Thr Glu Leu Ser Lys His Val Asp Ser Leu
 145 150 155 160
 Ile Thr Ile Pro Asn Asp Lys Leu Leu Lys Val Leu Gly Arg Gly Ile
 165 170 175
 Ser Leu Leu Asp Ala Phe Gly Ala Ala Asn Asp Val Leu Lys Gly Ala
 180 185 190
 Val Gln Gly Ile Ala Glu Leu Ile Thr Arg Pro Gly Leu Met Asn Val
 195 200 205
 Asp Phe Ala Asp Val Arg Thr Val Met Ser Glu Met Gly Tyr Ala Met
 210 215 220
 Met Gly Ser Gly Val Ala Ser Gly Glu Asp Arg Ala Glu Glu Ala Ala
 225 230 235 240
 Glu Met Ala Ile Ser Ser Pro Leu Leu Glu Asp Ile Asp Leu Ser Gly
 245 250 255
 Ala Arg Gly Val Leu Val Asn Ile Thr Ala Gly Phe Asp Leu Arg Leu
 260 265 270
 Asp Glu Phe Glu Thr Val Gly Asn Thr Ile Arg Ala Phe Ala Ser Asp
 275 280 285
 Asn Ala Thr Val Val Ile Gly Thr Ser Leu Asp Pro Asp Met Asn Asp
 290 295 300
 Glu Leu Arg Val Thr Val Val Ala Thr Gly Ile Gly Met Asp Lys Arg
 305 310 315 320
 Pro Glu Ile Thr Leu Val Thr Asn Lys Gln Val Gln Gln Pro Val Met
 325 330 335
 Asp Arg Tyr Gln Gln His Gly Met Ala Pro Leu Thr Gln Glu Gln Lys
 340 345 350
 Pro Val Ala Lys Val Val Asn Asp Asn Ala Pro Gln Thr Ala Lys Glu
 355 360 365
 Pro Asp Tyr Leu Asp Ile Pro Ala Phe Leu Arg Lys Gln Ala Asp
 370 375 380

<210> 4
 <211> 218
 <212> PRT
 <213> *Chlamydomonas moewusii*

5

<400> 4

ES 2 569 909 T3

Met	Ser	Asn	Phe	Ile	Leu	Lys	Pro	Gly	Glu	Lys	Leu	Pro	Gln	Asp	Lys
1				5					10					15	
Leu	Glu	Glu	Leu	Lys	Lys	Ile	Asn	Asp	Ala	Val	Lys	Lys	Thr	Lys	Asn
			20					25					30		
Phe	Ser	Lys	Tyr	Leu	Ile	Asp	Leu	Arg	Lys	Leu	Phe	Gln	Ile	Asp	Glu
		35					40					45			
Val	Gln	Val	Thr	Ser	Glu	Ser	Lys	Leu	Phe	Leu	Ala	Gly	Phe	Leu	Glu
	50					55					60				
Gly	Glu	Ala	Ser	Leu	Asn	Ile	Ser	Thr	Lys	Lys	Leu	Ala	Thr	Ser	Lys
65					70						75				80
Phe	Gly	Leu	Val	Val	Asp	Pro	Glu	Phe	Asn	Val	Thr	Gln	His	Val	Asn
					85				90					95	
Gly	Val	Lys	Val	Leu	Tyr	Leu	Ala	Leu	Glu	Val	Phe	Lys	Thr	Gly	Arg
			100					105					110		
Ile	Arg	His	Lys	Ser	Gly	Ser	Asn	Ala	Thr	Leu	Val	Leu	Thr	Ile	Asp
		115					120						125		
Asn	Arg	Gln	Ser	Leu	Glu	Glu	Lys	Val	Ile	Pro	Phe	Tyr	Glu	Gln	Tyr
		130				135						140			
Val	Val	Ala	Phe	Ser	Ser	Pro	Glu	Lys	Val	Lys	Arg	Val	Ala	Asn	Phe
145					150					155					160
Lys	Ala	Leu	Leu	Glu	Leu	Phe	Asn	Asn	Asp	Ala	His	Gln	Asp	Leu	Glu
				165					170					175	
Gln	Leu	Val	Asn	Lys	Ile	Leu	Pro	Ile	Trp	Asp	Gln	Met	Arg	Lys	Gln
			180					185					190		
Gln	Gly	Gln	Ser	Asn	Glu	Gly	Phe	Pro	Asn	Leu	Glu	Ala	Ala	Gln	Asp
		195					200					205			
Phe	Ala	Arg	Asn	Tyr	Lys	Lys	Gly	Ile	Lys						
	210						215								

<210> 5

<211> 9446

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> vector de integración pVX-66 (origen de replicación de RK6; /-Ceul bajo control del promotor c1857ts; FtsZ bajo control del promotor inducible por IPTG; proba; attpP)

<400> 5

ES 2 569 909 T3

tctagaaacc atggaagcta gogaacttac tttatacctt ttttataatt acgagcaaag 60
tcttgagctg cttctaaatt aggaaagcct tcgttaacttt gtccttggtg tttacgcatt 120
tgatcccaaa ttggtaggat tttgtttacc aattgttcta aatccttggtg agcgtcatta 180
ttaaataatt ctaacaaagc tttaaaatta gctacacggt tgactttttc tggagaactg 240
aaggcaacaa catattgttc ataaaaagga attacttttt cttocaaact ttgacgattg 300
tcaatagtta aaactaaagt tgcattacta ccacttttat gacgaatacg cctggtttta 360
aatacttcta atgctaaata aagcacttta accccattga catggtgagt cacattgaat 420
tcaggatcaa ccaccaaacc aaatttagaa gtagcgagct ttttagtgct aatatttaga 480
gaagcttcac cttctaaaaa accagctaaa aagagttttg attcagaagt tacttggaact 540
tcgtcaattt gaaaaagttt tcttaagtca atcaagtatt ttgagaaatt tttcgttttt 600
ttaacagcat cattaatttt ttttaattct tctagtttgt cttggggtag tttttcgccc 660
ggtttaagta taaagtttga catgagttat ttctcctaa aactcgaggc gccaatgctt 720
cgtttcgat cacacacccc aaagccttct gctttgaatg ctgcccttct tcagggctta 780
atthttaaga gcgtcaactt catggtgggc agtgcgtcct gctgatgtgc tcagtatcac 840
cgccagtggt atttatgtca acaccgcoag agataattta tcaccgcaga tggttatctg 900
tatgtttttt atatgaattt atthtttgca ggggggcatt gtttggtagg tgagagatcc 960
ccggggggca gaactcaaaa attccggtgc aaaacagaca ggcgaaacac tgaagatcaa 1020
cattcttgat ctttagctgt cttggtttgc ccaaagcgca ttgcataatc tttcagggtt 1080
atgcgttggt ccatacaacc tccttagtac atgcaacat tatcacccgc agaggtaaaa 1140
tagtcaacac gcacggtggt agatatttat cccttgcggt gatagattta acgtatgagc 1200
acaaaaaaga aaccattaac acaagagcag cttgaggagc cacgtcgcct taaagcaatt 1260
tatgaaaaaa agaaaaatga acttggttta tcccaggaat ctgtcgcaga caagatgggg 1320
atggggcagt caggcgttgg tgctttattt aatggcatca atgcattaaa tgcttataac 1380
gccgcattgc ttgcaaaaat tctcaaagtt agcgttgaag aatttagccc ttcaatcgcc 1440
agagaaatct acgagatgta tgaagcgggt agtatgcagc cgtcacttag aagtgagtat 1500
gagtaccctg ttttttctca tgttcaggca gggatggtct cacctaagct tagaaccttt 1560
accaaaggtg atgcgagag atgggtaagc acaaccaaaa aagccagtga ttctgcattc 1620
tggttgagg ttgaaggtaa ttccatgacc gcaccaacag gctccaagcc aagctttcct 1680
gacggaatgt taattctcgt tgaccctgag caggctgttg agccaggatga tttctgcata 1740
gccagacttg ggggtgatga gtttaccttc aagaaactga tcagggatag cggtcaggtg 1800
ttttacaac cactaaacc acagtacca atgatccat gcaatgagag ttgttccgtt 1860
gtggggaaag ttatcgctag tcagtggcct gaagagacgt ttggctgatc ccacagccgc 1920

cagttccgct gggggcattt tggatccact agtaacggcc gccagtgctc tggaaatcgc 1980
 ccttcaagggt taaaactaag gtaccatgcg tcaatggcct tgtgaatcaa atggctactt 2040
 ttgcatcacc oggttttatt tacgcacgaa tgggtgtaatc accaatgccg atccacttgt 2100
 aagtggcag tgcttccage cccattgggc cacgcgcgtg gagtttttgt gtgcttaccg 2160
 ccacttccgc acccagacca aactggccgc cgtcggtaaa acgcgtagag gcgttaacgt 2220
 aacagcggga cgaatccact tcgttaacaa aacgctgggc gttgcgcata tcgcgggtca 2280
 ggatcgcatc ggagtgttgt gtgccgtgtt cacgaatatg ggcgatggca tcgtcaagat 2340
 cgctgacgat tttgacgttc aaatctaaty acagaaactc atcgtcatalc tcttcggctt 2400
 taacagcaac caocttcgca gggcctgcct gcaactgogc cagtgcagct gcactgcgt 2460
 gtaatgtcac gccgctttcc gccatttgtt tgcttaatgc gggcaggaag ctatcggcga 2520
 tgtttttatt caccagcaac gtttcaaccg tattacatgt gctcggacgc tgagttttcg 2580
 cgttgacgat cacttttaat gcttcagcga tctctacaact tcatcaacg taaatatggc 2640
 atacgcctat accacctgtg atcacgggga ttgtcgaactg ttcacggcac agtttatgca 2700
 aaccagcggc accacgcggg atcagcatgt cgatgtatth atccatalcgc agcatttcac 2760
 tgaccagcgc acggtcagga ttatcaatcg cctgcacggc acccgcgggt aagccgcagg 2820
 atttcagggc gtccctgaatc accgccaccg ttgcagcgtt agtgcgacac gtttctttgc 2880
 caccgcgcag gatcaccgca ttaccggttt cagggcacag cgaagcgaca tcaaccgtca 2940
 cgttcggggc cgcttcataa atcacgccaa taacccccag cggtagcga gcacgctcaa 3000
 gacgcaggcc gctgtccagt acgcgcgat acgattacctg ccccaccgga tcggcgagggt 3060
 tgcacacctg acgtacatcg tcggcaatgc ctttcagccg tgcggggcgtc agtgcacagc 3120
 ggtcaagcat cgcttccgta aggccattgg ctccgcgcgtc agcaacatcc tgggcgttag 3180
 cgttgaggat gatttcgctt tgtgcttcca gttcatcggc gattttttcc agcacgcgat 3240
 ttttttcgcg gctggagagt tgcgctaatt tatacagggc ttgcttcgcy gcaatgcccc 3300
 tttgttccag catcagcctg ctccctaaag ggtaatcatg tcatcacggt gaacggcaac 3360
 cgggccgat tcatatccca gtattgcac aatttcttgc gagtgggtgc cggcaatac 3420
 gcgtaacgca tcgctgttgt aacgactgac gccgtgggcy atatcgcggc ctccgagggt 3480
 gcaaatgcyg atgacttcac cacgcgagaa attgccagtc acgcttttaa tgcctttcgg 3540
 caacagggag ctgcgcgctt ccagaatggc ggcagttgcc ccttcactca cctgatthc 3600
 acccgcggc gggccaccga aaatccagcy tttacggttt tcaagcggag tcgctgggc 3660
 atggaacagc gtaccgacgg aaatgccttc catcacatca ccaataacgc ccggttgc 3720
 gccgcggca ataatggtgt cgataccgc acggcaagcc acgtcagcgg cctgcaattt 3780
 ggtactcatg ccgccagttc cgaggcctga aacgctgtca ccggcaatc cgcgcagtc 3840
 gtcataaatg ccgtaaacat ctttaacag tctgcctgc ggattgctgc gccggctcag 3900
 ggtatacaaa cctttttgat cggtcagcag caacagttta tcggcaccgc caagaatcgc 3960
 gccagcgc gaaaggttat cgttatcgc gaccttaatc tctgcctag cgcagcatc 4020
 gttctcattg attaccggaa cgatattgtt atcagcaac gctcgcaggg tgtcgcgggc 4080
 gttcaggaag cgttcacggt cttccatate agcaggggtc agcagcattt gcccgacgtg 4140
 aatgccataa atcgaaaaca gctgttccca cagttgaaat agtcgactct gccctaccgc 4200
 cgccagcagt tgtttcgagg cgatggtcgc tggcagttcc gggtaaccca ggtgctcac 4260
 tccggcggcg atcgcgccc acgtcacaat aacaatccga tgcccggcgg catgtaactg 4320
 cgcgcactgg cgaacaagtt caacgatag cgcacgggtc agacggcgc atccgctgt 4380
 tagcacactg tgcgcagtt ttaccaccag gctctggctg tcactcatga tctctgcca 4440
 ttcaatttta ggaaaaatga tatcaaacga acgttttagc aggactgtc tcggttgcca 4500
 accatctgc agcaaacgat ggcgttttgt tgcgcgatct gtaataaaag cgtaaacgca 4560
 tgcgatatcg agctctccc ggaattcttg cgctaactgt ctgttacagg tcaactaac 4620
 catctaagta gttgattcat agtgactgca tatgttgtgt tttacagtat tatgtagtct 4680
 gtttttatg caaaatctaa tttaatatat tgatatttat atcattttac gtttctcgtt 4740
 cagctttttt atactaagtt ggcattataa aaaagcattg cttatcaatt tgttgcaac 4800
 aacaggtcac tatcagtcaa aataaaatca ttatttgatt tcaattttgt cccgaattcg 4860
 atcgttagtt tgttttgact ccatccatta gggcttctaa aacgccttct aaggccatgt 4920
 cagccgttaa gtgttctgt gtcactgaaa attgctttga gaggctctaa ggccttctca 4980
 gtgcgttaca tccctggctt gttgtccaca accgttaaac cttaaaagct ttaaaagcct 5040
 tataatattc tttttttctt ataaaactta aaaccttaga ggctatttaa gttgctgatt 5100
 tatattaatt ttattgttca aacatgagag cttagtaactg gaaacatgag agcttagtac 5160
 gttagccatg agagcttagt acgtagcca tgagggttta gttcgttaaa catgagagct 5220
 tagtacgta aacatgagag cttagtaactg gaaacatgag agcttagtac gtaactcaa 5280
 caggttgaa tcgggatctt cgggcgcgat tcccaattcc aggcatacaa taaaacgaaa 5340
 ggcctagtcg aaagactgg ccttctgctt taccctgtgt ttgtcggta acgctctcct 5400
 gagtaggaca aatccgcgg gagcggattt gaacgttgcg aagcaacggc ccggagggtg 5460
 gcgggcagga cgcgcccat aaactgccag gaattaattc caggcatcaa ataaaacgaa 5520
 aggtcagtc gaaagactgg gccttctgtt ttatctgttg tttgtcggtg aacgctctcc 5580
 tgagtaggac aaatccgcc ggagcggatt tgaacgttgc gaagcaacgg cccggagggt 5640
 ggcggcagg acgcccgc taaactgcca ggaattaatt ccaggcatca aataaaacga 5700

aaggctcagt	cgaaagactg	ggcctttcgt	tttatctggt	gtttgtcggg	gaacgctctc	5760
ctgagtagga	caaatccgcc	gggagcggat	ttgaacggtg	cgaagcaacg	gccccgaggg	5820
tggcgggcag	gacgccccgc	ataaactgcc	aggaattaat	tccaggcatc	aaataaaacg	5880
aaaggctcag	tcgaaagact	gggcctttcg	ttttatctgt	tgtttgcggg	tgaacgctct	5940
cctgagtagg	acaaatccgc	cgggagcggg	tttgaacggt	gcgaagcaac	ggccccgagg	6000
gtggcgggca	ggacgccccg	cataaactgc	caggaattgg	ggatcgggat	tcgacgaaacg	6060
ccagcaagac	gtagcccagc	gcgtcggcca	gcttgcaatt	cgcgctaact	tacattaatt	6120
gcgttgcgct	cactgccccg	tttccagtcg	ggaaacctgt	cgtgccagct	gcattaatga	6180
atcggccaac	gcgcggggag	aggcggtttg	cgtattgggc	gccagggtgg	ttttctttt	6240
caccagttag	acgggcaaca	gctgattgcc	cttcaccgcc	tggccctgag	agagttgcag	6300
caagcggctc	acgctggttt	gccccagcag	gcgaaaatcc	tgtttgatgg	tggttgacgg	6360
cgggataaa	catgagctgt	cttcggtatc	gtcgtatccc	actaccgaga	gatccgacc	6420
aacgcgcagc	ccggactcgg	taatggcgcg	catcgcccc	agcggcatct	tacgctggc	6480
aaccagcatc	gcagtgggaa	cgatgccctc	attcagcatt	tgcatggttt	gttgaaaacc	6540
ggacatggca	ctccagtgc	cttcccgttc	cgctatcggc	tgaatttgat	tcgagtgag	6600
atatttatgc	cagccagcca	gacgcagacg	cgccgagaca	gaacttaatg	ggccccgcta	6660
cagcgcgatt	tgctggtgac	ccaatgcgac	cagatgctcc	acgcccagtc	gcgtaccgtc	6720
ttcatgggag	aaaataatac	tgttgatggg	tgtctgggtc	gagacatcaa	gaaataacgc	6780
cggaaacatta	gtgcaggcag	cttccacagc	aatggcatcc	tggtcatcca	tcgagtagtt	6840
aatgatacgc	ccactgacgc	gttgcgcgag	aagattgtgc	accgcccgtt	tacaggcttc	6900
gacgcccgtt	cgttctacca	tcgacaccac	cacgctggca	cccagttgat	cggcgcgaga	6960
tttaatcgcc	gcgacaattt	gcgacggcgc	gtgcagggcc	agactggagg	tggcaacgcc	7020
aatcagcaac	gactgtttgc	ccgccagttg	ttgtgccacg	cggttgggaa	tgtaattcag	7080
ctccgccatc	gocgcttcca	ctttttcccg	cgttttcgca	gaaacgtggc	tggcctggtt	7140
caccacgcgg	gaaacggctc	gataagagac	accggcatac	tctgcgacat	cgtataacgt	7200
tactggtttc	acattcacca	ccctgaattg	actctcttcc	gggcgctatc	atgccatacc	7260
gcgaaaggtt	ttgcaccatt	cgatgggtgc	aacgtaaatg	ccgcttcgcc	ttcgcgcgcg	7320
aattgcaagc	tgatccgggc	ttatcgactg	cacggtgcac	caatgcttct	ggcgtcaggc	7380
agccatcggg	agctgtggta	tggtgtgca	ggtcgtaaat	cactgcataa	ttcgtgtcgc	7440
tcaaggcgca	ctcccgttct	ggataatggt	ttttgcgcgc	acatcataac	ggttctggca	7500
aatattctga	aatgagctgt	tgacaattaa	tcacgcgctc	gtataacgtg	tgggaattgtg	7560
agcggataat	aatttcacac	aggaaacaga	atthaattccc	ggggatctca	ggcgacaggc	7620
acaaatcggg	gagaaactat	gtttgaacca	atggaactta	ccaatgacgc	ggtgattaaa	7680
gtcatcggcg	tcggcggcgg	cggcggtaat	gctgttgaac	acatggtgcg	cgagcgcatt	7740
gaaggtgttg	aattcttcgc	ggtaaatacc	gatgcacaag	cgtgcgtaa	aacagcgggt	7800
ggacagacga	ttcaaactcg	tagcggtatc	accaaaggac	tgggcgctgg	cgtaatcca	7860
gaagttggcc	gcaatgcggc	tgatgaggat	cgcgatgcat	tgctgcggc	gctggaaggt	7920
gcagacatgg	tctttattgc	tcggggtatg	ggtggtggta	ccggtacagg	tcgagcacca	7980
gtcgtcgcct	aagtggcaaa	agatttgggt	atcctgaccg	ttgctgtcgt	cactaagcct	8040
ttcaactttg	aaggcaagaa	gcgtatggca	ttcgcggagc	aggggatcac	tgaactgtcc	8100
aagcatgtgg	actctctgat	cactatcccg	aacgacaaac	tgctgaaagt	tctgggcccgc	8160
ggtatctccc	tgctggatgc	gtttggcgca	gcgaacgatg	tactgaaagg	cgtgtgcaa	8220
ggatctcgtg	aactgattac	tcgtccgggt	ttgatgaacg	tggactttgc	agcgtacgc	8280
accgtaatgt	ctgagatggg	ctacgcaatg	atgggtctcg	gcgtggcgag	agcgtgaagc	8340
cgtgcggaag	aagctgctga	aatggctatc	tcttctccgc	tgctggaaga	tatcgacctg	8400
tctggcgcgc	gcggcgtgct	ggttaacatc	acggcgggct	tcgacctgcg	tctggatgag	8460
ttcgaacagg	taggtaaacac	catccgtgca	tttgctccg	acaacgcgac	tgtggttatc	8520
ggtactttct	ttgacccgga	tatgaatgac	gagctgcgcg	taaccgttgt	tcgacaggt	8580
atcggcatgg	acaaacgtcc	tgaaatcact	ctggtgacca	ataagcaggt	tcagcagcca	8640
gtgatggatc	gctaccagca	gcatgggatg	gctccgctga	cccaggagca	gaagccgggt	8700
gctaagctcg	tgaatgacaa	tcgcgccgca	actgcgaaag	agccggatta	tctggatatc	8760
ccagcattcc	tcgctaagca	agctgattaa	gaattgactg	gaatttgggt	ttcagagctc	8820
tttgtgctaa	actggccccg	cgaatgtata	gtacacttcg	gttggatagg	taatttggcg	8880
agataatacg	atgatcaaac	aaaggacact	taaacgtatc	gttcaggcga	cgggtgtcgg	8940
tttacatacc	ggcaagaaag	tcaccctgac	gttacgccct	gcgccccgca	acaccggggg	9000
catctatcgt	cgcaccgact	tgaatccacc	ggtagatttc	ccggccgatg	ccaaatctgt	9060
gcgtgatacc	atgctctgta	cgtgtctggt	caacgagcat	gatgtacgga	tttcaaccgt	9120
agagcactc	aatgctgctc	tcgcgggctt	ggcatcgtat	ggcccccgca	ggtagtgtg	9180
gggtctcccc	atcgagagt	agggaaactg	caggcatcaa	ataaaacgaa	aggctcagtc	9240
gaaagactgg	gcctttcgtt	ttatctgttg	ttgtcgggtg	aacgctctcc	tgagttagtac	9300
aaatccgccc	ggagcggatt	tgaacgttgc	gaagcaacgg	cccggagggt	ggcgggcagg	9360
acgcccccca	taaacgtcca	ggcatcaaat	taagcagaag	gccatcctga	cggatggcct	9420
ttttgcgtgg	ccagtgcca	gcttct				9446

ES 2 569 909 T3

<210> 6
<211> 6251
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<223> vector de expresión pVX-55 (contiene gen I-Ceul bajo el control del sistema promotor de pRHA inducible por ramnosa)

10

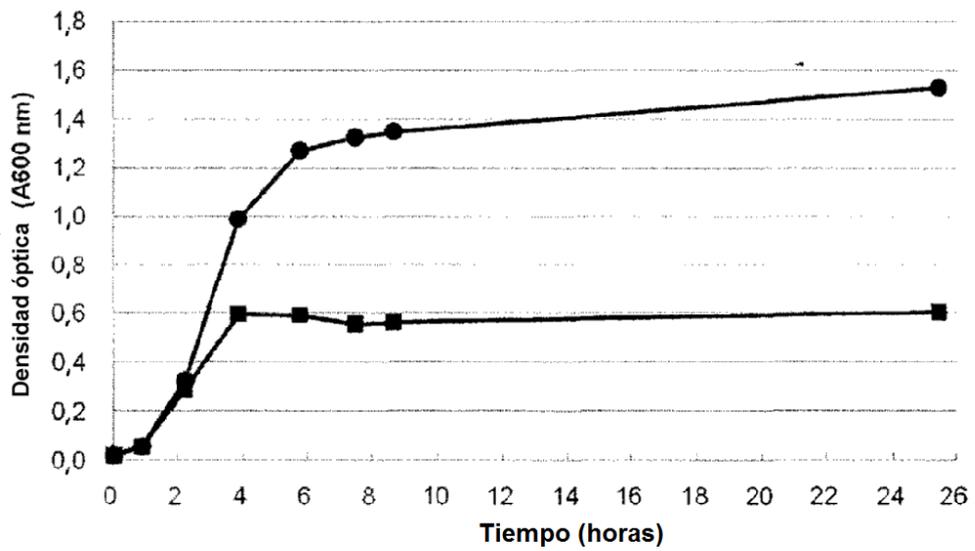
<400>6

aagggcgaat tctgcagata tccatcacac tggcggccgc tcgagcatgc atctagaggg 60
cccaattcgc cctatagtga gtogtattac aattcactgg ccgtcgtttt acaacgtcgt 120
gactgggaaa accctggcgt taccoaactt aatcgccttg cagcacatcc ccctttcgcc 180
agctggcgta atagcgaaga ggccccacc gatcgcctt cccaacagtt gcgcagccta 240
tacgtacggc agtttaaggt ttacacctat aaaagagaga gccgttatcg tctgtttgtg 300
gatgtacaga gtgatattat tgacacgccg gggcgacgga tggatgatccc cctggccagt 360
gcacgtctgc tgtcagataa agtctcccgt gaactttacc cggtggtgca tatcggggat 420
gaaagctggc gcatgatgac caccgatatg gccagtgtgc cggctcccgt tatcggggaa 480
gaagtggctg atctcagcca ccgcgaaaat gacatcaaaa acgccattaa cctgatgttc 540
tggggaatat aatgtcagg catgagatta tcaaaaagga tcttcaccta gatccttttc 600
acgtagaaag ccagtccgca gaaacggtgc tgacccccga tgaatgtcag ctactgggct 660
atctggacaa gggaaaacgc aagcgcaaag agaaagcagg tagcttgacg tgggcttaca 720
tgccgatagc tagactgggc ggttttatgg acagcaagcg aaccggaatt gccagctggg 780
gcgccctctg gtaaggttgg gaagccctgc aaagtaaact ggatggcttt ctgcgccca 840
aggatctgat ggcgcagggg atcaagctct gatcaagaga caggatgagg atcgtttcgc 900
atgattgaac aagatggatt gcacgcagg tctccggccg cttgggtgga gaggctatc 960
ggctatgact gggcacaaca gacaatcggc tgctctgatg ccgccgtgtt ccgctgtca 1020
gcgcaggggc gcccggttct ttttgtcaag accgacctgt ccggtgccct gaatgaactg 1080
caagacgagg cagcgcggct atcgtggctg gccacgacgg gcgttccttg cgcagctgtg 1140
ctcgaccttg tcaactgaag gggaaagggc tggctgctat tgggcgaagt gccggggcag 1200
gatctcctgt catctcaact tgctcctgcc ccatcatggc tgatgcaatg 1260
cggcggtctg atacgcttga tccggctacc tgcccattcg accaccaagc gaaacatcgc 1320
atcgagcgag cacgtactcg gatggaagcc ggtcttgtcg atcaggatga tctggacgaa 1380
gagcatcagg ggctcgcgcc agccgaactg ttccgccagg tcaaggcgag catgcccac 1440
ggcgaggatc tcgtcgtgac ccattggcgat gcctgcttgc cgaatatcat ggtggaaaat 1500
ggccgctttt ctggattcat egactgtggc cggctgggtg tggcggaccg ctatcaggac 1560
atagecgttg ctaccctgta tattgctgaa gagcttggcg gcgaatggc tgaccgcttc 1620
ctcgtgcttt acggtatcgc cgtcccgat tgcagcgcga tcgccttcta tcgccttctt 1680
gacgagttct tctgaattat taacgcttac aatttctga tgcggtatct tctccttacg 1740
catctgtgcg gtatttcaca ccgcatacag gtggcacttt tcggggaaat gtgcgcggaa 1800
cccctatttg tttatttttc taaatacatt caaatatgta tccgctcatg agacaataac 1860
cctgataaat gcttcaataa tagcacgtga ggaagggccac catggccaag ttgaccagtg 1920
ccgttccggt gctcaccgcg cgcgacgtcg ccggagcggc cgagttctgg accgaccggc 1980
tcgggttctc ccgggacttc gtggaggacg acttcgcccg tgtggtccgg gacgacgtga 2040
ccctgttcat cagcgcggtc caggaccagg tgggtgccga caacaccctg gcctgggtgt 2100
gggtgcgcgg cctggacgag ctgtacgccg agtggtcgga ggtcgtgtcc acgaacttc 2160
gggacgcctc cgggcccggc atgaccgaga tggcgagca gccgtggggg cgggagttcg 2220
ccctgcgcga cccggccggc aactgcgtgc acttcgtggc cgaggagcag gactgacacg 2280
tgctaaaact tcatttttaa tttaaaagga tctaggtgaa gatccttttt gataatctca 2340
tgacccaaaat cccttaacgt gagttttcgt tccactgagc gtcagacccc gtagaaaaga 2400
tcaaaggatc ttcttgagat cctttttttc tgccgtaat ctgctgcttg caaacaaaaa 2460
aaccaccgct accagcggtg gtttgtttgc cggatcaaga gctaccaact ctttttccga 2520
aggtactgg cttcagcaga gcgcagatac caaatactgt ccttctagt tagccgtagt 2580
taggccacca cttcaagaac tctgtagcac ccctacata cctcgtctg ctaatcctgt 2640
taccagtggc tgctgccagt ggcgataagt cgtgtcttac cgggttgac tcaagacgat 2700
agttaccgga taaggcgag cggctcgggt gaacgggggg ttcgtgcaca cagcccagct 2760
tgagcgaac gacctacacc gaactgagat acctacagcg tgagctatga gaaagcgcca 2820
cgcttcccga agggagaaag gcggacaggt atccgtaag cggcagggtc ggaacaggag 2880
agcgcacgag ggagcttcca ggggaaaacg cctggtatct ttatagctct gtcgggtttc 2940
gccacctctg acttgagcgt cgatttttgt gatgctcgtc agggggggcg agcctatgga 3000
aaaacgccag caacgcggcc ttttaacggt tctcgggctt ttgctggcct tttgctcaca 3060

tgttctttcc tgcgttatcc cctgattctg tggataaccg tattaccgcc tttgagtgag 3120
 ctgataccgc tcgcccgcagc cgaacgaacc agcgcagcga gtcagtgagc gaggaagcgg 3180
 aagagcgcgc aatacgcaaa ccgcctctcc ccgcgcggtg gccgattcat taatgcagct 3240
 ggcacgacag gtttcccgac tggaaagcgg gcagtgagcg caacgcaatt aatgtgagtt 3300
 agctcactca ttaggcaccc caggctttac actttatgct tccggctcgt atgttgtgtg 3360
 gaattgtgag cggataacaa ttccacacag gaaacagcta tgaccatgat taogccaagc 3420
 tatttaggtg acactataga atactcaagc tatgcatcaa gcttggtacc gagctcggat 3480
 ccactagtaa cggccgcagc tgtgctggaa ttcgcocttt ctagaattaa tctttctgcg 3540
 aattgagatg acgccactgg ctgggcgtca tcccggtttc ccgggtaaac accaccgaaa 3600
 aatagttact atcttcaaag ccacattcgg tcgaaatata actgattaac aggcggctat 3660
 gctggagaag atattgcgca tgacacactc tgacctgctg cagatattga ttgatggcca 3720
 ttccagtctg ctggcgaaat tgctgacgca aaacgcgctc actgcaagat gcctcatcac 3780
 aaaattttatc cagcgcgaaag ggacttttca ggctagccgc cagccgggta atcagcttat 3840
 ccagcaacgt ttcgctggat gttggcggca acgaatcact ggtgtaacga tggcgattca 3900
 gcaacatcac caactgcccg aacagcaact cagccatttc gttagcaaac ggcacatgct 3960
 gactactttc atgctcaagc tgaccgataa cctgcccgcg ctgcccatac cccatgctac 4020
 ctaagcgcca gtgtggttgc cctgcgctgg cgttaaatac cggaatcgcc ccctgccagt 4080
 caagattcag cttcagacgc tccgggcaat aaataatatt ctgcaaaacc agatcgttaa 4140
 ggaagcgtta ggagtgttta tcgtcagcat gaatgtaaaa gagatcgcca cgggtaatgc 4200
 gataagggcg atcgttgagt acatgcaggg cattaccgcg ccagacaatc ccagctcac 4260
 aaaaatcatg tgtatgttca gcaagacat cttgcccgata acggtcagcc acagcactg 4320
 cctgctggtc gctggcaaaa aaatcatctt tgagaagttt taactgatgc gccaccgtgg 4380
 ctacctcggc cagagaacga agttgattat tcgcaatatg gcgtacaaat acgttgagaa 4440
 gattcgcggtt attgcagaaa gccatcccgt ccctggcgaa tatcacgcgg tgaccagtta 4500
 aactctcggc gaaaaagcgt cgaaaagtgg ttactgtcgc tgaatccaca gcgataggcg 4560
 atgtcagtaa cgtctggcctc gctgtggcgt agcagatgtc gggctttcat cagtccgagg 4620
 cggttcaggt atcgtgagg cgtcagtcct gtttgcctgt taagctgccc atgtagcgt 4680
 cgcagtgaaa gagaaaattg atccgcacag gcatcccaat tcacctcatc ggcaaaatgg 4740
 toctccagcc aggcocagaag caagttgaga cgtgatgcgc tgttttccag gttctcctgc 4800
 aaactgcttt tacgcagcaa gagcagtaat tgcataaaca agatctcgcg actggcggtc 4860
 gagggtaaat ctttttcccc ttctgctgt tccatctgtg caaccagctg tcgcacctgc 4920
 tgcaatacgc tgtggttaac gcgccagtga gacggatact gcccatccag ctcttgtggc 4980
 agcaactgat tcagcccggc gagaaactga aatcgatccg gcgagcgata cagcacattg 5040
 gtcagacaca gattatcggg atgttcatac agatgccgat catgatcgcg tacgaaacag 5100
 accgtgccac cgggtgatggg atagggctgc ccattaaaca catgaatacc cgtgccatgt 5160
 tcgacaatca caatttcatg aaaatcatga tgatgttcag gaaaatccgc ctgcccggagc 5220
 cggggttcta tcgccacgga cgcgttacca gacggaaaaa aatccacact atgtaatcag 5280
 gtcatactgg cctcctgatg tcgtcaacac ggcgaaatag taatcacgag gtcaggttct 5340
 taccttaaat tttcgaaggaa aaaccacgta aaaaacgtcg atttttcaag atacagcgtg 5400
 aattttcagg aatgcccgtg agcatcacat caccacaatt cagcaaatg tgaacatcat 5460
 cacgttcctc tttccctggg tgccaatggc ccattttcct gtcagtaacg agaaggtcgc 5520
 gaattcaggc gctttttaga ctggtcgtaa tgaaattcag gaggatggtc gacaggagga 5580
 cttcttttat gtcaaaacttt atacttaaac cgggcgaaaa actaccocaa gacaaaactag 5640
 aagaattaaa aaaaattaat gatgctgtta aaaaaacgaa aaatttctca aaatacttga 5700
 ttgacttaag aaaacttttt caaattgacg aagtccaagt aacttctgaa tcaaaaactct 5760
 ttttagctgg ttttttagaa ggtgaagctt ctctaaatat tagcactaaa aagctcgcta 5820
 cttctaaatt tggtttggtg gttgatcctg aattcaatgt gactcaacat gtcaatgggg 5880
 ttaaagtgct ttatttagca ttagaagtat ttaaacagag gcgtattcgt cataaaagtg 5940
 gtagtaatgc aactttagtt ttaactattg acaatcgtca aagtttgtaa gaaaaagtta 6000
 ttccttttta tgaacaatat gttggtgoc tcaagttctc agaaaaagtc aaacgtgtag 6060
 ctaattttta agotttgtaa gaattattta ataatgacgc tcaccaagat ttagaacaat 6120
 tggtaacaaa aatcctacca atttgggatc aatgcgtaa acaacaagga caaagtaacg 6180
 aaggctttcc taatttagaa gcagctcaag actttgctcg taattataaa aaaggtataa 6240
 agtaatctag a 6251

REIVINDICACIONES

1. Una bacteria productora de minicélulas, que comprende un gen expresable que codifica un producto génico productor de minicélulas que modula uno o más de formación del septo, fisión binaria y segregación de cromosomas; y un gen expresable que codifica una endonucleasa buscadora, en donde el gen de la endonucleasa buscadora es un transgén y en donde el cromosoma de la bacteria productora de minicélulas comprende uno o más sitios de reconocimiento de la endonucleasa buscadora.
2. La bacteria productora de minicélulas de la reivindicación 1, en la que el gen productor de minicélulas se selecciona entre un transgén y un gen de división celular, preferiblemente seleccionado de *ftsZ*, *sulA*, *ccdB* y *sfiC*, preferiblemente un *ftsZ* que codifica una proteína que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 3.
3. La bacteria productora de minicélulas de una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, en la que el gen productor de minicélulas y/o la endonucleasa buscadora se expresan bajo el control de un promotor, en donde el promotor se selecciona entre:
- un promotor inducible; o
 - un promotor sensible a la temperatura; o
 - un promotor inducible por la presencia de uno o más compuestos químicos.
4. La bacteria productora de minicélulas de la reivindicación 1, en la que el gen de la endonucleasa buscadora está localizado en el cromosoma de la bacteria productora de minicélulas.
5. La bacteria productora de minicélulas de la reivindicación 1, en la que la endonucleasa buscadora se selecciona entre I-Ceul, PI-Scel, I-Chul, I-Cpal, I-Scell, I-Crel, I-Msol, I-Scell, I-ScelV, I-Csml, I-Dmol, I-Port, PI-TIII, PI-TIIII y PI-Scpl, preferiblemente una I-Ceul que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4.
6. La bacteria productora de minicélulas de la reivindicación 1, en donde la bacteria productora de minicélulas se selecciona entre:
- una bacteria Gram-negativa, preferiblemente seleccionada entre *Campylobacter jejuni*, *Lactobacillus spp.*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Legionella pneumophila*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, y *Escherichia coli*, preferiblemente una bacteria Gram-negativa que comprende un gen que codifica un producto génico que está implicado en la síntesis de lipopolisacárido, en donde el gen está modificado genéticamente en comparación con un gen de tipo silvestre correspondiente; o una bacteria Gram-positiva, preferiblemente seleccionada entre *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus cereus*.
7. La bacteria productora de minicélulas de la reivindicación 1 que comprende un gen que está implicado en la recombinación homóloga, en la que el gen está modificado genéticamente en comparación con un gen de tipo silvestre correspondiente, en donde la bacteria productora de minicélulas es deficiente en reparación de daños en el ADN.
8. Un método para preparar minicélulas, que comprende cultivar la bacteria productora de minicélulas de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7; y separar las minicélulas de las células precursoras productoras de minicélulas, generando de este modo una composición que comprende minicélulas.
9. El método de la reivindicación 8, que comprende adicionalmente inducir la formación de minicélulas a partir de la célula precursora productora de minicélulas; y/o inducir la expresión del gen que codifica la endonucleasa buscadora; y/o purificar las minicélulas de la composición.
10. El método de la reivindicación 9, en el que la formación de minicélulas se induce mediante la presencia de uno o más compuestos químicos seleccionados del grupo que consiste en isopropil β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG), ramnosa, arabinosa, xilosa, fructosa, melobiosa y tetraciclina.
11. El método de la reivindicación 9, en el que la expresión del gen que codifica la endonucleasa buscadora se induce mediante un cambio en la temperatura.
12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, en el que las minicélulas se separan de las células precursoras mediante un proceso seleccionado del grupo que consiste en centrifugación, ultracentrifugación, gradiente de densidad, inmunoafinidad e inmunoprecipitación.



- Glucosa (0,2 %) añadida a las 0 horas
- Ramnosa (10 mM) añadida a las 2,22 horas y DO de 0,3

FIGURA 1

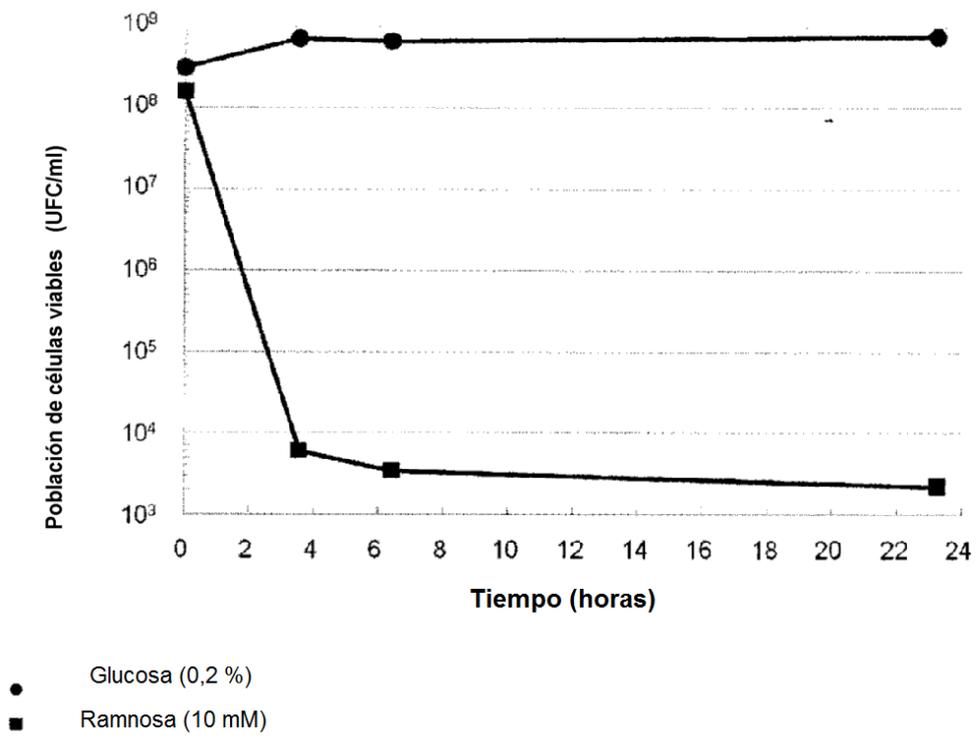


FIGURA 2

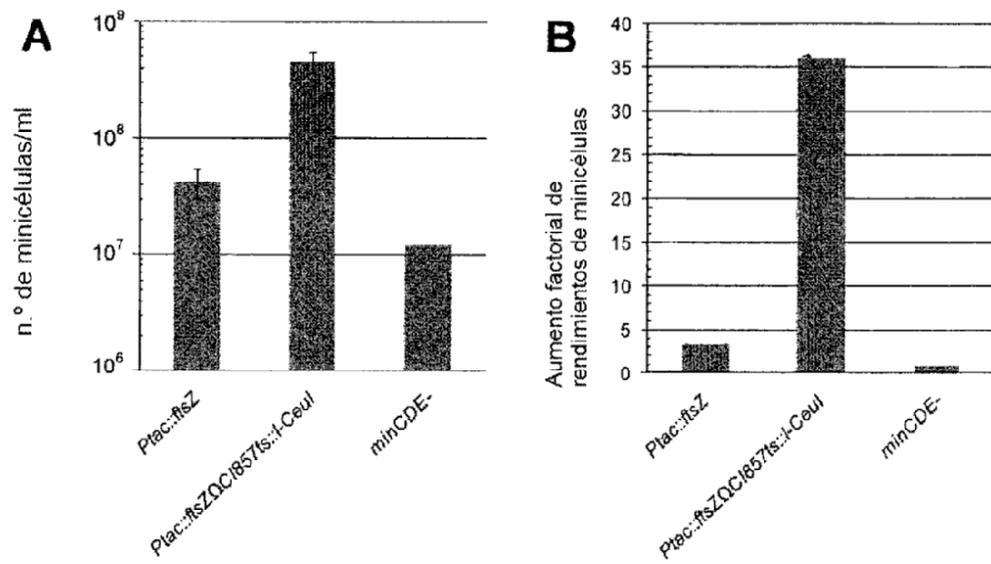


FIGURA 3

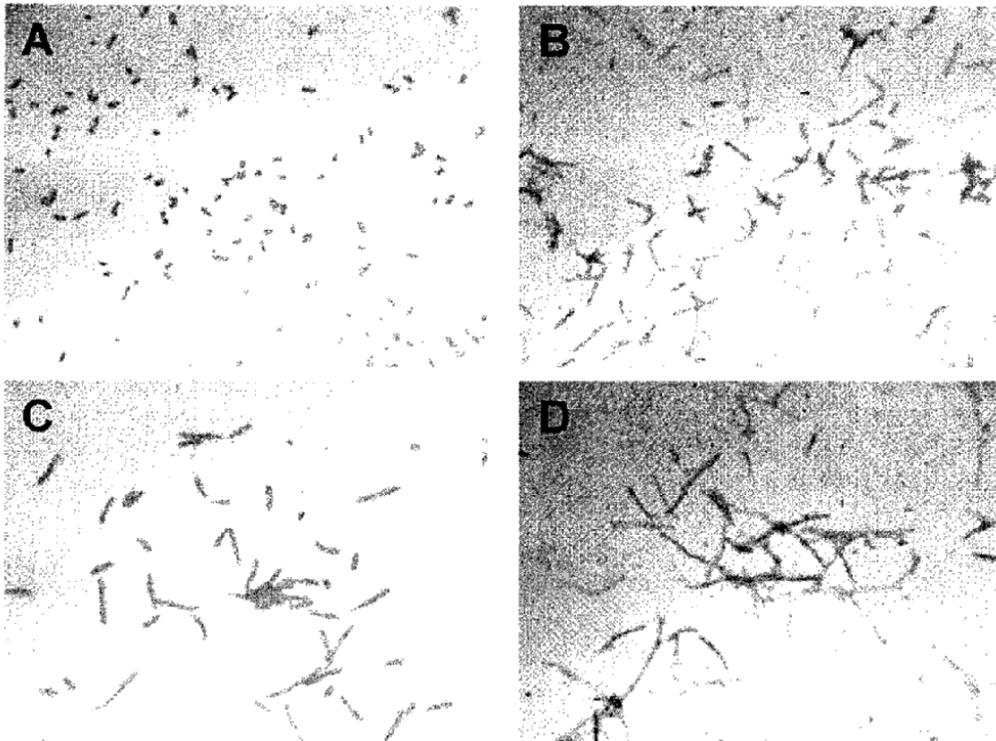


FIGURA 4

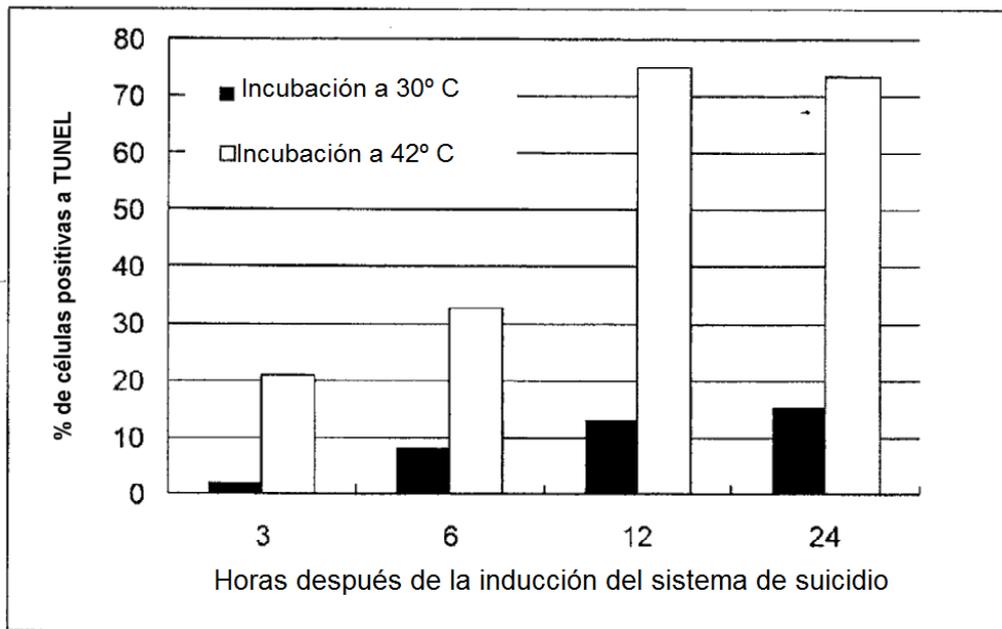


FIGURA 5

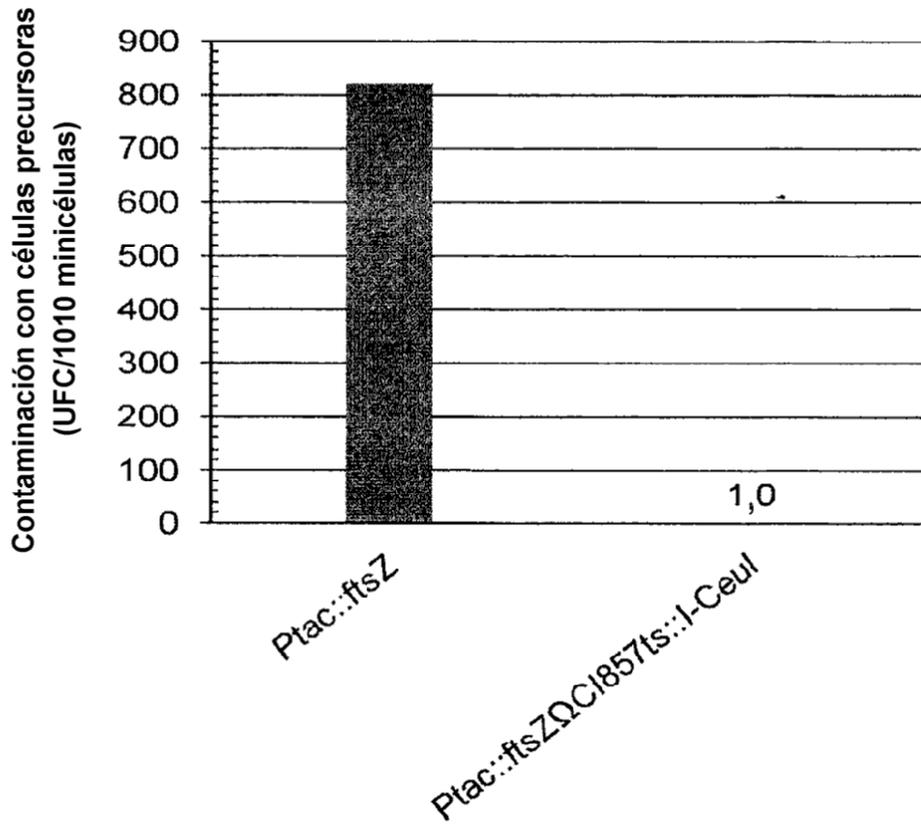


FIGURA 6

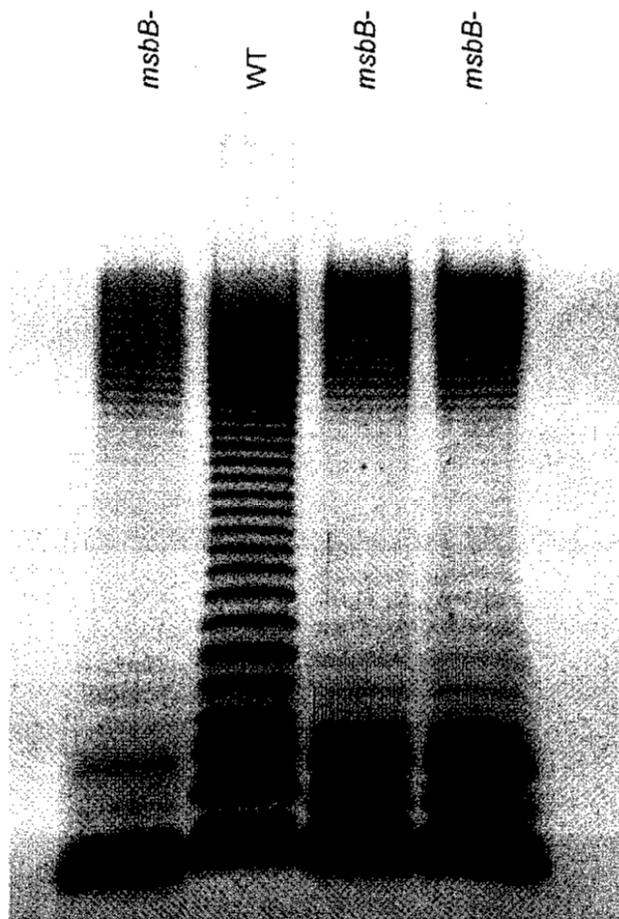


FIGURA 7

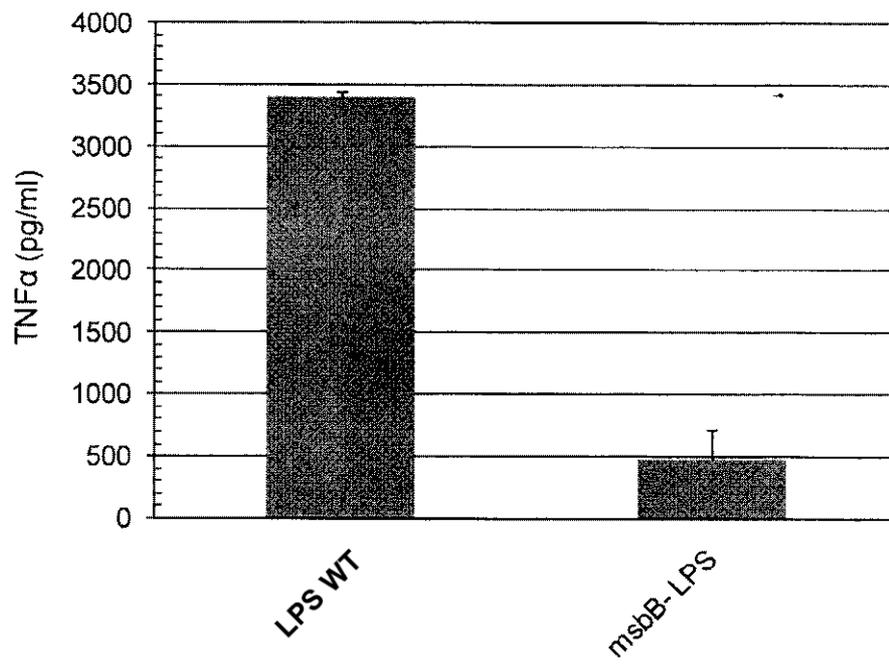


FIGURA 8

Secuencia de reconocimiento de ADN monocatenario por I-Ceul:

5' ...CGTAACTATAACGGTCCTAAGGTAGCGAA...3'

Sitio de escisión de ADN bicatenario por I-Ceul:

5' ...CGTAACTATAACGGTCCTAAGGTAGCGAA...3'
3' ...GCATTGATATTGCCAGGATTCATCGCTT...5'

FIGURA 9