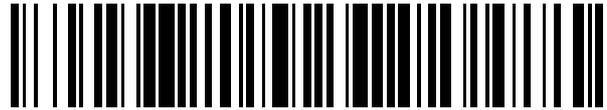


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 584 305**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/85** (2006.01)

**A61K 48/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.10.2002 E 10176209 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.05.2016 EP 2302063**

54 Título: **Minicélulas intactas como vectores para transferencia de ADN y terapia génica in vitro e in vivo**

30 Prioridad:

**15.10.2001 US 328801 P**

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

**27.09.2016**

73 Titular/es:

**ENGINEIC MOLECULAR DELIVERY PTY LTD.  
(100.0%)  
Building 2, 25 Sirius Road Lane Cove West  
Sydney NSW 2066, AU**

72 Inventor/es:

**BRAHMBHATT, HIMANSHU y  
MACDIARMID, JENNIFER**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 584 305 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Minicélulas intactas como vectores para transferencia de ADN y terapia génica *in vitro* e *in vivo*

**Antecedentes de la invención**

5 La presente invención se refiere a la administración, por medio de minicélulas bacterianas intactas, de oligonucleótidos y polinucleótidos a células huésped, particularmente, pero no exclusivamente, en el contexto de terapia génica. La invención también se refiere a un procedimiento farmacéuticamente compatible para purificar minicélulas bacterianas intactas.

10 Una patente de EE.UU. concedida a Salser y col., nº 4.497.796, esclarece diversos enfoques tempranos disponibles en aproximadamente 1980 para transformar células de mamífero. En particular, Salser y col. desvelan la transferencia de un gen que codifica dihidrofolato-reductasa, que confiere resistencia a metotrexato, a células L1210 de ratón o células de la médula ósea, por la técnica de co-precipitación de ADN con fosfato de calcio.

15 Salser y col. también mencionan “[otras] varias formas ... para la inserción de materiales genéticos en células” que incluyen, además de “vectores víricos”, ciertas técnicas de fusión de células: “fusión célula-célula que implica la fusión de células de un número limitado de cromosomas envueltos en membranas nucleares;... fusión de minicélulas;...fusión con protoplastos bacterianos que contienen ADN de plásmido; y fusión con fantasmas de eritrocitos encapsidados con ADN” (columna 5, líneas 18 - 30; citas omitidas). Común a estas técnicas es el uso de una estructura celular que contiene ADN, delimitada por una única membrana, es decir, puesta en contacto con una célula diana de mamífero en presencia de un agente promotor de la fusión de membranas tal como polietilenglicol (PEG). La célula de mamífero y la estructura celular se fusionan, formando una célula híbrida, y el ADN contenido en esta última se libera en el citoplasma de la primera y se transporta al núcleo del híbrido, que luego puede expresar el ADN.

25 La divulgación de Salser menciona “fantasmas de eritrocitos”, restos de eritrocitos que carecen de contenidos citoplásmicos pero que retienen la morfología original, y “protoplastos bacterianos”, o células bacterianas de las que se ha despojado la membrana externa (pared celular), normalmente por la acción de una enzima lítica o un antibiótico que inhibe la síntesis de peptidoglicanos. Salser y col. también aluden el uso de un tercer tipo de estructura celular simplificada, un protoplasto de minicélulas.

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

35 Además de las mutaciones del operón *min*, las minicélulas anucleadas también se generan siguiendo una gama de otras transposiciones o mutaciones genéticas que afectan la formación del tabique, por ejemplo, en *divIVB1* en *B. subtilis* (Reeve y Cornett, 1975; Levin y col., 1992). Las minicélulas también pueden formarse siguiendo una perturbación en los niveles de expresión génica de proteínas implicadas en la división celular/segregación de cromosomas. Por ejemplo, la expresión en exceso de *minE* conduce a división polar y producción de minicélulas. De manera similar, las minicélulas sin cromosomas pueden resultar de defectos en la segregación de cromosomas, por ejemplo, la mutación *smc* en *Bacillus subtilis* (Britton y col., 1998), delección de *spoOJ* en *B. subtilis* (Iretton y col., 1994), mutación *mukB* en *E. coli* (Hiraga y col., 1989) y mutación *parC* en *E. coli* (Stewart y D'Ari, 1992). Los productos génicos pueden suministrarse en *trans*. Si se expresan en exceso a partir de un plásmido de alto número de copias, por ejemplo, CafA puede potenciar la tasa de división celular y/o inhibir el reparto de cromosomas después de la replicación (Okada y col., 1994), produciendo la formación de células encadenadas y minicélulas anucleadas (Wachi y col., 1989; Okada y col., 1993).

45 Las minicélulas son distintas de otras vesículas pequeñas que se generan y se liberan espontáneamente en ciertas situaciones y, a diferencia de las minicélulas, no son debidas a transposiciones genéticas específicas o a expresión génica episómica. A modo de ejemplo de tales otras vesículas son bullas bacterianas, que son vesículas de membrana pequeñas (Dorward y col., 1989). Se han observado bullas en varias especies bacterianas de, por ejemplo, *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Bordetella*, *Escherichia*, *Neisseria*, *Pseudomonas*, *Salmonella* y *Shigella*. Las bullas bacterianas pueden producirse, por ejemplo, por manipulación del entorno de crecimiento (Katsui y col., 1982) y mediante el uso de agentes desestabilizantes de membranas exógenas (Matsuzaki y col., 1997).

55 Existen otros componentes subbacterianos tales como fantasmas bacterianos (Lubitz y col., 1999), que son envueltas bacterianas vacías formadas en una variedad de bacterias Gram-negativas cuando el gen E de lisis phiX174 se expresa. Los fantasmas bacterianos se forman a partir de una estructura en túnel transmembrana mediante una envuelta de la célula bacteriana. Debido a la alta presión osmótica dentro de la célula, el contenido citoplásmico es expulsado al medio circundante, conduciendo a una envoltura de la célula bacteriana vacía.

Debido a que la replicación de plásmidos dentro de células procariotas es independiente de la replicación cromosómica, los plásmidos pueden segregarse tanto en células hija normales como en minicélulas durante la división celular anormal descrita anteriormente. Por tanto, las minicélulas derivadas de *min<sup>-</sup> E. coli* recombinantes llevan números significativos de copias de plásmidos, con todos los componentes celulares bacterianos excepto los cromosomas, y se han usado como tales en estudiar la expresión génica codificada por plásmidos *in vitro*. Véase Brahmbhatt (1987), Harlow y col. (1995) y Kihara y col. (1996). Brahmbhatt (1987) demostró, por ejemplo, que las minicélulas de *E. coli* pueden llevar plásmidos recombinantes con insertos de ADN de hasta el 20 kb, ausente cualquier ADN cromosómico, y pueden expresar nueve o más proteínas recombinantes simultáneamente.

Tales minicélulas intactas no reproductoras, pero metabólicamente activas, se han empleado para analizar proteínas codificadas por genes transmitidos por plásmidos. En el contexto de la "fusión de minicélulas" mencionada por Salser y col., sin embargo, las minicélulas son despojadas de sus membranas externas para dar una estructura que, como un protoplasto bacteriano, puede experimentar fusión con una célula diana cuando ambas se incuban junto con PEG u otro agente que promueva la fusión celular. También al igual que los protoplastos bacterianos, tales protoplastos de minicélulas deben mantenerse bajo condiciones isotónicas con el fin de prevenir la lisis osmótica, y son altamente vulnerables al ataque enzimático. Por tanto, no son adecuados para terapia génica. Además, con la aparición de otra metodología de transformación más conveniente, la tecnología de minicélulas citada por Salser y col. cayó en desuso.

Más recientemente, la aparición de terapia génica ha puesto de relieve una variedad de procedimientos para introducir material genético exógeno en el genoma de un mamífero receptor. Véanse las revisiones por Romano y col. (1998, 1999), Balicki y Beutler (2002) y Wadhwa y col. (2002). La aplicación clínica de estas técnicas, tales como el uso de vectores de adenovirus o de retrovirus recombinantes, se ha retrasado debido a graves problemas de seguridad. Ahora son ilustrativos de los problemas presentados por la metodología de transformación la recombinación con virus naturales, inmunosupresión limitada inducida por virus de inserción y potencial oncogénico de los vectores víricos para llevar grandes segmentos de ADN terapéutico, reversión a virulencia de virus atenuados, dificultades en la preparación y distribución de virus recombinantes, baja estabilidad y reacciones adversas tales como una respuesta inflamatoria, producida por inmunidad existente. Un enfoque que obviara estos problemas ofrecería beneficio significativo en hacer que la terapia génica fuera más segura y más eficaz.

Los vectores bacterianos atenuados vivos también están siendo explotados como vectores de administración génica para terapia génica humana que incluyen *Salmonella* (Darji y col., 1997; Paglia y col., 2000; Urashima y col., 2000), *Shigella* (Sizemore y col., 1995; Grillot-Courvalin y col., 2002), *Listeria* (Dietrich y col., 1998) y *E. coli* invasiva (Grillot-Courvalin y col., 1998). Sin embargo, los vectores bacterianos tienen limitaciones significativas debido a que las bacterias vivas, aunque están atenuadas, deben manipularse para llevar mecanismos de lisis de la membrana del fagolisosoma, para permitir que suficiente ADN recombinante escape a la célula de mamífero citosol y de ahí al núcleo. Tal manipulación es difícil y puede ser imposible para muchos patógenos bacterianos intracelulares. Además, las mutaciones que atenúan los patógenos bacterianos son conocidas para sólo unos pocas especies bacterianas, por ejemplo, mutaciones en los genes de la biosíntesis de aminoácidos aromáticos para *Salmonella*, *E. coli* y *Shigella*.

Debido a que no se conocen mutaciones atenuantes para muchas especies bacterianas, un sistema de administración de genes bacterianos no puede explotar la amplia batería de patógenos intracelulares bacterianos. Los vectores bacterianos plantean un problema adicional con respecto a la presencia de ADN cromosómico debido a que partes de este ADN podrían transferirse a otra microflora en el huésped humano o animal que recibe la terapia génica. Tal transferencia de ADN promiscua entre especies bacterianas es no deseable debido a una posible emergencia de nuevas bacterias virulentas y/o resistentes a fármacos.

### **Sumario de la invención**

Para tratar estas y otras necesidades, la presente invención proporciona, según un aspecto, una composición que comprende (i) minicélulas bacterianas intactas recombinantes y (ii) un vehículo farmacéuticamente aceptable para las mismas, en la que dichas minicélulas contienen una molécula de ácido nucleico terapéutico (que codifica, por ejemplo, interleucina-2) y en la que dicha composición está libre de bullas bacterianas de 0,2  $\mu\text{m}$  o menos de tamaño. En una realización preferida, la composición contiene menos de una célula parental contaminante por  $10^7$ ,  $10^8$  ó  $10^9$  minicélulas.

La invención también proporciona una composición que consiste esencialmente en minicélulas bacterianas intactas recombinantes que contienen una molécula de ácido nucleico terapéutico, en la que dicha composición está libre de bullas bacterianas de 0,2  $\mu\text{m}$  o menos de tamaño.

Según la invención, también se proporcionan minicélulas bacterianas intactas recombinantes que contienen una molécula de ácido nucleico terapéutico, para uso como fármaco, en la que dichas minicélulas están libres de bullas bacterianas de 0,2  $\mu\text{m}$  o menos de tamaño.

Según otro aspecto, la presente invención proporciona un uso de minicélulas bacterianas intactas recombinantes en la preparación de un medicamento, conteniendo las micelas una molécula de ácido nucleico terapéutico, para uso en

un procedimiento de tratamiento de un cáncer, en el que dichas minicélulas contienen una molécula de ácido nucleico terapéutico y en el que dicho medicamento está libre de bullas bacterianas de 0,2 µm o menos de tamaño.

5 Dichas minicélulas bacterianas intactas pueden también encontrar uso similar en el tratamiento de una enfermedad adquirida, tal como SIDA, neumonía, enfisema o una afección engendrada por una metabolopatía congénita, tal como fibrosis quística. Alternativamente, el tratamiento puede afectar a un rasgo, tal como la fertilidad, o una respuesta inmunitaria asociada a un alérgeno o un agente infeccioso.

10 La invención también proporciona, con arreglo a otro aspecto, un procedimiento de transformación genética que comprende (i) proporcionar minicélulas bacterianas intactas recombinantes que contienen una molécula de ácido nucleico terapéutico y (ii) poner dichas minicélulas en contacto *in vitro* con células de mamífero competentes para endocitosis no fagocíticas, de forma que dichas minicélulas bacterianas sean reabsorbidas por dichas células de mamífero, preparando así células de mamífero que contienen dicho ácido nucleico terapéutico.

Otros aspectos y realizaciones de la presente invención aparecen de las reivindicaciones.

15 El plásmido anteriormente mencionado también puede contener un segundo segmento de ácido nucleico que sirve de elemento regulador tal como un promotor, un terminador, un potenciador o una secuencia señal, y que está operativamente ligado al primer segmento de ácido nucleico. Además, el plásmido puede contener un elemento indicador tal como un segmento de ácido nucleico que codifica proteína verde fluorescente.

20 También se describe un procedimiento de purificación que comprende pasar una muestra que contiene minicélulas (i) sobre una serie de filtros de flujo cruzado y luego (ii) por un filtro frontal, por lo que las minicélulas se separan de contaminantes en dicha muestra para obtener una preparación de minicélulas purificada. El procedimiento incluye opcionalmente un tratamiento de la preparación de minicélulas purificada con un antibiótico. También es opcional una etapa preliminar de realizar centrifugación diferencial en la muestra que contiene minicélulas. En una realización preferida, la serie de filtros de flujo cruzado comprende (A) al menos uno o dos filtros que emplean un tamaño de poro superior a o igual a aproximadamente 0,45 µm y (B) al menos un filtro que emplea un tamaño de poro inferior a o igual a aproximadamente 0,2 µm.

## 25 **Breve descripción de los dibujos**

La **Figura 1** muestra una ilustración esquemática de la división celular normal en una bacteria y cómo las mutaciones en los genes *min* producen la formación de minicélulas.

30 La **Figura 2** muestra un diagrama esquemático de la preparación de plásmidos útiles para generar una cepa bacteriana productora de minicélulas. En particular, esta figura muestra una construcción de plásmido para generar una cepa productora de minicélulas derivada de *S. typhimurium*. Se muestran dibujos de líneas de ADN de insertos clonados y partes de vectores de plásmido circulares. Los nombres de los plásmidos se muestran en negrita a la izquierda de los ADN de insertos y dentro de mapas de vectores circulares. Si se usan cebadores de PCR en la generación de un clon, los números de los cebadores se muestran adyacentes a la flecha de guiones.

35 La **Figura 3** muestra un diagrama esquemático de la preparación de plásmidos útiles para generar una cepa bacteriana productora de minicélulas. En particular, esta figura muestra una construcción de plásmido para generar una cepa productora de minicélulas derivada de *Shigella flexneri 2a*.

40 La **Figura 4** muestra un diagrama esquemático de preparación de plásmidos útiles para generar una cepa bacteriana productora de minicélulas. En particular, esta figura muestra una construcción de plásmido para generar una cepa productora de minicélulas derivada de *Listeria monocytogenes*.

La **Figura 5** muestra imágenes de TEM de células de macrófagos de ratón transfectadas con minicélulas derivadas de *S. typhimurium*. Para cada panel se proporcionan el tiempo después de la infección y los aumentos. Las imágenes muestran partículas densas en electrones similares a minicélulas (flechas) dentro de vacuolas de macrófagos.

45 La **Figura 6** muestra la administración de genes mediada por minicélulas a células de cáncer de mama humano y expresión génica heteróloga. El panel A muestra la línea celular de cáncer de mama de control SK-BR-3 96 horas después de la transfección con minicélulas no recombinantes y anticuerpo anti-HER-2 marcado, detectadas con anticuerpo secundario conjugado con Alexafluor. El panel B muestra la expresión de GFP en células SK-BR-3 96 horas después de la transfección con minicélulas recombinantes que llevan el plásmido pEGFP-C1 (expresión eucariota de GFP). El panel C muestra células SK-BR-3 transfectadas con minicélulas/pEGFP-C1, marcadas con anticuerpo anti-HER-2 y detectadas con anticuerpo secundario conjugado con Alexafluor. Las imágenes se visualizaron con microscopía confocal.

50 La **Figura 7** muestra la respuesta anti-GFP de suero de ratón 14 días después de la administración intraperitoneal de minicélulas recombinantes y células parentales de *S. typhimurium* muertas que llevan el plásmido pEGFP-C1. En la leyenda y en las leyendas de las Figuras 8 - 10, 10<sup>8</sup> y 10<sup>9</sup> representan 10<sup>8</sup> y 10<sup>9</sup>,

respectivamente.

La **Figura 8** muestra la respuesta de anti-LPS de suero de ratón 14 días después de la administración intraperitoneal de minicélulas recombinantes, y células parentales de *S. typhimurium* muertas que llevan el plásmido pEGFP-C1.

- 5 La **Figura 9** muestra la respuesta anti-GFP de suero de ratón 14 días después de la administración intraperitoneal de minicélulas recombinantes que llevan el plásmido pEGFP-C1.

La **Figura 10** muestra la respuesta de anti-LPS de suero de ratón 14 días después de la administración intraperitoneal de minicélulas recombinantes que llevan el plásmido pEGFP-C1.

#### **Descripción detallada de realizaciones preferidas**

- 10 Los presentes inventores han determinado que las minicélulas con paredes celulares intactas (“minicélulas intactas”) son vectores eficaces para administrar oligonucleótidos y polinucleótidos (en conjunto, “moléculas de ácidos nucleicos”) a células huésped (preferentemente células de mamífero en seres humanos o animales) *in vitro* e *in vivo*. Por tanto, los inventores han encontrado que una minicélula intacta es reabsorbida por células de mamífero que asimismo reabsorben la célula bacteriana de la que se obtuvo la minicélula (la “célula bacteriana parental”). Además,  
15 se ha descubierto que, sorprendentemente, el contenido de una minicélula recombinante intacta, cuando es reabsorbida por una célula huésped, se procesa de tal forma que al menos algo del ADN de plásmido de la minicélula escapa de la degradación y es transportado por el citoplasma al núcleo de la célula huésped, que luego puede expresar el ADN de plásmido.

- 20 Por tanto, la invención permite que una minicélula intacta que lleva un ADN para el que se desea la expresión heteróloga, tanto *in vitro* como *in vivo*, se ponga en contacto con una célula de mamífero que reabsorbe la célula bacteriana parental a manera de los patógenos bacterianos intracelulares. De igual modo, esa célula de mamífero, denotada aquí “competente de reabsorción”, reabsorbe la minicélula y expresa el ADN en cuestión.

- 25 Diversos mecanismos puede participar en la reabsorción de las minicélulas intactas por un tipo dado de célula huésped, y la presente invención no depende de ningún mecanismo particular a este respecto. Por ejemplo, la fagocitosis es un procedimiento bien documentado en el que los macrófagos y otras células de fagocito tales como neutrófilos ingieren partículas extendiendo pseudópodos sobre la superficie de la partícula hasta que la partícula es totalmente envuelta. Aunque se describe como fagocitosis “no específica”, se ha demostrado la participación de receptores específicos en el procedimiento. Véase Wright & Jong (1986); Speert y col. (1988).

- 30 Por tanto, una forma de fagocitosis implica la interacción entre ligandos de superficie y receptores de ligandos localizados en las membranas de los pseudópodos (Shaw y Griffin, 1981). Se cree que esta etapa de unión, mediada por los receptores específicos, es dependiente de las adhesinas de la superficie bacteriana. Con respecto a bacterias menos virulentas tales como *E. coli* no enterotoxigénica, la fagocitosis también puede producirse en ausencia de ligandos de superficie para receptores de fagocitos. Véase, por ejemplo, Pikaar y col. (1995). Por tanto, la presente invención engloba, pero no se limita a, el uso de minicélulas intactas que tanto poseen como carecen  
35 adhesinas de superficie, de acuerdo con la naturaleza de sus células bacterianas parentales, y son reabsorbidas por fagocitos (es decir, células huésped “competentes para fagocitosis”), de las que los neutrófilos y macrófagos son los tipos primarios en mamíferos.

- 40 Otro procedimiento de reabsorción es la endocitosis, por la que patógenos intracelulares ejemplificados por especies de *Salmonella*, *Escherichia*, *Shigella*, *Helicobacter*, *Pseudomonas* y *Lactobacilli* entran en las células epiteliales de mamífero y allí se replican. Dos mecanismos básicos a este respecto son endocitosis mediada por receptor dependiente de clatrina, también conocida como “endocitosis por hoyos recubiertos” (Riezman, 1993), y endocitosis independiente de clatrina (Sandvig & Deurs, 1994). Cualquiera de ellas o ambas pueden participar cuando una célula competente para reabsorción que actúa por endocitosis (es decir, una célula huésped “competente para endocitosis”) reabsorbe minicélulas recombinantes intactas y expresa ADN llevado por las minicélulas, según la  
45 invención. Células competentes para endocitosis representativas son células epiteliales de mama, enterocitos en el tracto gastrointestinal, células epiteliales del estómago, células epiteliales de pulmón y células epiteliales de las vías urinarias y vejiga.

- 50 La presente invención es particularmente útil para la introducción de moléculas de ácidos nucleicos en células competentes para reabsorción que, tras la transcripción y/o traducción, sirven para mejorar o de otro modo tratar una enfermedad o modificar una característica asociada a un tipo de célula particular, tejido u órgano de un sujeto. Para los fines de la presente descripción, estas moléculas se clasifican como “moléculas terapéuticas de ácidos nucleicos”.

- 55 Por ejemplo, la transcripción o traducción de una molécula terapéutica dada de ácido nucleico puede ser útil en el tratamiento de cáncer o una enfermedad adquirida tal como SIDA, neumonía, enfisema, o en la corrección de metabopatías congénitas tales como fibrosis quística. La transcripción o traducción de un ácido nucleico terapéutico también puede efectuar la esterilización anticonceptiva, que incluye esterilización anticonceptiva de animales salvajes. Los trastornos inflamatorios mediadas por alérgenos y mediados por agentes infecciosos también

pueden contrarrestarse administrando mediante la presente invención una molécula terapéutica de ácido nucleico que, tras la expresión en un paciente, afecta la (s) respuesta(s) inmunitaria(s) asociada(s) al alérgeno y al agente infeccioso, respectivamente. Una molécula terapéutica de ácido nucleico también puede tener un producto de expresión, o aquí puede ser un producto en la dirección 3' después de la modificación traduccional del producto de expresión, que reduce las secuelas inmunológicas relacionadas con trasplante o que ayuda a facilitar el crecimiento y la regeneración de tejido.

Alternativamente, el producto de expresión o un agente de después de la traducción relacionado, puede ser una proteína, tipificada por eritropoyetina, un factor de crecimiento tal como TGF- $\beta$ , una citocina tal como IL-2, IL-10, IL-12 u otra de las interleucinas, un inhibidor de la leucoproteínasa del suero, o un anticuerpo tal como CTLA4-Ig, que proporciona un beneficio deseado para el huésped. Otras proteínas tales son, sin limitación,  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -globina, insulina, GM-CSF, M-CSF, G-CSF, EPO, TNF, MGF, adenosina-desaminasa, antígenos asociados a tumores tales como antígenos víricos, mutados o expresados anormalmente (CDK4,  $\beta$ -catenina, GnT-V, Casp8), antígenos específicos del cáncer tales como MAGE, BAGE, GAGE, PRAME y NY-ESO-1, antígenos de diferenciación tales como tirosinasa, Melan-A/MART-1, gp100 y TRP-1/gp75, y antígenos expresados en exceso tales como Her2/neu y CEA. Otros ejemplos de la clase de moléculas terapéuticas de ácidos nucleicos son ADN que codifican el regulador transmembrana de la fibrosis quística (CFTR), factor VIII u otra proteína de la sangre, receptor de la lipoproteína de baja densidad,  $\beta$ -glucocerebrosidasa,  $\alpha$ - y  $\beta$ -galactosidasa, insulina, hormona paratiroide,  $\alpha$ -1-antitripsina, *fasR* y *fasL*, respectivamente.

Según la presente invención, la expresión de una molécula terapéutica de ácido nucleico por una célula huésped puede proporcionar un compuesto necesario, mediar en una respuesta inmunitaria elegida como diana o interrumpir un procedimiento patológico. Por ejemplo, una molécula terapéutica de ácido nucleico puede implicarse en una terapia antisentido o con ribozimas. En el presente contexto, una terapia antisentido implica introducir, con arreglo a la invención, una copia antisentido de una secuencia de polinucleótidos, de forma que el ARN transcrito de la copia se hibride *in situ* con un transcrito de ARN mensajero (ARNm) que se corresponde con la secuencia de polinucleótidos. Esta hibridación normalmente evita que el transcrito se traduzca en una proteína o inicie una ruta de degradación que destruya el ARNm.

El ácido nucleico terapéutico también puede codificar dúplex de ARN interferente pequeño (ARNip) dentro de una célula de mamífero. Es decir, se ha mostrado que los ARNip suprimen genes diana en células de mamífero. Este procedimiento de ARN interferente (ARNi) es un procedimiento de silenciamiento de genes después de la transcripción específica de secuencia en animales, seres humanos y plantas y se inicia por ARN bicatenario (b) que es homólogo al gen silenciado. Se ha demostrado satisfactoriamente la administración mediada por virus de ARNip para reducir específicamente la expresión de genes elegidos como diana en diversos tipos de células (Haibin y col., 2002).

Para todos estos usos y otros usos diversos de una molécula terapéutica de ácido nucleico, la presente descripción emplea la rúbrica de "terapia génica", que también es connotada por los términos "transferencia de genes", "administración de genes" y "vacunas basadas en genes", en relación con la metodología o sistemas para transferir una molécula terapéutica de ácido nucleico a células huésped, tanto *in vivo* como *ex vivo*, como se describe, por ejemplo, en la patente de EE.UU. nº 5.399.346. Por tanto, una composición que contiene minicélulas de la presente invención puede usarse para lograr un efecto terapéutico *in situ* y para transformar células fuera del cuerpo y luego (re)introducirlas a un sujeto. Con arreglo a la presente invención, las células adecuadas para tanto enfoques *in vivo* como *ex vivo* serían aquellas que son competentes para la reabsorción tales como fagocitos y células epiteliales.

Como se ha observado anteriormente, la terapia génica puede efectuarse para tratar o prevenir una enfermedad o afección genética o adquirida. La molécula terapéutica de ácido nucleico codifica un producto, tal como ARN funcional (por ejemplo, antisentido o ARNip), o un péptido, polipéptido o proteína cuya producción *in vivo* se desea. Por ejemplo, el material genético de interés puede codificar una hormona, receptor, enzima o (poli)péptido de valor terapéutico. Tales procedimientos pueden producir expresión transitoria de ADN transferido no integrado, replicación extracromosómica y expresión de replicones transferidos tales como episomas, o integración de material genético transferido en el ADN genómico de células huésped.

Una molécula terapéutica de ácido nucleico puede ser el homólogo normal de un gen que expresa una proteína que funciona anormalmente o que está presente en niveles anormales en un estado de enfermedad, como es el caso, por ejemplo, con el regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística en fibrosis quística (Kerem y col., 1989; Riordan y col., 1989; Rommens y col., 1989), con  $\beta$ -globina en anemia de células falciformes y con cualquiera de  $\alpha$ -globina,  $\beta$ -globina y  $\gamma$ -globina en talasemia. La molécula terapéutica de ácido nucleico puede tener una transcrito de ARN antisentido o ARN interferente pequeño, como se han mencionado anteriormente. Por tanto, una producción en exceso de  $\alpha$ -globina con respecto a  $\beta$ -globina que caracteriza  $\beta$ -talasemia puede mejorarse por terapia génica, según la presente invención, usando una minicélula intacta manipulada para contener un plásmido que incorpora una secuencia que tiene un transcrito de ARN antisentido con respecto a una secuencia diana del ARNm de  $\alpha$ -globina.

En el tratamiento de cáncer, una molécula terapéutica de ácido nucleico adecuada para su uso según la presente invención podría tener una secuencia que se corresponde con o se deriva de un gen que está asociado a supresión

tumoral tal como el gen *p53*, el gen de retinoblastoma y el gen que codifica factor de necrosis tumoral. Una amplia variedad de tumores sólidos - cáncer, papilomas y condilomas - deben ser tratables por este enfoque, con arreglo a la invención. Cánceres representativos a este respecto incluyen carcinoma de colon, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de piel, cáncer de hígado, cáncer de hueso, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, 5 cáncer cerebral, cáncer de cabeza y cuello y linfoma. Papilomas ilustrativos son papiloma de células escamosas, papiloma del plexo coroideo y papiloma de laringe. Ejemplos de afecciones de condiloma son condilomas genitales, condilomas plantares, epidermodisplasia verruciforme y condilomas malignos.

Una molécula terapéutica de ácido nucleico para la presente invención también puede comprender un segmento de ADN que codifica una enzima que convierte un profármaco inactivo en uno o más metabolitos citotóxicos de manera 10 que, tras la introducción *in vivo* del profármaco, la célula diana es en efecto obligada, quizás también con células vecinas, a suicidarse. Las aplicaciones preclínicas y clínicas de un "gen suicida" tal que puede ser de origen no humano o de origen humano son revisadas por Spencer (2000), Shangara y col. (2000) y Yazawa y col. (2002). Genes suicidas de origen no humano ilustrativos son aquellos que codifican HSV-timidina-cinasa (tk), citosina-desaminasa (CDA) + uracil-fosforribosiltransferasa, xantina-guanina-fosforribosil-transferasa (GPT), nitroreductasa (NTR), purina-nucleósido-fosforilasa (PNP, DeoD), citocromo P450 (CYP4B1), carboxipeptidasa G2 (CPG2) y D-aminoácido-oxidasa (DAAO), respectivamente. Genes suicidas de origen humano se ejemplifican por genes que 15 codifican carboxipeptidasa A1 (CPA), desoxicitidina-cinasa (dCK), citocromo P450 (CYP2B1.6), LNGFR/FKBP/Fas, FKBP/caspasas y ER/p53, respectivamente. Una terapia con genes suicidas podría aplicarse al tratamiento del SIDA. Esta estrategia se ha probado con vectores suicidas que expresan un producto génico tóxico tan pronto como las células de mamífero tratadas se infectan por el VIH-1. Estos vectores usan elementos reguladores del VIH-1, Tat y/o Rev, para inducir la expresión de un gen tóxico tal como la toxina  $\alpha$ -diftérica, citosina-desaminasa o interferón- $\alpha$ 2 después de la infección por el VIH-1 (Curiel y col., 1993; Dinges y col., 1995; Harrison y col., 1992a; Harrison y col., 1992b; Ragheb y col., 1999). Las células podrían transducirse por estos vectores usando el enfoque de minicélulas recombinantes de la presente invención, y se eliminarían más rápido que las células sin transducir después de la 20 infección por el VIH, previniendo la replicación vírica a expensas de la muerte celular.

Una molécula de ácido nucleico que va a introducirse puede incluir un elemento indicador. Un elemento indicador confiere a su huésped recombinante un fenotipo o característica fácilmente detectable, normalmente codificando un polipéptido, no producido de otro modo por el huésped, que puede detectarse tras la expresión por análisis 30 histológico o *in situ* tal como por técnicas de obtención de imágenes *in vivo*. Por ejemplo, un elemento indicador administrado por una minicélula intacta, según la presente invención, podría codificar una proteína que produce en la célula huésped en reabsorción un cambio colorimétrico o fluorométrico que es detectable por análisis *in situ* y que es una función cuantitativa o semi-cuantitativa de activación transcripcional. Ilustrativo de estas proteínas son esterasas, fosfatasas, proteasas y otras enzimas, generando la actividad un cromóforo o fluoróforo detectable.

Ejemplos preferidos son  $\beta$ -galactosidasa de *E. coli*, que produce un cambio de color por escisión de un sustrato indigogénico, indolil- $\beta$ -D-galactosida y una luciferasa que oxida un aldehído de cadena larga (luciferasa bacteriana) o un ácido carboxílico heterocíclico (luciferina), con la liberación concomitante de luz. En este contexto también es útil un elemento indicador que codifica la proteína verde fluorescente (GFP) de medusa, *Aequorea victoria*, como se describe por Prasher y col. (1995). El campo de la tecnología relacionada con GFP se ilustra por dos solicitudes PCT publicadas, WO 095/21191 (desvela una secuencia de polinucleótidos que codifica una apoproteína de GFP de 238 40 aminoácidos que contiene un cromóforo formado a partir de los aminoácidos 65 a 67) y WO 095/21191 (desvela una modificación del ADNc para el apopéptido de *A. victoria* GFP, proporcionando un péptido que tiene propiedades fluorescentes alteradas), y por un informe de Heim y col. (1994) de una GFP mutante, caracterizada por una mejora de 4 a 6 veces en la amplitud de excitación.

Otro tipo de elemento indicador está asociado a un producto de expresión que hace que la minicélula recombinante se vuelva resistente a una toxina. Por ejemplo, el gen *neo* protege un huésped contra niveles tóxicos del antibiótico G418, mientras que un gen que codifica dihidrofolato-reductasa confiere resistencia a metotrexato, y el gen cloranfenicol-acetiltransferasa (CAT) confiere resistencia a cloranfenicol. 45

Otros genes para su uso como elemento indicador incluyen aquellos que pueden transformar una minicélula huésped para expresar antígenos de superficie de la célula diferentes, por ejemplo, proteínas de la envuelta vírica tales como gp120 del VIH o gD del herpes, que son fácilmente detectables por inmunoensayos. 50

Una molécula de ácido nucleico que va a introducirse también puede tener un segmento de codificación deseado ligado operativamente a un elemento regulador tal como un promotor, un terminador, un potenciador y/o una secuencia señal. Un promotor adecuado puede ser específico de tejido, o incluso específico de tumor, como dicta el contexto terapéutico.

Un promotor es "específico de tejido" cuando se activa preferencialmente en un tejido dado y, de ahí, que sea eficaz en accionar la expresión en el tejido diana de una secuencia estructural operativamente ligada. La categoría de promotores específicos de tejido incluye, por ejemplo: el promotor específico de hepatocitos para albúmina y  $\alpha$ -antitripsina, respectivamente; la región de control del gen de elastasa I, que es activa en células acinares pancreáticas; la región de control del gen de insulina, activa en células beta pancreáticas; la región de control del virus de tumor mamario de ratón, que es activa en células testiculares, de mama, linfoides y mastocitos; la región de 60

control del gen de la proteína básica de mielina, activa en células de oligodendrocito en el cerebro; y la región de control de la hormona liberadora gonadotrópica, que es activa en células del hipotálamo. Véase Frain y col. (1990), Ciliberto y col. (1985), Pinkert y col., (1987), Kelsey y col. (1987), Swift y col. (1984), MacDonald (1987), Hanahan, (1985), Leder y col. (1986), Readhead y col. (1987) y Mason y col. (1986).

- 5 También hay promotores que se expresan de manera preferencial en ciertas células tumorales o en células tumorales por sí mismas, y que son útiles para tratar diferentes cánceres según la presente invención. La clase de promotores que son específicos para células cancerosas se ilustra por: el promotor de tirosinasa, para elegir como diana melanomas; el promotor MUC1/Df3, para elegir como diana carcinoma de mama; el potenciador de *myoD*/promotor del SV40 híbrido, que elige como diana la expresión de rhabdomyosarcoma (RMS); el promotor del antígeno carcinoembrionario (CEA), que es específico para células que expresan CEA tales como células de cáncer de colon, y el promotor del gen de hexocinasa tipo II, para elegir como diana carcinomas de pulmón de células no pequeñas. Véase Hart (1996), Morton & Potter (1998), Kurane y col. (1998) y Katabi y col. (1999).

- 15 Una secuencia señal puede usarse para producir la secreción de un producto de expresión o localización de un producto de expresión en un compartimento celular particular. Por tanto, una molécula de polinucleótido terapéutica que es administrada por minicélulas intactas puede incluir una secuencia señal, en marco de lectura adecuado, de forma que el producto de expresión de interés es secretado por una célula de reabsorción o su progenie, influyendo así en las células circundantes, de acuerdo con el paradigma de tratamiento elegido. Secuencias señal ilustrativas incluyen la secuencia de secreción del extremo C de hemolisina, descrita en la patente de EE.UU. n° 5.143.830, la secuencia de secreción de BAR1, desvelada en la patente de EE.UU. n° 5.037.743, y la porción de la secuencia señal del polipéptido zsig32, descrita en la patente de EE.UU. n° 6.025.197.

- 20 La capacidad de minicélulas recombinantes intactas de la invención para mantener la integridad *in vivo* hace posible su uso en terapia génica, como se ha descrito anteriormente. Las minicélulas intactas tampoco llevan nada del ADN genómico bacteriano que está presente en células bacterianas recombinantes, por ejemplo, de *Shigella flexneri*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* o *Salmonella typhimurium*, que otros han usado para transferir plásmidos de expresión eucariotas en células huésped. Véase Sizemore y col. (1995); Gentschev y col. (2000); Catic y col. (1999); Dietrich y col. (1998); y Courvalin y col. (1995). Por consiguiente, la terapia génica con minicélulas intactas, con arreglo a la presente invención, no entraña el riesgo, asociado a un uso de las bacterias recombinantes, de la transferencia no deliberada de un gen bacteriano o marcador de resistencia a antibióticos a flora microbiana que es autóctona del paciente. Además, las bacterias recombinantes deben sacarse del paciente por medio de inmunidad mediada por célula y, de ahí que no sean adecuadas para terapia génica de un paciente inmunodeprimido que padece, por ejemplo, cáncer o SIDA.

Las minicélulas pueden prepararse a partir de cualquier célula bacteriana de origen Gram-positivo o Gram-negativo. Debido a que la presente invención emplea minicélulas intactas, en vez de protoplastos de minicélulas, la presente invención no requiere y preferentemente no implica ningún antibiótico o pretratamiento químico de minicélulas.

- 35 Una cepa bacteriana productora de minicélulas puede generarse por mutación de un gen *min*, por ejemplo, mediante una delección parcial de una secuencia génica de *minCDE* como se ilustra en los Ejemplos 1 y 2 más adelante. Para obtener minicélulas intactas recombinantes según la invención, células bacterianas de la cepa productora de minicélulas elegida se transforman por una técnica convencional que incluye, pero no se limita a, el uso de electroporación (Shigekawa & Dower, 1988), metodología química (Hanahan, 1983), vectores lanzadera (Marcil & Higgins, 1992) y conjugación (Firth y col., 1996) o transducción (Davis y col., 1980). Para esta transformación, una molécula terapéutica de ácido nucleico de cualquier fuente eucariota, procariota o sintética se inserta en un vector de plásmido adecuado, comercialmente disponible o patentado por el usuario final. Un ADN seleccionado puede ligarse operativamente a los elementos de control requeridos para la administración de genes y/o expresión del ADN en las células que reabsorben las minicélulas recombinantes *in vivo*.

- 45 Las minicélulas recombinantes se analizan preferentemente *in vitro* para garantizar que pueden liberar el plásmido recombinante o secuencias de ADN al núcleo de la célula diana, y que la expresión génica recombinante se produce en la célula diana. El ensayo para la expresión dependerá de la naturaleza del gen heterólogo. La expresión puede monitorizarse mediante una variedad de procedimientos que incluyen ensayos inmunológicos, histoquímicos o de actividad. La expresión de un gen marcador fluorescente puede visualizarse microscópicamente, y esto proporciona un ensayo particularmente conveniente. Por ejemplo, el gen que codifica proteína de fluorescencia verde bajo el control de un promotor de la expresión génica eucariota, tal como el promotor del CMV, puede transferirse sobre un plásmido por minicélulas recombinantes para elegir como diana células eucariotas (véase más adelante). Adicionalmente, puede usarse análisis de transferencia Northern o PCR con transcriptasa inversa (RT-PCR) para evaluar la transcripción usando sondas de ADN o ARN apropiadas. Si los anticuerpos para el polipéptido codificado por el gen heterólogo están disponibles, el análisis de transferencia Western, la inmunohistoquímica u otras técnicas inmunológicas pueden usarse para evaluar la producción del polipéptido. También pueden usarse ensayos bioquímicos apropiados si el gen heterólogo es una enzima. Por ejemplo, si el gen heterólogo codifica resistencia a antibióticos, entonces puede usarse una determinación de la resistencia de células infectadas al antibiótico para evaluar la expresión del gen de resistencia a antibióticos.

60

La competencia por reabsorción de una célula huésped putativa (“diana”) puede evaluarse probando la eficacia de la liberación de ADN en cultivo. Por tanto, un tumor elegido como diana podría someterse a biopsia, y la muestra resultante de tejido se usaría, de manera convencional, para obtener células tumorales representativas en cultivo, para probar una capacidad para reabsorber minicélulas recombinantes de la presente invención que llevan, por ejemplo, un elemento indicador adecuado. Adicionalmente o alternativamente para probar un cultivo celular primario tal, puede evaluarse la capacidad para reabsorber minicélulas probando una línea celular que es representativa del tipo de tejido al que el protocolo terapéutico está adaptado, con arreglo a la presente invención. Las técnicas de cultivo celular están bien documentadas, por ejemplo, por Freshner (1992).

Pueden purificarse minicélulas recombinantes a partir de células parentales por varios medios. Un enfoque usa metodología de gradiente de sacarosa descrita, por ejemplo, por Reeve (1979) y por Clark-Curtiss y col. (1983), seguido de tratamiento con un antibiótico, tal como gentamicina (200 µg/ml, 2 horas), para destruir bacterias vivas residuales.

Con la metodología convencional, la pureza alcanzada es una célula parental contaminante por  $10^6$  a  $10^7$  minicélulas, como mucho. Para aplicaciones *in vivo*, según la presente invención, pueden requerirse dosis superiores a  $10^6$  y pueden ser de hasta  $10^{10}$  por dosis, que, con la relación de contaminación anteriormente mencionada, se traduciría en 10.000 células parentales vivas por dosis. Un nivel de contaminación tal sería mortal, particularmente en sujetos inmunodeprimidos.

Además, la tecnología convencional emplea medios que contienen un agente de formación en gradiente tal como sacarosa, glicerol o Percoll<sup>®</sup> cuya presencia es no deseable para usos *in vivo*, como se ha contemplado actualmente. Por tanto, la toxicidad de Percoll<sup>®</sup> lo restringe a contextos de “sólo fines de investigación”, mientras que la sacarosa para un gradiente confiere una alta osmolaridad que puede producir cambios fisiológicos en las minicélulas.

Por tanto, para aplicaciones de terapia génica es preferible minimizar la contaminación por células parentales y usar medios que son más biológicamente compatibles. Para lograr estos objetivos, los presentes inventores han encontrado inesperadamente ventajoso combinar filtración de flujo cruzado (el flujo alimentado es paralelo a una superficie de la membrana) y filtración frontal (el flujo alimentado es perpendicular a la superficie de la membrana). Generalmente, véase Forbes (1987). Opcionalmente, esta combinación puede ir precedida de una centrifugación diferencial, a baja fuerza centrífuga para eliminar alguna porción de las células bacterianas y así enriquecer el sobrenadante en minicélulas. También opcionalmente, la combinación puede ir seguida de un tratamiento con antibiótico para destruir células parentales bacterianas residuales.

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

La aplicación eficaz de filtración de flujo cruzado en este contexto normalmente conlleva al menos una etapa que implica un mayor tamaño de poro, aproximadamente 0,45 µm, seguido de al menos una etapa con un menor tamaño de poro, aproximadamente 0,2 µm. Entre o durante las etapas de filtración de flujo cruzado en serie, la diafiltración puede realizarse para maximizar la recuperación de minicélulas.

El uso de filtración de flujo cruzado acomoda suspensiones que llevan cargas pesadas de materia particulada, tal como cultivos bacterianos, que pueden llevar cargas de  $10^{11}$  a  $10^{13}$  poblaciones bacterianas y de minicélulas por litro de cultivo. Para minimizar el plegamiento del filtro y la consecuente pérdida de minicélulas, el cultivo bacteriano/de minicélulas puede diluirse, preferentemente de 5 veces a 10 veces. Las diluciones también permiten el uso de presión atmosférica y velocidad de flujo apropiadamente bajas.

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

Generalmente, la filtración proporciona una preparación de minicélulas estéril adecuada para estudios de transferencia de genes. Para la transferencia de genes *in vivo*, un tratamiento con antibiótico se realiza preferentemente adicionalmente para reducir los riesgos de contaminación por células bacterianas. Por ejemplo, las minicélulas pueden resuspenderse en medio de crecimiento que contiene un antibiótico al que es sensible la cepa bacteriana parental. La cantidad apropiada de un antibiótico dado para este fin puede determinarse de antemano por técnicas convencionales.

Una disposición en serie de filtración de flujo cruzado/filtración frontal, como se ha descrito, no sólo prescinde del uso de agentes de formación de gradiente, sino que también proporciona una pureza que supera  $10^{-7}$  (es decir, menos de una célula parental por  $10^7$  minicélulas). Preferentemente, la pureza supera  $10^{-8}$  y, más preferentemente, está en el orden de aproximadamente  $10^{-9}$ . La disposición en serie de la filtración de flujo cruzado/filtración frontal también proporciona mejor control de calidad. Además, no hay necesidad de un gen de resistencia a ampicilina, cicloserina u otro antibiótico, según se requiera por la técnica de Clarke-Curtiss y Curtiss (1983). Además, el enfoque de purificación en serie no emplea radiación que dañe el ADN, a diferencia de una metodología descrita por Sancar y col. (1979); por tanto, una molécula terapéutica de ácido nucleico administrada con minicélulas preparadas por una disposición en serie de filtración de flujo cruzado/filtración frontal puede estar libre de mutación no específica inducida por radiación.

Una composición que consiste esencialmente en minicélulas recombinantes de la presente invención (es decir, una composición que incluye tales minicélulas con otros constituyentes que no interfieren excesivamente con la calidad de liberación de ADN de la composición) puede formularse de manera convencional usando uno o más vehículos o excipientes fisiológicamente aceptables. Formulaciones para inyección pueden presentarse en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas o viales, o en recipientes de múltiples dosis, con o sin un conservante añadido. La formulación puede ser una solución, una suspensión o una emulsión en vehículos aceitosos o acuosos, y puede contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Una solución adecuada es isotónica con la sangre del receptor y se ilustra por solución salina, solución de Ringer y solución de dextrosa. Alternativamente, las minicélulas pueden estar en forma de polvo liofilizado para reconstitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua libre de pirógenos estéril o solución salina fisiológica. Las minicélulas también pueden formularse como una preparación de depósito. Tales formulaciones de acción prolongada pueden administrarse por implantación (por ejemplo, subcutáneamente o intramuscularmente) o por inyección intramuscular.

Una composición que contiene minicélulas de la presente invención puede administrarse por diversas vías y a diversos sitios en un cuerpo de mamífero para lograr el (los) efecto(s) terapéutico(s) deseado(s), tanto localmente como sistémicamente. La administración puede llevarse a cabo, por ejemplo, por administración por vía oral, por administración de la formulación a una cavidad del cuerpo, por inhalación o insuflación, o por administración parenteral, intramuscular, intravenosa, intraportal, intrahepática, peritoneal, subcutánea, intratumoral o intradérmica.

La naturaleza de la administración contemplada influirá asimismo (o será influida por) la elección de la fuente bacteriana para las minicélulas recombinantes empleadas para administrar una molécula terapéutica de ácido nucleico. Por ejemplo, especies de *Salmonella*, *Escherichia* y *Shigella* llevan adhesinas que son reconocidas por receptores que median en la endocitosis sobre enterocitos en el tubo gastrointestinal pueden ser adecuadas para administración por vía oral, para administrar una molécula terapéutica de ácido nucleico que es eficaz para células de cáncer de colon. De manera similar, las minicélulas derivadas de *Helicobacter pylori*, que llevan adhesinas específicas para células epiteliales del estómago, podrían ser aptas para administración por vía oral que tiene como objetivo las células de cáncer de estómago. La inhalación o insuflación puede ser ideal para administrar minicélulas intactas derivadas de una especie de *Pseudomonas* que lleva adhesinas reconocidas por receptores sobre células epiteliales de pulmón; esto, por ejemplo, para la administración a los pulmones de un paciente con fibrosis quística de una molécula terapéutica de ácido nucleico que codifica proteína CFTR. Las minicélulas derivadas de bacterias *Lactobacilli* que llevan adhesinas específicas para las células epiteliales de las vías urinaria y la vejiga podrían ser muy aptas para administración intrauretral de una molécula terapéutica de ácido nucleico a un cáncer de las vías urinarias y o de vejiga.

La presente invención puede usarse para administrar una gama de moléculas de ácidos nucleicos que pueden ser ADNc, además de ADN genómico o ARN, y pueden estar en la orientación sentido o antisentido. La molécula de ácido nucleico presente en una minicélula intacta, con arreglo a la presente invención, puede tomar la forma de un plásmido, vector de expresión u otra construcción genética, pero no es ADN genómico que se origina a partir de la célula bacteriana que dio lugar a la minicélula. Para su uso en la presente invención es adecuada cualquier secuencia de ADN o ARN adecuada de una fuente eucariota, procariota o sintética que pueda colocarse bajo el control de la traducción o transcripción de un promotor de la expresión génica eucariota, o que pueda expresarse en la célula de mamífero usando factores transactivantes de la célula huésped.

#### **Ejemplo 1. Generación de minicélulas bacterianas de bacterias Gram-negativas, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* y *Shigella flexneri***

Se generaron cepas bacterianas productoras de minicélulas de bacterias Gram-negativas, como se describe aquí (A, B y C) y se ilustran en las Figuras 2 y 3.

#### **Materiales y procedimientos generales**

Las cepas bacterianas usadas en los ejemplos a continuación se enumeran y se aluden en la Tabla 1. Todas las bacterias se cultivaron a partir de soluciones madre de glicerol mantenidas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Las cepas de *Salmonella*, *E. coli*, *Shigella* y *Listeria* se cultivaron en caldo con tripticasa de soja (TSB) (marca BBL comprado en Bacto Labs, Liverpool, NSW, Australia). Se preparó según las instrucciones del fabricante a 30 g/l, y se esterilizó en autoclave a  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos. El cultivo líquido se cultivó en una estufa de incubación con agitación a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Las cepas

de *Shigella* se diferenciaron de *E. coli* sembrando en placas de agar XLD (agar de xilosa-lisina-desoxicolato) para producir colonias rojas y amarillas, respectivamente. XLD se compró en Oxoid (Melbourne, Australia). Se preparó según las instrucciones del fabricante a 53 gm/l, luego se hirvió durante 2 minutos. Los antibióticos se usaron a las siguientes concentraciones en medios líquidos y sólidos: ampicilina, 100 µg/ml, cloranfenicol, 30 µg/ml, kanamicina, 30 µg/ml.

5

Tabla 1. Cepas bacterianas usadas

Cepa de <i>E. coli</i>	Genotipo / características relevantes	Referencia
ENIh001	SM10 $\square$ pir; F-supE44, <i>thi-1</i> , <i>thr-1</i> , <i>leuB6</i> , <i>lacY1</i> , <i>tonA21</i> , <i>recA:RP4-2-Tc::Mu</i> lambda <sub>pir</sub> , <i>TnphoA</i> , <i>oriR6K</i> , tra-mob+	Miller y Mekalanos (1988).
ENE105	Cepa ENIh001 que lleva el plásmido pEN060 (Fig. 3)	La presente divulgación
ENIh003	JM109; F' <i>traD36 proA + proB + lacI<sup>q</sup></i> <i>lacZDM15/recA1 endA1gyrA96</i> (Nal <sup>r</sup> ) <i>thi hsdR17 supE44 relA1 D(lac-proAB) mcrA</i>	Yanisch-Perron y col. (1985)
<b>Cepa de Salmonella</b>		
ENIh007	<i>Salmonella enterica</i> serovar <i>Typhimurium</i> . Cepa aislada clínica de oveja.	Institute of Medical and Veterinary Services, Adelaida, SA, Australia. Cepa de referencia J98/00413
ENSm083	<i>Salmonella choleraesuis</i> subsp. <i>choleraesuis</i> (Smith) serotipo Weldin. <i>Typhimurium</i> depositada como <i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC 14028
SL3261	<i>Salmonella typhimurium aroA-</i>	Hoiseth y col., (1981)
SL5283	<i>Salmonella typhimurium hsdR-, hsdM+</i>	Hoiseth y col., (1981)
<b>Cepa de Shigella</b>		
ENSf001	<i>S. flexneri</i> serotipo 2b	ATCC 12022
<b>Cepa de Listeria</b>		
ENLM001	<i>Listeria monocytogenes</i> Gibson ATCC 7644	J. Pathol. Bacteriol. 45: 523, (1937)

Cuando se requirió, las cepas se cultivaron en medio mínimo M9 complementado con el 1 % de glucosa. Se añadieron complementos adicionales dependiendo de la cepa. Para la cepa ENIh003 de *E. coli* se añadió tiamina 1 mM. Para la cepa ENSf001 de *S. flexneri*, M9 se complementó con serina 0,4 mM, prolina 0,2 mM, 0,001 % de fenilalanina, 0,001 % de triptófano, 0,001 % de tirosina, 0,001 % de histidina, 0,002 mg/ml de valina, 0,0125 mg/ml de ácido nicotínico, 0,001 % de tiamina y 0,0225 mg/ml de metionina.

10

El ADN de plásmido se purificó usando el kit Qiaprep Spin Miniprep (Qiagen Inc., Victoria, Australia). El ADN genómico para las cepas de *Salmonella*, *Shigella* y *E. coli* se preparó usando el protocolo básico de Current Protocols in Molecular Biology (Capítulo 2, Sección I, unidad 2.4; John Wiley & Sons, Inc.). Todas las enzimas de restricción y modificación usadas se compraron en Promega (Madison, WI, EE.UU.) o Roche (Castle Hill, NSW, Australia), excepto la ADN polimerasa Deep Vent, que se compró en New England Biolabs (Beverly, MA, EE.UU.).

15

El ADN genómico de *L. monocytogenes* (ENLM001) se purificó mediante procedimientos convencionales (Ausubel y col., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons Inc.) con modificaciones como se han descrito. Una muestra de 1,5 ml de un cultivo durante la noche se centrifugó a 13.200 rpm durante 3 minutos y el sobrenadante se desechó. El sedimento de células bacterianas se resuspendió en 1 ml de tampón TE (Tris 10 mM a pH 8,0; EDTA 1 mM a pH 8,0) con 2,5 mg/ml de lisozima y se incubó a 37 °C durante 1 hora. Entonces se añadió RNasa A a una concentración final de 15 mg/ml, y la solución se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Entonces se añadieron 100 µg/ml de proteinasa K y 0,5 % de SDS y la mezcla se incubó adicionalmente durante una hora a 37 °C. Posteriormente, 200 µl de NaCl 5 M se mezclaron rigurosamente en la solución, seguido de 160 µl

20

25

de solución de CTAB/NaCl (10 % de CTAB en NaCl 0,7 M). Entonces, esta mezcla se incubó durante 10 minutos a 65 °C. La muestra se extrajo con un volumen igual de cloroformo/alcohol isoamílico seguido de una extracción con un volumen igual de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico. El ADN genómico se precipitó en disolución con 0,6 volúmenes de isopropanol y 1/10 de volumen de acetato sódico 5 M. El sedimento de ADN se lavó con etanol y se secó al aire antes de la resuspensión en tampón TE.

Los cebadores de PCR se sintetizaron y se compraron en Sigma-Genosys (Castle Hill, NSW, Australia). El protocolo de PCR básico seguido fue del siguiente modo. Los componentes de reacción para todas las PCR de 50 µl incluyeron 1X tampón, dNTP 200 µM, 50 pmoles de cada cebador, 1 unidad de ADN polimerasa Deep Vent, 50 pmoles de molde de ADN genómico (25 pmoles para plásmidos), agua libre de nucleasas hasta 50 µl, con PCR realizada en tubos de 0,2 ml en un ciclador térmico rápido para PCR en gradiente de Thermo Hybaid (Ashford, Middlesex, RU). Las condiciones de PCR para obtener la agrupación de genes *minCDE* fueron del siguiente modo: 94 °C durante 4 minutos; seguido de 30 ciclos a 94 °C durante 35 segundos, 60 °C durante 30 segundos, 72 °C durante 2,5 minutos; seguido de un ciclo final a 94 °C durante 35 segundos, 60 °C durante 35 segundos, 72 °C durante 5 minutos. Las condiciones de PCR para obtener el casete  $\Delta minCDE$  fueron del siguiente modo: 94 °C durante 4 minutos; seguido de 30 ciclos a 94 °C durante 35 segundos, 60 °C durante 30 segundos, 72 °C durante 2 minutos; seguido de un ciclo final a 94 °C durante 35 segundos, 60 °C durante 35 segundos, 72 °C durante 4 minutos. Las condiciones de PCR para obtener el casete  $\Delta minCDE::CmI$  fueron del siguiente modo: 94 °C durante 4 minutos; seguido de 30 ciclos a 94 °C durante 35 segundos, 60 °C durante 30 segundos, 72 °C durante 3 minutos; seguido de un ciclo final a 94 °C durante 35 segundos, 60 °C durante 35 segundos, 72 °C durante 6 minutos.

Los protocolos de biología molecular convencionales fueron como se describen en Sambrook y col. (1989) y en CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (John Wiley & Sons, Inc., NJ, EE.UU.).

El rendimiento de minicélulas se determinó microscópicamente usando un microscopio óptico Leica modelo DMLB con análisis de imágenes por medio de una cámara Leica DC y software de gestión de imágenes Leica IM. Las muestras se visualizaron usando microscopía de campo oscuro a 40X o inmersión en aceite a 100X aumentos. Los cubreobjetos sobre portaobjetos de vidrio se sellaron con el 1,5 % de agarosa. La pureza de cada lote de minicélulas se determinó sembrando un 10 % del volumen sobre placas de agar con tripticasa de soja e incubación durante la noche a 37 °C. El procedimiento proporcionó rutinariamente una pureza muy alta con una célula contaminante en  $10^9$  minicélulas. Las suspensiones de minicélulas se resuspendieron en TSB con los antibióticos apropiados para los que se determinó que las bacterias parentales eran sensibles y los cultivos se incubaron con agitación a 37 °C durante 4 horas para matar todas las bacterias parentales residuales. Por ejemplo, se determinó que la cepa *minCDE* de *S. typhimurium* era sensible a ampicilina y de ahí que la suspensión de minicélulas se incubara en TSB que contenía 50 µg/ml de ampicilina durante 4 horas para garantizar que si hubiera cualquier bacteria residual entonces serían matadas. Entonces, las minicélulas se recogieron por centrifugación a 10.000 g durante 30 minutos, se lavaron cuatro veces en 1 x tampón BSG (para eliminar el medio de crecimiento) y se resuspendieron en el volumen deseado para experimentos aguas abajo.

#### **[A] Generación de cepas productoras de minicélulas a partir de dos cepas diferentes de *Salmonella typhimurium*.**

Un diagrama esquemático de construcción de plásmido se muestra en la Figura 2. Las cepas bacterianas, plásmidos y cebadores de PCR usados se muestran en la Tablas 1, 2 y 3 respectivamente.

Las secuencias de genes *minCDE* de *E. coli*, véase Mori (1996), se usaron para buscar en la base de datos Genbank secuencias de ADN homólogas usando el procedimiento de análisis FASTA (Pearson y Lipman, 1988). Se encontró que secuencia de ADN del contig de TYPN3 101 del genoma de *S. typhi* (CT18) era homóloga a las secuencias de *minCDE* de *E. coli*. Los cebadores de oligonucleótidos ENOL001 y ENOL002 se diseñaron basándose de estos datos y se usaron para cebar la síntesis de los genes *minCDE* intactos a partir de la cepa EN1h008 de *S. typhimurium* como un fragmento de *EcoRI-minCDE-HindIII*.

Este fragmento se clonó en los sitios *EcoRI/HindIII* de pNEB193 para crear un plásmido designado pEN001, que se propagó en la cepa JM109 de *E. coli* para producir la cepa ENE001. Los cebadores ENOL003 y ENOL004 se diseñaron para delecionar un total de 1081 pb de la secuencia del casete de *minCDE* en pEN001, a la vez que simultáneamente se insertaban 16 pares de bases (pb) que contenían los sitios de restricción *KpnI*, *SmaI* y *XbaI* únicos como localizaciones para la futura inserción de uno o más genes marcadores.

La secuencia delecionada incluyó 386 pares de bases a partir del extremo 3' del gen *minC*, la secuencia interviniente de 23 pares de bases en la dirección 5' del gen *minD* y 672 pares de bases a partir del extremo 5' del gen *minD*. Esto produjo el casete de delección  $\Delta minCDE$  (755 pares de bases) en el plásmido pEN002 alojado en la cepa ENE003. El gen de resistencia a cloranfenicol de pHSG415 (Fig. 2, Tabla 2), fragmento *Haell* de 1330 pares de bases/de extremos romos, se clonó en el sitio *SmaI* de pEN002 para obtener el plásmido pEN003, que lleva el casete de delección  $\Delta minCDE::Cm^R$  con el gen *Cm^R* clonado en la orientación de las agujas del reloj. Ésta se designó la cepa ENE006.

Tabla 2. Plásmidos usados en este estudio.

Plásmido	Características relevantes	Referencia
pHSG415	Número de copias bajo, sensible a la temperatura, movilizable	Hashimotoh-Gotoh y col., (1981)
pGP704	Derivado de pBR322 en el que <i>oriE1</i> se ha sustituido con <i>oriR6K</i> . El origen de replicación R6K requiere para su función una proteína llamada pi, codificada por el gen <i>pir</i> . En <i>E. coli</i> , la proteína pi puede ser suministrada en <i>trans</i> por un profago ( $\lambda$ <i>pir</i> ) que lleva una copia clonada del gen <i>pir</i> . El plásmido también contiene un fragmento <i>Bam</i> HI de 1,9 kb que codifica la región <i>mob</i> de RP4. Por tanto, pGP704 puede movilizarse en cepas receptoras por funciones de transferencia proporcionadas por un derivado de RP4 integrado en el cromosoma de la cepa SM10 de <i>E. coli</i> . Sin embargo, una vez transferido, es incapaz de replicarse en receptores que carecen de la proteína pi. Amp <sup>R</sup>	Miller y Mekalanos (1988)
pNEB193	Es un derivado de pUC19 que lleva sitios únicos para los cortadores de 8 bases únicos: <i>Asc</i> I, <i>Pac</i> I y <i>Pme</i> I. El poliligador lleva los sitios de restricción únicos <i>Eco</i> RI, <i>Sac</i> I, <i>Kpn</i> I, <i>Sma</i> I, <i>Asc</i> I, <i>Bss</i> HIII, <i>Bam</i> HI, <i>Pac</i> I, <i>Xba</i> I, <i>Sal</i> I, <i>Pme</i> I, <i>Sbf</i> I, <i>Pst</i> I, <i>Sph</i> I, <i>Hind</i> III. El poliligador no interrumpe el marco de lectura <i>lacZ</i> . Amp <sup>R</sup>	Comprado en New England Biolabs, Inc. Beverly, MA, EE.UU.
pMK4 (5,6 kb)	Vector lanzadera de <i>E. coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>lacZ'</i> (de pUC9), Cml <sup>R</sup> (de pC 194) en <i>Bacillus</i> , Amp <sup>R</sup> en <i>E. coli</i> . Cml <sup>R</sup> en <i>Bacillus</i>	Sullivan y col., (1984)
pVA838 (9,2 kb)	Vector lanzadera de <i>E. coli</i> y <i>Streptococcus sanguis</i> , resistente a eritromicina (EM <sup>R</sup> ) en <i>S. sanguis</i> , Cml <sup>R</sup> en <i>E. coli</i> .	Macrina y col., (1982)
pRB373 (5,8 kb)	Vector lanzadera de <i>E. coli</i> y <i>B. subtilis</i> , <i>bla</i> (Amp <sup>R</sup> ) y <i>E. coli ori</i> se derivaron de pBR322. <i>ori</i> con resistencia a kanamicina (Km <sup>R</sup> ), resistencia a bleomicina (Bm <sup>R</sup> ) y Gram-positivas se derivaron de pUB110. <i>to</i> (terminador de la transcripción) es del fago $\lambda$ .	Brückner (1992)
pEGFP	Lleva una variante desplazada hacia el rojo de proteína verde fluorescente (GFP) natural que se ha optimizado para fluorescencia más brillante y mayor expresión en células de mamífero (máximo de excitación = 488 nm; máximo de emisión = 507 nm). Las secuencias en la dirección 5' que flanquean EGFP se han convertido en un sitio de iniciación de la traducción consenso de Kozak para aumentar adicionalmente la eficiencia de traducción en células eucariotas. El gen EGFP se clonó entre las dos MCS del derivado de pUC 19 pPD16.43. El gen EGFP se insertó en marco con el codón de iniciación <i>lacZ</i> de pUC 19 de manera que una proteína de fusión de EGFP se expresara a partir del promotor <i>lac</i> en <i>E. coli</i> . El esqueleto de pUC de EGFP proporciona un origen de replicación de número de copias alto y un gen de resistencia a ampicilina para la propagación y selección en <i>E. coli</i> .	Comprado en Clontech Laboratories, Palo Alto, CA, EE.UU.

(continuación)

Plásmido	Características relevantes	Referencia
pEGFP-C1	EGFP es como se ha descrito para el plásmido pEGFP. Las secuencias que flanquean EGFP se han convertido en un sitio de iniciación de la traducción consenso de Kozak para aumentar adicionalmente la eficiencia de traducción en células eucariotas. El gen EGFP se expresa a partir del promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano y de ahí que el plásmido sólo exprese EGFP en células de mamífero y no en células bacterianas. La MCS en pEGFP-C1 está entre las secuencias codificantes de EGFP y el poli A del SV40 (en la dirección 3' del gen EGFP) que dirige el procesamiento apropiado del extremo 3' del ARNm de EGFP. El esqueleto del vector también contiene un origen de SV40 para la replicación en células de mamífero que expresan el antígeno T de SV40 T. Un casete de resistencia a neomicina (neo <sup>r</sup> ), que consiste en el promotor temprano del SV40, el gen de resistencia a neomicina/kanamicina de Tn5 y las señales de poliadenilación del gen timidina-cinasa (TK del VHS) del herpes simple permite que células eucariotas establemente transfectadas se seleccionen usando G418. Un promotor bacteriano en la dirección 5' de este casete expresa resistencia a kanamicina en <i>E. coli</i> . El esqueleto de pEGFP-C1 también proporciona un origen de replicación pUC para la propagación en <i>E. coli</i> y un origen f1 para la producción de ADN monocatenario.	Comprado en Clontech Laboratories, Palo Alto, CA, EE.UU.

El casete de delección  $\Delta minCDE::Cm^R$  se amplificó a partir del plásmido pEN003 por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando los cebadores ENOL001 y ENOL002, se hicieron romos los extremos y se clonaron en el sitio *Sma*I del plásmido suicida pGP704 (Fig. 2; Tabla 2). El plásmido, designado pEN005, se transformó en la cepa ENIh001 (SM10 $\lambda$ pir; Tabla 1) para dar el número de cepa ENE007. La cepa ENE007 se usó como cepa donante en un experimento de conjugación (acoplamiento de filtros) con las cepas ENIh007 y ENSm083 de *S. typhimurium* (Tabla 1) como receptor. Durante la noche, los cultivos estáticos del donante y el receptor se cultivaron en TSB a 37 °C. Los cultivos se mezclaron en una conjugación por acoplamiento de filtros sobre membranas Hybond N<sup>+</sup> sobre placas de TSA a una relación de donante:receptor de 1:3 y se incubaron a 37 °C durante 8 horas. Las células se recuperaron y se lavaron dos veces en una solución salina estéril. El sedimento de células se resuspendió en solución salina y se sembró en placas de Petri de 150 mm. Las placas se incubaron durante hasta 72 horas a 37 °C.

Los exconjugantes se seleccionaron sobre medio mínimo M9 con el 1,5 % de glucosa y 30  $\mu$ g/ml de cloranfenicol. La cepa donante se contra-selecciona bajo estas condiciones, debido a requisitos auxotróficos adicionales, mientras que la cepa receptora no puede crecer debido a su sensibilidad al cloranfenicol. Por tanto, este experimento seleccionó exconjugantes de *S. typhimurium* que llevan la resistencia a cloranfenicol codificada por plásmido. Las colonias se cribaron para el fenotipo deseado de  $Cm^R$  y  $Amp^S$  parcheando cepas aisladas sobre el medio mínimo M9 que contenía ampicilina ( $Amp$ ) o cloranfenicol ( $CmI$ ). De las 79 cepas aisladas de la conjugación ENE007 x ENIh007 que presentó  $CmI^R$ , se encontró que un total de 18 cepas aisladas eran  $Amp^S$ . De manera similar, de las 56 cepas aisladas de la conjugación ENE007 x ENSm083, se encontró que 19 eran  $Amp^S$ .

Para determinar si las cepas aisladas fueron cromosómicamente delecionadas para los genes *minCD*, los cultivos durante la noche se visualizaron por microscopía de campo oscuro a 40X aumentos. Las minicélulas se visualizaron en el cultivo mixto para las 27 cepas aisladas. Todas las cepas aisladas mostraron la presencia de minicélulas, mientras que las cepas de control parentales estuvieron ausentes para minicélulas. Las minicélulas purificadas se probaron para aglutinación con suero aglutinante somático 4-0 *Salmonella* (conejo) ZC13 (Murex Diagnostics, Norcross, Georgia, EE.UU.).

La cepa bacteriana recombinante se cultivó bajo condiciones de laboratorio que son óptimas para la producción de minicélulas recombinantes. El crecimiento bacteriano se lleva a cabo usando medios bacteriológicos convencionales tales como aquellos descritos en Sambrook y col. (1989), y usando condiciones de crecimiento óptimas que pueden determinarse fácilmente por técnica convencional.

#### [B] Generación de cepa productora de minicélulas a partir de *Shigella flexneri*.

La Figura 3 representa las etapas relevantes en la construcción genética de una cepa productora de minicélulas de *S. flexneri* serotipo 2b. El protocolo de clonación fue similar al seguido para la construcción de cepas de *S. typhimurium* productoras de minicélulas, detallado anteriormente.

Para clonar la agrupación de genes *minCDE* a partir de *S. flexneri* serotipo 2b (Tabla 1), los cebadores de clonación de PCR se diseñaron basándose en una búsqueda de base de datos del proyecto de secuenciación en progreso para la secuencia del genoma de *Shigella flexneri* completa, serotipo 2a. Los cebadores de PCR ENOL059 y

ENOL060 que llevan colas de *EcoRI* y *HindIII* respectivamente (Tabla 3) se usaron para amplificar la agrupación de genes *minCDE* de 1808 pb de ADN genómico purificado a partir de *Shigella flexneri*, serotipo 2b. El fragmento amplificado se clonó en los sitios *EcoRI* y *HindIII* del plásmido pNEB193 (Tabla 2), produciendo el plásmido pEN055. El ADN de inserto se secuenció y se confirmó que era el ADN de *minCDE* de la bacteria *Shigella* parental.

5

**Tabla 3. Oligonucleótidos usados en este estudio.** Los sitios de enzimas de restricción y las características de secuencias de ADN se muestran entre paréntesis precediendo al segmento de ADN respectivo. (F) y (R) representan cebadores de PCR directos e inversos, respectivamente.

Oligonucleótido	Secuencia	Producto
ENOL001	5' ( <i>cola</i> ) CTC TCA CTG ( <b>EcoRI</b> ) GAA TTC ( <b>minC</b> ) ATG TCA AAC ACG CCA ATC GAG C 3'	(F) <i>minCDE</i> de <i>S. typhimurium</i>
ENOL002	5' ( <i>cola</i> ) CTC CTG GCA ( <b>HindIII</b> ) AAG CTT ( <b>minE</b> ) TTA TTT TGA CTC TTC GGC TTC CG 3'	(R) <i>minCDE</i> de <i>S. typhimurium</i>
ENOL003	5' ( <i>cola</i> ) CTC TGC TAG TCA ( <b>SmaI-KpnI</b> ) CCC GGG TAC C ( <b>minC</b> ) GCC GAA CCG CTT TCT CTT TAC C 3'	(R) delección de <i>S. typhimurium</i> de <i>minCDE</i> para obtener $\Delta$ <i>minCDE</i>
ENOL004	5' ( <i>cola</i> ) CTC TGC TAG TCA ( <b>SmaI</b> ) CCC GGG ( <b>XbaI</b> ) TCT AGA ( <b>mind</b> ) GAA CCG GTG ATT CTT GAC GCC A 3'	(F) delección de <i>S. typhimurium</i> de <i>minCDE</i> para obtener $\Delta$ <i>minCDE</i>
ENOL059	5' ( <i>cola</i> ) CTC TCA CT ( <b>EcoRI</b> ) GAA TTC ( <b>minC</b> ) ATG TCA AAC ACT CCA ATC GAG CT 3'	(F) clonación de <i>minCDE</i> de <i>S. flexneri</i> 2b
ENOL060	5' ( <i>cola</i> ) CTC CTG GC ( <b>HindIII</b> ) AAG CTT ( <b>minE</b> , incluye los 2 últimos pb para <b>HindIII</b> ) ATT TCA GCT CTT CTG CTT CCG 3'	(R) S donación de <i>minCDE</i> de <i>S. flexneri</i> 2b
ENOL062	5' ( <i>cola</i> ) CTC TCA TAA ( <b>SmaI</b> ) CCC GGG ( <b>XbaI</b> ) TCT AGA ( <b>mind</b> ) GGC GTG ATC CCA GAG GAT CAA T 3'	(F) delección de <i>S. flexneri</i> 2b de <i>minCDE</i> para obtener $\Delta$ <i>minCDE</i>
ENOL063	5' ( <i>cola</i> ) CTC TCA TTC ( <b>SmaI-KpnI</b> ) CCC GGG TAC C ( <b>minC</b> ) TGT GGA GCA TAA ATA CGC TGA CC 3'	(R) delección de <i>S. flexneri</i> 2b de <i>minCDE</i> para obtener $\Delta$ <i>minCDE</i>
ENOL038	5' ( <i>cola</i> ) CTC CAG TCT ( <b>HindIII</b> ) AAG CTT ( <b>mind</b> ) AGG AGC CGC GCT TAC TAT TAG C 3'	(R) <i>minCD</i> de <i>Listeria monocytogenes</i>
ENOL048	5' ( <i>cola</i> ) CTC CAG TCT ( <b>SacI</b> ) GAG CTC ( <b>minC</b> ) GAA GAA GAA TGT TCA AAT TAA AGG C 3'	(F) <i>minCD</i> de <i>Listeria monocytogenes</i>
ENOL039	5' ( <i>cola</i> ) CTC CAG TCT ( <b>BamHI</b> ) GGA TCC ( <b>XbaI</b> ) TCT AGA ( <b>minC</b> ) ATC CCC TGG AAC CTG AAC AAC 3'	(R) delección de <i>Listeria monocytogenes</i> de <i>minCD</i> para obtener $\Delta$ <i>minCD</i>
ENOL040	5' ( <i>cola</i> ) CTC CAG TCT ( <b>BamHI</b> ) GGA TCC ( <b>KpnI</b> ) GGT ACC ( <b>mind</b> ) CCG GAA ATA TCA GCA GTT CG 3'	(F) delección de <i>Listeria monocytogenes</i> de <i>minCD</i> para obtener $\Delta$ <i>minCD</i>
ENOL098	5' ( <i>cola</i> ) CTC CAG TCT ( <b>XbaI</b> ) TCT AGA ( <b>Cm<sup>r</sup></b> ) TTT TTG CGC TTA AAA CCA GTC A 3'	(R) obtener <i>Cm<sup>r</sup></i> a partir de pMK4
ENOL099	5' ( <i>cola</i> ) CTC CAG TCT ( <b>KpnI</b> ) GGT ACC ( <b>Cm<sup>r</sup></b> ) AAA ACC TTC TTC AAC TAA CCG GG 3'	(F) obtener <i>Cm<sup>r</sup></i> a partir de pMK4
ENOL096	5' ( <i>cola</i> ) CTC CAG TCT ( <b>XbaI</b> ) TCT AGA ( <b>Emr</b> ) GAG ATA AGA CGG TTC GTG TTC GT 3'	(R) obtener <i>Em<sup>r</sup></i> a partir de pVA838
ENOL097	5' ( <i>cola</i> ) CTC CAG TCT ( <b>KpnI</b> ) GGT ACC ( <b>Emr</b> ) AGA ATG CAG AAG ATG AAA GCT GG 3'	(F) obtener <i>Em<sup>r</sup></i> a partir de pVA838

(continuación)

Oligonucleótido	Secuencia	Producto
ENOL092	5' ( <i>cola</i> ) CTC CAG TCT ( <b>EcoRI</b> ) GAA TTC ( <b>Kan<sup>r</sup></b> ) TGA AGGATGCTT AGG AAG ACG AG 3'	(F) obtener Kan <sup>r</sup> a partir de pRB373
ENOL093	5' ( <i>cola</i> ) CTC CAG TCT ( <b>EcoRI</b> ) GAA TTC ( <b>Kan<sup>r</sup></b> ) CGC CAT GAC AGC CAT GAT AA 3'	(R) obtener Kan <sup>r</sup> a partir de pRB373
ENOL094	5' ( <i>cola</i> ) CTC CAG CTC ( <b>EcoRI</b> ) GAA TTC ( <b>Kan<sup>r</sup></b> y <b>G+ ori</b> ) AAG GTG CGT TGAAGT GTT GGT A 3'	(F) obtener Kan <sup>r</sup> y ori G+va a partir de pRB373

Se obtuvo una delección en la agrupación de genes *minCDE* usando los cebadores de PCR ENOL062 y ENOL063 (Tabla 3) y el plásmido pEN055 como ADN mensajero en una reacción de PCR inversa. Esto produjo la delección de 271 pb (región del extremo 3' de *minC*), 23 pb (secuencia intergénica entre *minC* y *minD*) y 608 pb (región del extremo 5' de *minD*). Simultáneamente, las secuencias de cebadores de PCR insertaron un sitio de clonación múltiple que llevaba sitios de restricción *KpnI-SmaI-XbaI*. El producto de PCR se digirió con *SmaI* y se religó para crear el plásmido pEN056.

El marcador de *Cml<sup>R</sup>* se purificó en gel a partir del plásmido pHSG415 (Tabla 2) como un fragmento *HaeIII* de 1330 pb, se hicieron romos los extremos con T4 ADN polimerasa y se clonaron en el sitio *SmaI* del plásmido pEN056. El nuevo plásmido de  $\Delta minCDE::Cml^R$  se designó pEN057.

El casete  $\Delta minCDE::Cml^R$  se obtuvo por PCR usando los cebadores ENOL059 y ENOL060 (Tabla 3) y usando el plásmido pEN057 como molde. El fragmento de 2.272 pb se clonó en los extremos romos en el sitio *EcoRV* del plásmido suicida pGP704 (Tabla 2). El nuevo plásmido suicida se designó pEN060 y la cepa SM10 $\lambda$ pir que llevaba se designó ENE105.

Se usó una conjugación con acoplamiento de filtros para el plásmido de transferencia pEN060 de ENE105 con la cepa ENSf001 de *Shigella flexneri* (Tabla 1) con una relación de receptor:donante de 5:1, los cultivos durante la noche (crecimiento estático) del receptor y el donante se mezclaron sobre membranas Hybond N<sup>+</sup> sobre placas de TSA a la relación calculada y se incubaron durante la noche a 37 °C. Las células se recuperaron y se lavaron dos veces antes de sembrar en medio mínimo selectivo que contenía suplementos y 30  $\mu$ g/ml de cloranfenicol. El donante y el receptor no pueden crecer en este medio debido a tanto requisitos auxotróficos (donante) como a sensibilidad a antibióticos (receptor), de manera que cualquier colonia encontrada sería exconjugantes. Se recogieron treinta y dos (32) cepas aisladas y se parchearon sobre placas de medio mínimo fresco que contenían suplementos y 30  $\mu$ g/ml de cloranfenicol.

Los 32 exconjugantes se incubaron a 37 °C durante la noche antes de parchearse sobre placas de medio mínimo fresco que contenían suplementos y 100  $\mu$ g/ml de ampicilina y luego se incubaron a 37 °C durante 24-48 horas. Las 32 cepas aisladas pudieron cultivarse en ampicilina que indica la integración del plásmido completo. Cada cepa aislada se examinó bajo microscopía de campo oscuro (40X) o bajo inmersión en aceite (100X). Tres de las cepas aisladas revelaron la presencia de minicélulas. Las cepas aisladas se cultivaron en línea sobre placas de XLD que contenían 30  $\mu$ g/ml de cloranfenicol para confirmar que la cepa aislada era *Shigella* y no el donante de *E. coli*. Las cepas aisladas también mostraron una fuerte reacción de aglutinación positiva cuando se probaron con sueros aglutinantes de *Shigella flexneri* (BIODESIGN International, Saco, Maine, EE.UU.). La purificación de plásmidos y los análisis electroforéticos en gel confirman que el plásmido de donante no estaba presente en los exconjugantes como episoma.

### [C] Generación de cepa productora de minicélulas a partir de *Escherichia coli*.

Dado que hay un 98 % de homología genética entre los genomas de *E. coli* y *Shigella*, este estudio tuvo como objetivo determinar si secuencias heterólogas del gen de  $\Delta minCDE$  podían usarse para generar cepas productoras de minicélulas especialmente cuando las secuencias de genoma estaban estrechamente relacionadas. Por tanto, se usó una conjugación con acoplamiento de filtros para el plásmido de transferencia pEN060 (lleva  $\Delta minCDE::Cml^R$  de *S. flexneri* 2a; Fig. 3) de ENE105 (Tabla 1) a la cepa ENIh003 de *E. coli* (JM109; Tabla 1) con una relación de receptor:donante de 3:1. Cultivos durante la noche (crecimiento estático) del receptor y donante se mezclaron sobre membranas Hybond N<sup>+</sup> sobre placas TSA a la relación calculada y se incubaron durante la noche a 37 °C. Las células se recuperaron y se lavaron dos veces antes de sembrarse sobre medio mínimo selectivo que contenía suplementos y 30  $\mu$ g/ml de cloranfenicol. El donante y receptor no pueden cultivarse en este medio debido a tanto requisitos auxotróficos (donante) como a sensibilidad a antibióticos (receptor). Se recogieron 106 cepas aisladas y se parchearon sobre placas de medio mínimo fresco que contenían suplementos y 30  $\mu$ g/ml de cloranfenicol. Después de la incubación durante la noche a 37 °C, las cepas aisladas se parchearon sobre placas de medio mínimo fresco que contenían suplementos y 100  $\mu$ g/ml de ampicilina y se incubaron a 37 °C durante 24-48 horas. Las 106 cepas aisladas pudieron cultivarse en ampicilina sugiriendo la integración del plásmido completo. Veinticuatro (24) cepas aisladas se visualizaron bajo microscopía de campo oscuro (40X) y 100 X inmersión en aceite. Seis cepas aisladas mostraron la presencia de números grandes de minicélulas. Aunque en el pasado se han empleado muchos protocolos de mutagénesis y mutagénesis dirigida a sitios generales diferentes para generar cepas bacterianas productoras de minicélulas, la presente invención es la primera que demuestra que el único protocolo de clonación/mutagénesis dirigida a sitio empleado en este estudio es versátil y puede usarse de forma fidedigna para generar cepas productoras de minicélulas a partir de una gama de bacterias Gram-negativas y Gram-positivas (Ejemplo 2 mostrado a continuación).

### Ejemplo 2. Generación de minicélulas a partir de *Listeria monocytogenes*

Pueden generarse cepas bacterianas productoras de minicélulas a partir de bacterias Gram-positivas como se describe en este ejemplo. Un diagrama esquemático de construcción de plásmido se muestra en la Figura 4. Las cepas bacterianas, plásmidos y cebadores de PCR se enumeran respectivamente en la Tabla 1, Tabla 2 y la Tabla 3.

Para clonar los genes *minCD* a partir del genoma de *L. monocytogenes* se realizó PCR usando los cebadores ENOL038 y ENOL048 (Tabla 3) y se purificó ADN genómico de *L. monocytogenes* como molde. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en volúmenes de 50 µl usando el kit de ADN polimerasa Platinum® Pfx (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EE.UU.). Las reacciones incluyeron 1X tampón Pfx, MgSO<sub>4</sub> 2 mM, dATP 0,2 mM, dTTP, dGTP y dCTP, 50 pmoles de cada cebador, y 1U de Pfx polimerasa. Las condiciones de ciclado incluyeron una etapa desnaturalizante a 94 °C durante dos minutos; seguido de 35 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, 55 °C durante 30 segundos y 68 °C durante dos minutos; seguido de una etapa de extensión final a 68 °C durante cinco minutos. Una muestra de 2-5 µl de cada mezcla de reacción de PCR se visualizó sobre un 1 % de gel de agarosa teñido con bromuro de etidio. El fragmento de *minCD* amplificado se purificó por escisión del gel de agarosa, seguido de electroelución usando el electroeluidor modelo 422 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE.UU.) según las especificaciones del fabricante.

El fragmento de *minCD* (1.556 pb) se digirió con *SacI* y *HindIII*, y direccionalmente se clonó en los sitios respectivos del plásmido pNEB193 (Tabla 2; Fig. 4). Los clones recombinantes transformados en la cepa ENIh003 (Tabla 1) se caracterizaron por digestión con restricción y se analizaron por electroforesis en gel. El clon correcto (plásmido designado pEN045) se secuenció para confirmar la identidad de los genes *minCD*.

La delección por PCR se realizó en el fragmento de *minCD* clonado en el plásmido pEN045 usando los cebadores ENOL039 y ENOL040 (Tabla 3). Los cebadores llevan sitios de restricción *XbaI* y *KpnI*, respectivamente, que sirven de sitios de inserción para marcadores de selección entre  $\Delta$ *minC* y  $\Delta$ *minD*. Las condiciones de reacción para la delección de *minCD*, y la visualización de fragmentos, fueron como se han descrito anteriormente, pero con una etapa de extensión a 68 °C de 4 minutos. El fragmento de  $\Delta$ *minCD* se digirió posteriormente con *XbaI* y *KpnI*, y se purificó por electroelución con el electroeluidor modelo 422 como preparación para la ligación con marcadores de selección.

Dos marcadores de selección de antibióticos diferentes de bacterias Gram-positivas se insertaron entre los genes  $\Delta$ *minC* y  $\Delta$ *minD* en pEN045 en los sitios *KpnI* y *XbaI*. El marcador de resistencia a cloranfenicol (Cm<sup>R</sup>) del plásmido pMK4 de *Bacillus subtilis* (Tabla 2) y el marcador de resistencia a eritromicina (Em<sup>R</sup>) del plásmido pVA838 de *Streptomyces sanguis* (Tabla 2) se usaron para construir los plásmidos pEN062 y pEN063, respectivamente (Fig. 4). Cada marcador se amplificó por PCR usando los oligonucleótidos enumerados en la Tabla 2 y mostrados en la Fig. 4, que incluían sitios *XbaI* y *KpnI*. La PCR de Cm<sup>R</sup> y Em<sup>R</sup> se llevó a cabo usando el mismo volumen de reacción y concentraciones de reactivo como se han descrito anteriormente. Las condiciones de ciclado incluyeron una etapa de desnaturalización a 94 °C durante dos minutos; seguido de 35 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, 55 °C durante un minuto y 68 °C durante dos minutos; seguido de una etapa de extensión a 68 °C durante cinco minutos. Los fragmentos de PCR se purificaron en gel usando el kit MinElute (Qiagen Inc, Victoria, Australia) según las instrucciones del fabricante. Entonces, Cm<sup>R</sup> y Em<sup>R</sup> se digirieron con *KpnI* y *XbaI*, se purificaron con un columna MinElute y se ligaron a los sitios respectivos entre los genes  $\Delta$ *minC* y  $\Delta$ *minD* en pEN045. Los recombinantes de JM109 se caracterizaron por digestión con restricción con las enzimas *EcoRI* y *DdeI* (Cm<sup>R</sup>) y *EcoRI* y *AvaI* (Em<sup>R</sup>) para dar las cepas aisladas ENE110 y ENE112, respectivamente.

Con fines de experimentos de conjugación entre SM10λpir de *L. monocytogenes* y *E. coli* (ENIh001) se construyeron cuatro nuevos plásmidos usando el plásmido conjugativo pGP704. El plásmido pGP704 se modificó para incluir tanto el marcador de resistencia a kanamicina (Km<sup>R</sup>), codificado por el gen *neo*, como Km<sup>R</sup>, además de *ori* para la replicación de plásmidos en bacterias Gram-positivas. El último actuaría en un plásmido suicida en ausencia de un origen de replicación Gram-positivo, sirviendo el gen *neo* (Km<sup>R</sup>) de marcador para la presencia de plásmidos. A diferencia, el último actuaría de control positivo para los experimentos de conjugación.

Los segmentos de ADN que contienen el gen *neo* y *ori* Gram-positiva que incluye el gen *neo* se amplificaron por PCR a partir de pRB373 usando el conjunto de oligonucleótidos enumerados en la Tabla 3. Los volúmenes de reacción de PCR y las concentraciones de reactivo fueron como se ha descrito anteriormente. Las condiciones de ciclado incluyeron una etapa de desnaturalización de 2 minutos a 94 °C; seguido de 35 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, 56 °C durante un minuto, y 68 °C durante 2 minutos y medio; seguido de una larga etapa de extensión de 68 °C durante 5 minutos. Los productos se purificaron a partir de un gel de agarosa usando la columna MinElute. Los fragmentos que contenían el gen *neo* y el gen *neo* más *ori* Gram-positiva se cortaron con *EcoRI* y se ligaron en el sitio *EcoRI* de pGP704 (Fig. 4). Esto produjo plásmidos designados pEN064 y pEN066.

Entonces,  $\Delta$ *minCD*::Cm<sup>R</sup> o  $\Delta$ *minCD*::Em<sup>R</sup> se escindieron como fragmentos *SacI* - *HindIII* a partir de pEN062 y pEN063, respectivamente, se hicieron romos los extremos y se ligaron en el sitio *EcoRV* de los plásmidos pEN064 y pEN066 para dar los cuatro plásmidos diferentes pEN069, pEN071, pEN073 y pEN075 como se representa en la Fig. 4. Los cuatro plásmidos se transformaron en ENIh001 (SM10λpir de *E. coli*) para crear las cepas ENE124, ENE126, ENE128 y ENE130, respectivamente. Por tanto, ENE124 contuvo el plásmido con  $\Delta$ *minCD*::Cm<sup>R</sup> y el gen *neo* (Km<sup>R</sup>), mientras que ENE126 tiene, además, *ori* Gram-positiva. De manera similar, ENE128 contuvo el plásmido con  $\Delta$ *minCD*::Em<sup>R</sup> y el gen *neo* (Km<sup>R</sup>), mientras que ENE130 contuvo adicionalmente *ori* Gram-positiva.

Las cuatro cepas ENE124, ENE126, ENE128 y ENE130 se usaron como cepas donante para los experimentos de conjugación con *L. monocytogenes* (ENLM001). Las conjugaciones se llevaron a cabo esencialmente como se describe en Trieu-Cuot y col. (1991). Todas las cepas se cultivaron a fase semilogarítmica y se mezclaron en una

- relación 2:1 (receptor:donante) a un volumen de 1 ml. Las mezclas de conjugación se lavaron dos veces en BHI antes de resuspenderse en 1 ml de BHI. Se sembraron volúmenes de 200 µl en filtros de membrana de nitrocelulosa 0,45 µm (Millipore) sobre placas BHI y se incubaron durante 18 horas a 37 °C. Tras la incubación, las membranas de nitrocelulosa se rebanaron en tiras y se dispusieron en 3 ml de BHI. Se aplicó agitación con vórtex vigorosa para desplazar células bacterianas de las membranas de filtración. Se sembraron muestras de 300 µl de volumen en placas grandes que contenían BHI, ácido nalidíxico (Nal; 50 µg/ml), colistina (Col; polimixina E) (10 µg/ml) y tanto cloranfenicol (10 µg/ml) como eritromicina (10 µg/ml). Las placas se incubaron durante 48 horas a 37 °C antes de recogerse las colonias.
- Las colonias se parchearon sobre placas de BHI/Nal/Col que contenían kanamicina (15 µg/ml), además de sobre placas con BHI/Nal/Col y tanto cloranfenicol (10 µg/ml) como eritromicina (10 µg/ml), para la prueba de sensibilidad a antibióticos. Todos los exconjugantes demostraron un perfil antibiótico que sugirió la integración cromosómica de la delección de *minCD* sin integración del plásmido. Es decir, todos los exconjugantes se cultivaron sobre placas de antibiótico que contenían el marcador interno eritromicina o cloranfenicol y no exconjugantes se cultivaron sobre placas que contenían kanamicina (Km<sup>R</sup> codificada por el gen *neo* sobre plásmidos de donante).
- Se examinaron más de cien exconjugantes para el fenotipo de minicélulas usando microscopía de campo oscuro (40x) e inmersión en aceite (100x). Todas las cepas aisladas demostraron un número variable de estructuras de minicélulas entre la población de bacilos parentales de *L. monocytogenes* cuando se compararon con células parentales bajo el microscopio (ENIh001 y ENLm001). Este resultado también está de acuerdo con la integración de la delección de *minCD* y la disrupción de la división pericentral normal.
- Se eligieron treinta exconjugantes y se subcultivaron para probar el mantenimiento del fenotipo de minicélulas. Tras la confirmación del mantenimiento, las cepas aisladas se almacenaron como soluciones madre en glicerol para futuros experimentos.

### Ejemplo 3. Purificación de minicélulas a partir de especies bacterianas

- Se purificaron minicélulas por el siguiente procedimiento inventivo. Este ejemplo detalla la purificación de minicélulas derivadas de *minCDE* de *S. typhimurium*. El mismo procedimiento se usó para purificar minicélulas a partir de cepas mutantes de *min* adicionales que incluyen dos mutantes de *S. typhimurium*, y un mutante cada uno de *E. coli*, *S. flexneri* y *L. monocytogenes*. El procedimiento se optimizó y se repitió más de 50 veces para generar minicélulas purificadas. Fue fidedigno, y rutinariamente dio 10<sup>8</sup> a 10<sup>9</sup> minicélulas purificadas a partir de un cultivo bacteriano de 10 l.
- Se estableció un cultivo de *minCDE*-*pEGFP-C1* de *S. typhimurium* a partir de una solución madre de glicerol en 50 ml de TSB que contenía los antibióticos cloranfenicol y kanamicina (50 µg/ml de concentración final). El cultivo se incubó con agitación a 37 °C durante la noche. Se usó una alícuota de 2,5 ml del cultivo durante la noche para inocular 1 l (en un matraz cónico de 2 l con deflectores) de TSB que contenía los antibióticos anteriormente mencionados, y se incubaron cinco matraces con agitación a 37 °C durante la noche.

#### 35 (A) Preparación previa (etapa 1)

Una bolsa BioProcess de 100 l se llenó con agua de tipo 1 (MQ) por un manguito estéril mediante un filtro de 0,2 µm. A dos bidones de 20 litros, previamente esterilizados en autoclave, que contenían 2 l de 10X BSG, se transfirieron 18 l de agua de procedimiento estéril por bomba peristáltica. Un bidón fue para diluir la minisuspensión de células y el otro fue para su uso en diafiltración.

#### 40 (B) Centrifugación diferencial y preparación previa (etapa 2)

- El cultivo bacteriano se centrifugó a 2000 g durante 10 minutos (Sorvall Legend T/RT; TTH 750 rotor). El sobrenadante se decantó en un bidón de 5 l estéril que se dotó de un filtro de ventilación de 0,2 µm y un accesorio de rápida desconexión. El procedimiento de decantación se realizó en una vitrina de riesgo biológico de clase II. El bidón se cerró, un tubo estéril se conectó al bidón de 5 l, y el otro extremo del tubo se conectó al bidón de 20 l previamente llenado que contenía 20 l de 1 x BSG como se ha descrito anteriormente. La suspensión que lleva minicélulas se bombeó del bidón de 5 l al bidón de 20 l para dar una dilución de 1:5.

#### (C) Sistema de purificación de minicélulas continuo

- Se conectaron en serie tres sistemas de flujo cruzado de Sartorius. Por duplicado, filtros modulares de rodajas Sartocon de 0,45 µm se ajustaron en los dos primeros soportes de rodajas y un módulo de filtro de rebanadas Sartocon de 0,2 µm se ajustó en el último soporte. La torsión sobre cada unidad de filtración se apretó a 20 Nm (Newton-metros) usando una llave de torsión. Cada unidad se unió a una bomba mediante un elemento sanitario. Se conectaron las líneas de alimentación, concentrado y permeado. Antes de la unión de los bidones, todo el sistema se lavó internamente con 6 l de NaOH 1 N a presión de 2 bar (0,2 MPa) durante 15 minutos. Esta etapa esterilizó internamente los diversos manguitos y filtros. El sistema se drenó de NaOH invirtiendo la dirección de la bomba de flujo de líquido y se realizó una prueba de velocidad de flujo del agua para garantizar la apropiada limpieza del filtro. La prueba se realizó según las instrucciones del fabricante (manual de Sartorius). Se garantizaron velocidades de

flujo aceptables de 3.000 a 3.600 ml por minuto para el concentrado y 600 a 800 ml por minuto para el permeado antes de realizarse la filtración de minicélulas. El sistema todavía llevaba un alto pH y de ahí que éste se neutralizara lavando y recirculando por cada sistema con 1 x PBS estéril (pH 7,4) hasta que el pH medido del conjunto de PBS estuviera en el intervalo de 7,0 a 8,0. Entonces se conectaron los bidones (20 l). La suspensión de minicélulas (25 l) se transportó a un primer bidón, que se conectó por un manguito al primer módulo de filtro de 0,45 µm. Para evitar la incrustación del filtro, la suspensión de minicélulas se diluyó a medida que avanzó la etapa de filtración (es decir, diafiltración). El diluyente (20 l de 1 x BSG) se transportó a un segundo bidón. Por tanto, en la primera etapa de filtración de flujo cruzado, la suspensión de minicélulas se filtró a un volumen de 45 l. La válvula de permeado se cerró inicialmente y la suspensión de minicélulas se bombeó sobre la superficie del filtro de 0,45 µm a una presión de 2 bar (0,2 MPa) durante 5 minutos. Esto acondicionó el filtro para el medio de suspensión de minicélulas. Entonces, la válvula de permeado se abrió y la suspensión de minicélulas penetró (una presión de 2 bar (0,2 MPa), 600 ml por min) a través del filtro de 0,45 µm y el permeado se recogió en un tercer bidón. A medida que disminuyó el volumen en el primer bidón, la cantidad de sólidos no filtrados aumentó, y de ahí que se cambiara a diafiltración cuando el volumen en el primer bidón descendió a 15 l. Éste diluye los sólidos en el primer bidón, previene la incrustación del filtro y maximiza la recuperación de minicélulas en el tercer bidón. Una vez el volumen de permeado en el tercer bidón alcanzó aproximadamente 12,5 l, el segundo filtro de flujo cruzado de 0,45 µm se acondicionó para la suspensión de minicélulas encontrada en el tercer bidón. Cuando el volumen en el tercer bidón alcanzó la marca de 15 l, la válvula de permeado se abrió, permitiendo la penetración de la suspensión de minicélulas en un cuarto bidón.

En esta etapa se eliminó la mayor contaminación de células parentales bacterianas en la suspensión de minicélulas. La siguiente etapa fue eliminar contaminantes menores en la suspensión tal como bullas bacterianas, endotoxina libre, ácidos nucleicos, restos celulares y líquido en exceso. Esto se llevó a cabo por filtración a través de un filtro de flujo cruzado de 0,2 µm. Las minicélulas tienen aproximadamente 0,4 µm de diámetro y de ahí que no penetren a través de un tamaño de poro de 0,2 µm. Por otra parte, las bullas bacterianas oscilan en tamaño (diámetro) de 0,05 µm a 0,2 µm y de ahí que se filtren. Otros contaminantes también son inferiores a 0,2 µm y de ahí que los únicos constituyentes retenidos en esta etapa de filtración fueran las minicélulas y cualquier célula parental bacteriana residual.

Cuando el volumen en el cuarto bidón alcanzó aproximadamente 15 l, el filtro de flujo cruzado de 0,2 µm se acondicionó para la suspensión de minicélulas presentes en el cuarto bidón. Entonces, la válvula de permeado se abrió, permitiendo que el permeado fuera a residuos en un quinto bidón mientras que las minicélulas se retuvieron y se concentraron en el cuarto bidón. Debido a la incorporación del sistema de diafiltración, las minicélulas se diluyeron continuamente y se filtraron, lo que garantizó la eliminación completa de contaminantes al final del procedimiento. Por tanto, la etapa de concentración redujo el volumen de suspensión de minicélulas a aproximadamente 4 l a partir del volumen de partida de 45 l.

#### 35 (D) Intercambio de tampón para la suspensión de minicélulas

Las sales residuales, los componentes de medios y los residuos de bajo peso molecular en la suspensión de minicélulas se eliminaron por diafiltración con 1 x BSG. El aparato se ensambló y se equilibró como se ha descrito antes. La suspensión de minicélulas se dispuso en un primer bidón de 4 l, y 20 l de 1 x BSG estéril (medio de diafiltración) se dispusieron en un segundo bidón. La unidad de flujo cruzado se ensambló con dos módulos de filtro de 0,1 µm para garantizar que las minicélulas no pudieran pasar a través, pero que se eliminaran todos los contaminantes inferiores a 0,1 µm. la bomba se encendió y la velocidad se ajustó para proporcionar 0,5 bar (0,05 MPa) de presión. La válvula de permeado se abrió y la suspensión de minicélulas circuló por la línea de alimentación, sobre el filtro de 0,1 µm. Las minicélulas se devolvieron al primer bidón por la línea de concentrado. El residuo circuló por la línea de permeado y se recogió en un tercer bidón. Esto redujo el volumen de la suspensión de minicélulas y de ahí que el sistema de diafiltración se encendiera para bombear 1 x BSG al primer bidón. Esta etapa repuso continuamente el volumen de la suspensión de minicélulas para mantenerlo a 4 l. El procedimiento continuó hasta que el segundo bidón se vació, produciendo cinco cambios del tampón de suspensión de minicélulas.

#### (E) Esterilización por filtración de la suspensión de minicélulas

En esta etapa, la suspensión de minicélulas todavía llevaba algo de contaminación bacteriana parental debido a que los filtros de flujo cruzado de 0,45 µm no fueron filtros de esterilización. Por tanto, fue importante eliminar cualquier bacteria parental residual para obtener una suspensión de minicélulas que fuera óptima para uso *in vitro* e *in vivo*. La suspensión de minicélulas de 4 l de la etapa previa se diluyó inicialmente a 20 l en 1 x BSG estéril y se mantuvo en un primer bidón. Una unidad de filtro frontal que lleva un filtro de 0,45 µm con un gran área superficial (500 cm<sup>2</sup>) se humedeció previamente con 2 l de 1 x BSG estéril y la integridad se probó según las instrucciones del fabricante. La suspensión de minicélulas se bombeó a una velocidad de flujo de 700 ml/min (es decir, velocidad de flujo lenta para evitar forzar que las células parentales bacterianas pasaran a través del filtro de 0,45 µm) a través del filtro frontal. Las células bacterianas fueron retenidas por el filtro, mientras que las minicélulas circularon a un segundo bidón por la línea de filtrado.

**(F) Concentración de minicélulas purificadas**

Las minicélulas purificadas, en una suspensión de 20 l, se concentraron a un volumen menor. Esta etapa no se realizó fácilmente por técnica de centrifugación y resuspensión de suspensiones convencional, sin embargo, debido a que los volúmenes fueron grandes y, en la práctica, no conductores a la técnica de centrifugación.

5 La etapa de concentración se realizó en las cuatro siguientes etapas.

**Etapa 1:** La suspensión de minicélulas se bombeó a 0,5 bar (0,05 MPa) de presión de un primer bidón y sobre un filtro de flujo cruzado de 100 kDa mediante un elemento sanitario. Las minicélulas se devolvieron al primer bidón por una línea de concentrado, y el permeado líquido se recogió en un segundo bidón por una línea de residuos de permeado.

10 **Etapa 2:** Una vez el volumen de la suspensión de minicélulas se redujo a 4 l, el procedimiento se detuvo y la suspensión se transfirió a un tercer bidón estéril de 4 l. Este último se ajustó con manguitos de 6,4 mm de diámetro en comparación con los manguitos de 12,5 mm usados para manipular los mayores volúmenes anteriores. Esto redujo el volumen vacío del tubo. Debido a que las líneas de alimentación y de concentrado fueron tubos de 12,5 mm de diámetro, se diseñó un adaptador para ajustar el manguito en el cierre de tapa. De  
15 manera similar, se diseñó un adaptador para ajustar el tubo de mayor taladro de las líneas de alimentación y de concentrado. Esta segunda etapa de concentración se realizó como en la etapa previa hasta que el volumen de minicélulas se redujo adicionalmente a aproximadamente 200 ml.

20 **Etapa 3:** La suspensión de minicélulas de 200 ml se transfirió a una botella Schott modificada que contenía un tubo de vidrio interno estéril para la alimentación y el concentrado. El tubo de vidrio taladró la tapa de la botella Schott y se cerró con tubo de Marprene y silicona. Sobre la tapa, la botella también llevaba un filtro de ventilación (0,2 µm). Para reducir más el volumen vacío, la línea de alimentación, de elemento sanitario y de concentrado previamente usada se sustituyó con tubos de Marprene de 6,4 mm estériles y la bomba previamente usada se sustituyó con una más pequeña. El procedimiento de concentración se realizó como antes (filtro de flujo cruzado de 100 kDa) hasta que el volumen de minicélulas se redujo a 50 ml.

25 **Etapa 4:** La suspensión de minicélulas altamente purificada se transfirió bajo condiciones estériles a un tubo Falcon de 50 ml.

**Ejemplo 4. Caracterización por microscopía electrónica de barrido de minicélulas a partir de cepas de *minCD* Gram-negativas y Gram-positivas**

30 Se tomaron micrografías electrónicas de barrido (SEM) y de transmisión (TEM) de minicélulas derivadas de *S. typhimurium*, *E. coli*, *S. flexneri*, *L. monocytogenes* y células parentales correspondientes para determinar la morfología y las dimensiones de las diversas minicélulas. Brevemente, cultivos bacterianos que llevan minicélulas se centrifugaron a 13.200 rpm durante 20 minutos y se resuspendieron en PBS que contenía un 2,5 % de glutaraldehído y se fijaron a temperatura ambiente durante 40 minutos. Las muestras se centrifugaron y se lavaron tres veces en agua destilada. Para TEM se siguió el siguiente procedimiento. Para cambiar las soluciones, las  
35 células se centrifugaron a 10.000 rpm durante 1 minuto, el sobrenadante se separó pipeteando, luego las células se resuspendieron en el nuevo reactivo usando una mezcladora de agitación con vórtex. La secuencia de reactivos fue: (a) tetróxido de osmio en tampón cacodilato 0,1 M a pH 7,2 - 10 minutos, (b) acetato sódico al 4 % en agua destilada - 1 minuto, (c) acetato de uranilo al 4 % en agua destilada - 5 minutos, (d) etanol al 70 % - 5 minutos, (e) etanol al 100 % - 5 minutos, (f) acetona al 100 % - 5 minutos, (g) 1:1 de acetona y monómero de resina epoxídica Spurr - 30  
40 minutos, (h) resina epoxídica Spurr pura - cura durante 48 horas a 60 °C. La secciones se cortaron a partir de los bloques de resina curados con una cuchilla de diamante usando un ultramicrotomo Reichert Ultracut E. Las secciones se tiñeron con acetato de uranilo durante 10 minutos seguido de citrato de plomo durante 2 minutos. Las secciones se examinaron usando un microscopio electrónico de transmisión Hitachi H-7000 operado con una energía del haz de 75 kilovoltios (Universidad de Nueva Gales del Sur, NSW, Australia). Se registraron imágenes digitales usando una cámara CCD de campo ancho AnalySis MegaView II.

45 Para la microscopía electrónica de barrido de alta resolución se siguió el siguiente procedimiento. Para cambiar soluciones, las células se centrifugaron a 13.000 rpm durante 20 minutos, el sobrenadante se separó pipeteando y las células se resuspendieron en el nuevo reactivo usando una mezcladora de agitación con vórtex. La intención era lavar todos los iones y biomateriales de las células y dejarlos suspendidas en un pequeño volumen de agua destilada. La secuencia de reactivos fue (a) 1 ml de agua destilada - resuspender, (b) 1 ml de agua destilada -  
50 resuspender, (c) depositar 250 µl sobre una placa de especímenes de latón limpia, (d) secar durante la noche a 30 °C, (e) recubrir justo antes de la microscopía con 2 nm de metal de cromo depositado en una recubridora por pulverización a vacío limpia Xenosput. Los especímenes recubiertos se examinaron usando un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo Hitachi S-900 usando una energía del haz de 3 kilovoltios (Universidad de Nueva Gales del Sur, NSW, Australia). Se registraron imágenes digitales a diferentes aumentos usando un digitalizador ImageSlave.

55 Los resultados mostraron que las minicélulas derivadas de tanto las bacterias Gram-negativas como Gram-positivas fueron de aproximadamente 400 nm de diámetro, y excepto *L. monocytogenes*, pareció que tenían una superficie

arrugada como se observó por SEM, supuestamente debido a las estructuras de la superficie celular del lipopolisacárido. No hubo diferencia evidente en la ultraestructura superficial de las minicélulas y las bacterias parentales para todas las especies. Los resultados de TEM mostraron que las minicélulas de *L. monocytogenes* tenían una estructura de la pared celular rígida esperada de una membrana celular de bacterias Gram-positivas. Las membranas de *Salmonella*, *S. flexneri* y *E. coli* colapsaron más fácilmente bajo el haz electrónico del microscopio. En todas las muestras se observó el acontecimiento de formación de minicélulas, es decir, división celular asimétrica.

#### Ejemplo 5. Captación de minicélulas por células de mamífero tales como macrófagos

Para demostrar la captación de minicélulas recombinantes por macrófagos, primero fue necesario incorporar un trazador tal como GFP con el fin de que las minicélulas recombinantes pudieran verse distintas de las células de mamífero. Por tanto, el plásmido pEGFP se transformó en las cepas productoras de minicélulas de *minCDE* de *S. typhimurium*, *E. coli* y *S. flexneri* para determinar si las minicélulas llevaban establemente EGFP y fluorescían en verde.

El plásmido pEGFP (Tabla 2) es un plásmido de expresión bacteriano que expresa una variante desplazada hacia el rojo de proteína verde fluorescente natural (EGFP; máximo de excitación: 488 nm; máximo de emisión: 507 nm) a partir del promotor *lac*. El esqueleto de plásmido es el derivado de pUC19, pPD16.43 (Fire y col., 1990), que proporciona un origen de replicación de alto número de copias y un gen de resistencia a ampicilina para la propagación y selección en células bacterianas. El plásmido se transformó en cepas *minCDE* de *S. typhimurium*, *E. coli* y *S. flexneri* y las bacterias recombinantes se cultivaron en caldo de infusión de cerebro-corazón (BHI; Difco Laboratories, Detroit, Michigan, EE.UU.) hasta que se alcanzó una  $DO_{600}$  de 0,6. Las minicélulas se aislaron y se purificaron a partir del cultivo mixto y se visualizaron por microscopía fluorescente (microscopio de fluorescencia DMLM, Leica Microsystems). Los resultados revelaron que todas las minicélulas fluorescieron en verde brillante, mientras que las minicélulas purificadas a partir de cepas *minCDE* de *S. typhimurium*, *E. coli* y *S. flexneri* (controles) no recombinantes no mostraron ninguna fluorescencia verde. Las minicélulas guardadas (4 °C y temperatura ambiente) se visualizaron por microscopía de fluorescencia a intervalos de tiempo de 30 minutos, 1 hora, 6 horas, 12 horas, 18 horas, 24 horas, 2 días, 1 semana y 2 semanas. Los resultados mostraron que las minicélulas estaban intactas y continuaron fluoresciendo en verde brillante durante todo el estudio. Por tanto, el plásmido pEGFP proporcionó un trazador (minicélulas que fluorescen en verde) con el que seguir la captación de minicélulas recombinantes por células de mamífero tales como macrófagos y otras células tales como células cancerosas. Estos resultados indican que proteínas recombinantes, una vez expresadas o segregadas en minicélulas, son estables durante un periodo de tiempo significativo (probablemente hasta que se compromete la integridad de las minicélulas celulares) debido a la ausencia de proteasas cromosómicamente codificadas.

Células de la línea celular de macrófagos de ratón RAW264.7 (Ralph & Nakin, 1977) obtenidas de la Colección americana de cultivos tipo (ATCC) se cultivaron *in vitro* a una densidad de células de  $10^5$  por pocillo y se infectaron con minicélulas purificadas recombinantes que llevaban el plásmido pEGFP, que se derivaron de *S. typhimurium*, *E. coli* y *S. flexneri* a una relación de minicélulas:macrófagos de 50:1 y 100:1.

Antes de la infección por macrófagos, las minicélulas purificadas se visualizaron por microscopio de fluorescencia para confirmar que la mayoría de las minicélulas llevaban EGFP y de ahí que fluorescieran en verde brillante. Como control positivo también se usó la cepa SL3261 de *S. typhimurium aroA-* (Tabla 1) que llevaba el mismo plásmido para transfectar las células de macrófago a la misma relación de bacterias:macrófagos. El control negativo (macrófagos sin infectar) también se procesó de la misma forma que las células infectadas experimentales. Las placas de cultivo se centrifugaron a 1000 g durante 10 minutos a 37 °C. Para el estudio de transfección de minicélulas, los antibióticos gentamicina (100 µg/ml) y ampicilina (200 µg/ml) se añadieron para matar cualquier célula bacteriana parental viva residual. Las salmonelas de control positivo también se destruyeron con el mismo tratamiento con antibiótico. Las placas se incubaron a 37 °C durante 30 minutos en 5 % de  $CO_2$ , seguido de tres lavados en PBS. Para el experimento de minicélulas/macrófagos derivados de *S. typhimurium*, los portaobjetos se fijaron con 4 % de formaldehído durante 40 minutos y luego se permeabilizaron con 0,2 % de Triton X-100. Después de bloquear la tinción no específica con 5 % de suero de cabra normal (NGS) en tampón fosfato que contenía 5 % de BSA, los cubreobjetos se incubaron con anticuerpo anti-lipopolisacárido (LPS) (suero aglutinante somático 4-O de *Salmonella* de conejo; dilución 1:200; Murex Biotech, Dartford, Inglaterra) durante cuatro horas a temperatura ambiente. Las células se lavaron tres veces en PBS y se incubaron con anticuerpo secundario (1:1000), Alexa Fluor 594 (Molecular Probes, Eugene, OR, EE.UU.; conjugado de cabra dirigido contra IgG de ratón, excitación: 590 nm, emisión: 617 nm) en PBS-BSA. Las placas se incubaron con el segundo anticuerpo durante 1 hora en la oscuridad y se lavaron tres veces con PBS durante 5 minutos cada uno. Los cubreobjetos se montaron con glicerol y se visualizaron por microscopía confocal.

Los resultados mostraron que las minicélulas derivadas de *S. typhimurium*, *E. coli* y *S. flexneri* fueron todas reabsorbidas por aproximadamente del 20 % al 30 % de las células de macrófago en cultivo. Las minicélulas fluorescían en verde brillante y se asociaron a los macrófagos. Las minicélulas derivadas de *S. typhimurium*, *E. coli* y *S. flexneri* no recombinantes de control no revelaron puntos fluorescentes verdes asociados a macrófagos distintos de fluorescencia de fondo no específica secundaria. La cepa *aroA-* de *S. typhimurium* recombinante de control también dio un resultado similar al observado con ambas minicélulas recombinantes.

Para confirmar que los puntos fluorescentes verdes estuvieron dentro de las células de macrófagos, es decir, eran minicélulas reabsorbidas, y no sólo adheridos a la superficie celular, se tomaron imágenes tridimensionales (usando secciones sagitales y coronales) para la interacción de minicélulas-macrófagos derivados de *S. typhimurium*. En tanto secciones coronales como sagitales, las minicélulas se localizaron dentro de los macrófagos, que indica que las minicélulas habían sido reabsorbidas por los macrófagos. Adicionalmente, el marcado de anti-O4 LPS de los puntos fluorescentes verdes (fluorescencia amarilla tras el anticuerpo secundario Alexa Fluor 594) mostró que los puntos fluorescentes verde fueron de hecho minicélulas que expresaban EGFP y no fluorescencia de fondo del artefacto. Se observó un resultado similar con la salmonela de control positivo, demostrando que las estructuras de la superficie bacteriana requeridas para la captación mediada por receptor de las células por macrófagos se conservaron sobre la superficie de la minicélula.

#### **Ejemplo 6. Captación y rotura de minicélulas en fagolisosomas macrófagos**

Para demostrar el destino intracelular de minicélulas dentro de macrófagos se llevaron a cabo estudios de TEM sobre macrófagos de ratón infectados por minicélulas derivadas de *S. typhimurium*.

Brevemente, la línea celular RAW 246.7 de macrófagos de ratón se cultivó al 50 % de confluencia en matraces T25 en medio de cultivo convencional. Las minicélulas en el orden de  $10^7$ , en 100  $\mu$ l, se añadieron directamente al medio en matraces, y el procedimiento de infección por macrófagos se llevó a cabo como se ha descrito en el Ejemplo 5. Se usó una relación aproximada de minicélula:macrófago de 10:1. Las células se recogieron para momentos de tiempo correspondientes a 30 minutos, 60 minutos y 2 horas después de la infección. También se incluyó un matraz adicional como control negativo, no recibiendo minicélulas. Las células se tripsinaron y las suspensiones se recogieron y se fijaron en 4 % de glutaraldehído (500  $\mu$ l). Las muestras se procesaron y se analizaron por TEM (Universidad de Nueva Gales del Sur, Sidney, Australia).

Los resultados mostraron que ya 30 minutos después de la infección las partículas densas en electrones de aproximadamente el tamaño de minicélulas (400 nm) se observaron dentro de vacuolas de macrófagos (Figura 5, paneles A-F). Con la progresión de tiempo (60 minutos y 2 horas), las partículas densas en electrones parecieron menos intactas con irregularidad superficial y pérdida de densidad electrónica.

Para confirmar que las partículas densas en electrones intravacuolares eran minicélulas reabsorbidas, el experimento anterior se repitió con un diferencia que era que después de los diversos intervalos de tiempo después de la infección, las células se fijaron (4 % de paraformaldehído, 0,1 % de glutaraldehído) durante 30 minutos a temperatura ambiente, se lavaron con PBS y se recogieron en 1,5 ml de PBS por un suave raspado de células. Las muestras se procesaron para inmuno-oro-TEM (unidad de EM, ICPMR, Hospital Westmead, Sidney, Australia). Las muestras se suspendieron suavemente y se procesaron por el procedimiento de congelación-sustitución. Brevemente, las muestras se marcaron con anticuerpo primario (lipopolisacárido anti-*S. typhimurium* [factor 4, especificidad por el grupo B]; Abbott Murex, EE.UU.) a dilución 1:200, seguido de anticuerpo secundario conjugado con oro (10 nm). Las muestras se visualizaron usando un microscopio electrónico Philips CM-120 BioTWIN a 80 kV. Las imágenes fueron capturadas sobre película en emulsión tipo 4489 Kodak EM.

Los resultados mostraron que las minicélulas fueron claramente identificadas por el anticuerpo anti-O4-LPS marcado con oro y que las partículas densas en electrones observadas en las vacuolas de macrófagos fueron las minicélulas derivadas de *S. typhimurium*. No se observó marcado con oro en macrófagos de control que no habían sido infectados por minicélulas. Estos datos también revelaron que en momentos de tiempo posteriores, las partículas de oro no asociadas a minicélulas se observaron en las vacuolas. Hubo un marcado aumento en las partículas de oro libres de minicélulas en momentos de tiempo posteriores y esto también se asoció a un aumento de los números de minicélulas que habían perdido la integridad de la pared celular y la densidad electrónica celular. Estos datos indican que las minicélulas siguen la ruta clásica de captación de antígenos y procesamiento presentada por los macrófagos, que incluye ingestión de partículas extrañas en endosomas tempranos seguida de fusión endosomalisosoma y rotura del antígeno en el fagolisosoma ácido. Las partículas de oro libres de minicélulas en las etapas posteriores de infección pueden indicar que los LPS han sido liberados de minicélulas procesadas o digeridas.

Estos resultados muestran que las minicélulas recombinantes no sólo son reabsorbidas por células de mamífero tales como macrófagos, sino que también son degradadas en vacuolas intracelulares, supuestamente fagolisosomas.

#### **Ejemplo 7. Expresión de proteína heteróloga por macrófagos transfectados con minicélulas**

El siguiente experimento se realizó para determinar si las minicélulas recombinantes que llevan un plásmido de expresión génica de mamífero que codifica EGFP (no expresada en células bacterianas o minicélulas) podría liberar el plásmido al núcleo de la célula de mamífero y conseguir la expresión de EGFP en la célula de mamífero.

Células de la línea celular RAW-264.7 de macrófagos de ratón se cultivaron *in vitro* y se infectaron con minicélulas derivadas de *S. typhimurium*, *E. coli* y *S. flexneri* recombinantes purificadas que llevaban el plásmido pEGFP-C1 (Tabla 2) como se ha descrito en el Ejemplo 5. Cuarenta y ocho horas después de la transfección, las células infectadas se visualizaron por microscopía confocal tridimensional.

Los resultados mostraron que aproximadamente el 20 % de los macrófagos fluorescieron en verde, sugiriendo que las minicélulas recombinantes se degradaron dentro de los macrófagos, supuestamente en fagolisosomas, y que al menos algo del ADN de plásmido liberado fue recogido por el núcleo de la célula antes de la expresión de la proteína verde fluorescente. Los macrófagos de control, es decir, macrófagos transfectados con minicélulas no recombinantes, no revelaron la fluorescencia verde. La expresión de EGFP en las células experimentales duró al menos 48 horas. Este resultado fue similar al observado con macrófagos positivos de control transfectados con el plásmido pEGFP-C1 usando electroporación con un BioRad Genepulser.

Para confirmar adicionalmente que la expresión de EGFP dentro de los macrófagos transfectados con minicélulas no era fluorescencia de fondo, este experimento se repitió para células derivadas de *S. typhimurium*. En este caso, después de la fijación con formaldehído, los cubreobjetos se incubaron con anticuerpo monoclonal anti-GFP (Clontech Laboratories, Palo Alto, CA, EE.UU.; dilución 1:300) y se incubaron durante la noche a 4 °C. Los cubreobjetos se lavaron tres veces con PBS (5 minutos por lavado) y se incubaron con 2 % de suero de cabra normal en PBS/BSA durante 20 minutos. Los cubreobjetos se lavaron dos veces con PBS y se trataron con anticuerpo secundario dirigido contra IgG de ratón conjugado con Alexa Fluor 594 en PBS (dilución 1:1000). La reacción se incubó en la oscuridad durante 1 hora y se lavó dos veces en PBS. Los cubreobjetos se visualizaron por microscopía confocal usando filtros de visualización de fluorescencia rojos (570 nm) y verdes (488 nm). Los resultados revelaron que los puntos de fluorescencia verde (excitación láser a 488 nm) observados dentro del macrófago fueron idénticos a los puntos de fluorescencia roja (excitación láser a 570 nm). Cuando se usaron ambos láser, las señales verde y roja se co-localizaron, y aparecieron como una fluorescencia amarilla. Adicionalmente, cuando la imagen 3D se construyó usando el software de imágenes Leica 3D, se encontró que la fluorescencia estaba dentro del macrófago. Estos resultados muestran que los puntos fluorescentes verdes observados fueron debidos a la expresión de macrófagos de la proteína EGFP ya que los mismos puntos se identificaron por anticuerpo monoclonal anti-GFP (fluorescencia roja).

Los resultados confirman que las minicélulas recombinantes se descomponen en células de mamífero huésped tales como macrófagos, liberando ADN de plásmido y que este ADN puede expresar proteína extraña dentro de la célula de mamífero. Esto demuestra la viabilidad de la terapia génica *in vitro* por medio de minicélulas intactas recombinantes.

Después de introducirse minicélulas recombinantes en un paciente, la presencia del producto génico heterólogo puede monitorizarse o evaluarse por un ensayo apropiado para el producto génico en el paciente, por ejemplo, en glóbulos rojos periféricos del paciente cuando la expresión es específica de células eritroides. Como se ha descrito anteriormente, la elección del ensayo es parcialmente una función del producto génico heterólogo y puede determinarse fácilmente.

#### **Ejemplo 8. Liberación de genes mediada por minicélulas y expresión génica en células de cáncer de mama humano**

Se usaron minicélulas purificadas de la cepa *minCDE* de *S. typhimurium* recombinante que lleva el plásmido pEGFP-C1 (sólo expresión génica eucariota; Tabla 2) para infectar células de cáncer de mama humano (SK-BR-3). Cuarenta y ocho horas y 96 horas después de la transfección, las células se visualizaron por microscopía confocal. Como control negativo, las minicélulas no recombinantes se usaron para transfectar células SK-BR-3 y se visualizaron de manera similar a las células experimentales.

Células de cáncer de mama SK-BR-3 (fuente ATCC, referencia nº HTB-30) se cultivaron sobre cubreobjetos en placas de 6 pocillos y se cultivaron a aproximadamente el 50 % de confluencia. Las minicélulas que llevan el plásmido de expresión de GFP eucariota pEGFP-C1 se añadieron a las células y se centrifugaron durante 10 minutos, 1000 g, para permitir el contacto minicélula / célula SK-BR-3. Las células se cultivaron durante 48 horas después de que se añadiera G-418 (400 mg/ml), no recibiendo algunos pocillos G-418. Después de otra incubación de 48 horas, todos los cubreobjetos se fijaron con 4 % de formaldehído durante 1 hora. Los cubreobjetos se incubaron con PBS-BSA (2 % de BSA en PBS) durante 20 minutos y se lavaron una vez con PBS. Los cubreobjetos se incubaron durante la noche a 4 °C con anticuerpo anti-Her-2 (Serotec, monoclonal de ratón dirigido contra IgG humana; dilución 1:100). Las células se lavaron tres veces con PBS durante 5 minutos cada lavado y se incubaron durante 1 hora en la oscuridad con anticuerpo secundario conjugado con Alexa Fluor 594 (Molecular Probe, de cabra dirigido contra IgG de ratón conjugado, excitación: 590 nm, emisión: 617 nm; dilución 1:1000 en PBS-BSA). Las células se lavaron tres veces con PBS durante 5 minutos por lavado, y los cubreobjetos se trataron con medio de pérdida de intensidad (Molecular Probes). Todos los cubreobjetos se visualizaron por microscopía confocal tridimensional (excitación con longitudes de onda para el filtro rojo: 568 nm y filtro verde: 488 nm).

Los resultados revelaron que aproximadamente el 10 % de las células de cáncer de mama expresaron claramente la proteína de fluorescencia verde que se localizó en el citosol (véase la Figura 6, paneles A-C). Esto fue claramente visible con respecto a la autofluorescencia de fondo normal presentada por las células de control. Las células se identificaron claramente con el anticuerpo anti-Her-2 (fluorescencia roja).

Este resultado demuestra que las minicélulas recombinantes pueden liberar ADN de plásmido de expresión génica de mamífero a células de no fagocito, ejemplificadas por células de cáncer de mama epiteliales, de un modo que

conduce a la expresión heteróloga dentro de las células.

#### Ejemplo 9. Liberación de genes mediada por minicélulas y expresión génica *in vivo* en ratones Balb/c

Para determinar que las minicélulas recombinantes podrían liberar un gen extraño para células del sistema inmunitario *in vivo*, los ratones se vacunaron intraperitonealmente con minicélulas derivadas de *minCDE* de *S. typhimurium* recombinantes que llevaban el plásmido pEGFP-C1 (sólo expresión génica eucariota; Tabla 2) y se compararon con ratones vacunados con la cepa  $\Delta$ aroA de *S. typhimurium* que llevaba el mismo plásmido.

Se purificaron minicélulas recombinantes como en el Ejemplo 3. Se preparó *S. typhimurium* (cepa SL3261  $\Delta$ aroA, Tabla 1) del siguiente modo. Se inocularon cinco (5) ml de caldo de soja con tripticasa (TSB, Becton Dickinson, Palo Alto, CA, EE.UU.) con un inóculo 1:100 de un cultivo durante la noche de *S. typhimurium* en TSB, y se cultivaron a 37 °C con agitación hasta que la densidad óptica (D.O.) medida a 600 nm alcanzó 0,5. Entonces, las bacterias se incubaron con gentamicina (Sigma-Aldrich, Castle Hill, NSW, Australia) a 150 µg/ml y ampicilina (Roche) a 150 µg/ml durante otras 2 horas a 37 °C con agitación.

Las bacterias muertas y las minicélulas se sedimentaron por centrifugación a 8000 rpm, se resuspendieron y se lavaron otras tres veces en BSG (solución salina tamponada con fosfato [PBS; 1,44 g de hidrogenofosfato de sodio, 0,24 g de dihidrogenofosfato de potasio, 0,2 g de cloruro de potasio, 8,0 g de cloruro sódico, pH 7,4 en 1 litro de agua destilada], que contenía 2 % de gelatina).

Los grupos de ocho ratones Balb/c de 6 semanas de edad se inocularon intraperitonealmente con 100 µl de minicélulas recombinantes o *S. typhimurium* muertas recombinantes según el programa en la Tabla 4. Un grupo de 8 ratones permaneció sin vacunar como controles negativos. Los ratones se sangraron por sangrado intraocular antes de la inoculación y en el día 14 después de la vacunación primaria. En el día 23, todos los animales se anestesiaron con una inyección intraperitoneal de 12 mg de fenobarbitona de sodio y 1 ml de sangre se recogió por punción cardíaca antes de sacrificarse los ratones. La sangre se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos en una microcentrífuga (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) y se recogió el suero para los ensayos de ELISA. Durante todo el experimento, los animales se pesaron semanalmente y se observaron diariamente para signos de toxicidad.

Tabla 4. Asignación a tratamiento para la administración *in vivo* de genes en ratones Balb/c

Número de grupo	Número de animal	Tratamiento	Dosis (100 µl de inyección IP)	Días de dosificación	Días de sangrado
1	1-8	Ninguno - control	-	-	1, 14, 23
2	9-16	Minicélulas recombinantes	10 <sup>8</sup> minicélulas por dosis	1, 5	14, 23
3	17-24	<i>S. typhimurium</i> muertas recombinantes	10 <sup>8</sup> bacterias por dosis	1, 5	14, 23
4	25-32	<i>S. typhimurium</i> muertas recombinantes	10 <sup>8</sup> bacterias por dosis	1,5,8	14, 23
5	33-40	<i>S. typhimurium</i> muertas recombinantes	10 <sup>9</sup> bacterias por dosis	1, 5	14, 23
6	41-48	<i>S. typhimurium</i> muertas recombinantes	10 <sup>9</sup> bacterias por dosis	1,5,8	14, 23

Los ensayos de ELISA se realizaron para determinar si el anticuerpo había sido generado contra GFP, es decir, si las minicélulas recombinantes pudieron liberar el plásmido de expresión de mamífero pEGFP-C1 *in vivo*. Los niveles de anticuerpo para lipopolisacárido (LPS) de *S. typhimurium* también se determinaron para todos los grupos. El procedimiento de ELISA indirecto se llevó a cabo del siguiente modo.

Placas de microtitulación de noventa y seis (96) pocillos (Greiner GMBH, Nürtingen, Alemania) se recubrieron con 50 µl por pocillo de 0,5 µg/ml de rEGFP (Clontech, Palo Alto, CA, EE.UU.) o antígeno de LPS (Sigma). Las placas se recubrieron con 1 % de BSA (Sigma) como control negativo. Las placas se cerraron y se incubaron durante la noche a 4 °C. Las placas se invirtieron para eliminar la solución de antígeno, y se añadieron 200 µl de tampón de bloqueo (0,05 % de Tween-20 [Sigma], 1 % de BSA en PBS) a cada pocillo antes de incubar durante 2 horas a temperatura ambiente. El tampón de bloqueo se eliminó y las placas se lavaron dos veces durante 5 minutos con tampón de lavado (0,05 % de Tween-20, PBS). Las muestras de suero se diluyeron 1 en 80 y 1 en 300 para EGFP y LPS, respectivamente, en tampón de bloqueo. A continuación, 100 µl de muestra se añadieron a cada pocillo y se incubaron 1 hora a temperatura ambiente con agitación. Entonces, las placas se lavaron con tampón de lavado 3

5 veces durante 5 minutos. Los anticuerpos secundarios, concretamente anticuerpo monoclonal dirigido contra inmunoglobulina de ratón conjugada con fosfatasa alcalina (cadenas ligeras  $\gamma$ - & Chemicon, Temicula, CA, EE.UU.) o anti-LPS conjugado con AP (isotipo IgG1, Biodesign International, Saco, Maine, EE.UU.) se diluyeron en tampón de bloqueo y se añadieron 100  $\mu$ l por pocillo, seguido de una incubación de 1 hora a temperatura ambiente con agitación. Los pocillos se lavaron tres veces con tampón de lavado y se añadieron 100  $\mu$ l de PNPP (sustrato de fosfato de *p*-nitrofenilo; Zymed, San Francisco, CA, EE.UU.). La absorbancia a 405 nm se leyó después de una incubación de 30 minutos a temperatura ambiente. La reacción se terminó mediante la adición de 30  $\mu$ l de NaOH 0,5 M. La significancia de los datos de ELISA se determinó por la prueba de la *t* de Student (*p*).

10 Los resultados se muestran en la Figura 7. 14 días después de la vacunación se observó una respuesta fuerte y significativa de anticuerpos (*p* < 0,02 cuando se comparó con controles) para EGFP en ratones a los que se les había administrado  $10^8$  minicélulas recombinantes intraperitonealmente, y la respuesta de anticuerpos observada fue superior a la obtenida con la mayor dosis de *S. typhimurium* muertas. Los anticuerpos para la proteína EGFP sólo serían observados si las minicélulas recombinantes que llevan el vector de expresión de mamífero pEGFP-C1 no sólo fueran reabsorbidas por macrófagos peritoneales, sino también degradadas en vacuolas intracelulares (supuestamente fagolisosomas), y que al menos algunas copias del ADN de plásmido escaparan de los fagolisosomas y entraran en el núcleo de la célula de mamífero. A partir del núcleo se produciría ARNm de EGFP y la EGFP se expresaría en el citoplasma. La EGFP sería una proteína extraña en el macrófago y de ahí que se esperara que se procesase y que los péptidos se presentaran por MHC. Este procedimiento produciría una respuesta de anticuerpos a los péptidos de EGFP. En comparación con *S. typhimurium* muertas de control, la respuesta de anticuerpos anti-EGFP fue mayor con las minicélulas recombinantes.

15 También se midió la respuesta anti-LPS para determinar la respuesta inmunitaria al vector de administración de terapia génica, las minicélulas recombinantes. Los resultados mostraron que la respuesta de anticuerpos anti-LPS fue significativa y similar para minicélulas recombinantes (*p* = 0,0004) y *S. typhimurium* muertas (*p* = 0,001). Véase la Figura 8. Este resultado indicó que las minicélulas habían retenido al menos la estructura de LPS encontrada sobre la superficie de la célula bacteriana parental. En el día 23, la respuesta de anticuerpos anti-EGFP no fue diferente de los controles inmunizados (para tanto minicélulas recombinantes como *S. typhimurium* muertas). Esto no fue sorprendente debido a que no se habían administrado inmunizaciones de refuerzo para sostener la respuesta de anticuerpos. La respuesta anti-LPS en el día 23 fue similar a la observada en el día 14. Esto no es inesperado debido a que se sabe que LPS es un potente inmunógeno que induce títulos de anticuerpos altos y sostenidos.

30 **Ejemplo 10. Liberación de genes mediada por minicélulas y expresión génica *in vivo* en ratones Balb/c con diferentes pautas de dosificación**

35 Se prepararon minicélulas recombinantes como en el Ejemplo 3. Grupos de ocho ratones Balb/c de 6 semanas de edad se inocularon intraperitonealmente con 100  $\mu$ l de minicélulas recombinantes (que contenían el plásmido pEGFP-C1; Tabla 2) según el programa mostrado en la Tabla 5. Un grupo de ocho ratones permaneció sin vacunas, como controles negativos. Los ratones se sangraron por sangrado intraocular antes de la inoculación y en el día 14 después de la vacunación primaria y el suero se recogió como en el Ejemplo 9.

**Tabla 5. Asignación a tratamiento para la administración de genes *in vivo* con diferentes pautas de dosis de minicélulas recombinantes en ratones Balb/c**

Número de grupo	Número de animal	Tratamiento	Dosis (100 $\mu$ l de inyección IP)	Días de dosificación	Días de sangrado
1	1-8	Ninguno - control	-	-	1, 14
2	9-16	Minicélulas recombinantes	$10^8$ minicélulas por dosis	1,4	14
3	17-24	Minicélulas recombinantes	$10^8$ minicélulas por dosis	1,4,8	14
4	25-32	Minicélulas recombinantes	$10^9$ minicélulas por dosis	1,4	14
5	33-40	Minicélulas recombinantes	$10^9$ minicélulas por dosis	1, 4, 8	14

40 Se realizaron ensayos de ELISA como se ha descrito previamente para determinar si se había generado el anticuerpo contra GFP, y si dosis mayores de minicélulas recombinantes o tres en vez de dos dosis permitían que el animal organizara una mayor respuesta de anticuerpos. Los niveles de anticuerpo para lipopolisacárido (LPS) de *S. typhimurium* también se determinaron para todos los grupos.

Los resultados se muestran en la Figura 9. 14 días después de la vacunación se observó una respuesta de anticuerpos muy significativa ( $p < 0,001$  cuando se comparó con controles) para EGFP en ratones a los que se les habían administrado  $10^8$  minicélulas recombinantes intraperitonealmente. Los ratones inoculados con  $10^9$  minicélulas mostraron una respuesta de anticuerpos incluso mayor para EGFP ( $p = 0,0006$  en comparación con controles), y esta dosis dio niveles de anticuerpo significativamente mayores que la dosis inferior de  $10^8$  ( $p = 0,004$ ). No hubo diferencia significativa en la respuesta de anticuerpos para la proteína EGFP cuando a los ratones se les administraron tanto dos dosis como tres dosis de minicélulas recombinantes, sugiriendo que dos dosis podían ser suficientes para lograr terapia génica en este caso.

También se midió la respuesta anti-LPS para determinar la respuesta inmunitaria a las minicélulas recombinantes. Los resultados mostraron que la respuesta de anticuerpos anti-LPS fue significativa ( $p = 0,0004$ ). Véase la Figura 10.

#### PUBLICACIONES CITADAS

- Balicki & Beutler, "Gene therapy of human disease", *Medicine (Baltimore)* 81: 69 (2002).
- Brahmbhatt, "Cloning and molecular characterization of the rfb gene cluster of *Salmonella typhimurium*", Ph.D. Thesis, University of Adelaide, Australia (1987).
- 15 Britton y col., "Characterization of a prokaryotic SMC protein involved in chromosome partitioning", *Genes Dev.* 12: 1254 (1998).
- Brückner, "A series of shuttle vectors for *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*", *Gene* 122: 187 (1992)
- Catic y col., "Introduction of protein or DNA delivered via recombinant *Salmonella typhimurium* into the major histocompatibility complex class I presentation pathway of macrophages", *Microbes Infect.* 1: 133 (1999).
- 20 Ciliberto y col., "Cell-specific expression of a transfected human alpha 1-antitrypsin gene", *Cell.* 41: 531 (1985).
- Clark-Curtiss & Curtiss, "Analysis of recombinant DNA using *Escherichia coli* minicells", *Methods Enzymol.* 101: 347 (1983).
- Courvalin y col., "Gene transfer from bacteria to mammalian cells", *C.R. Acad. Sci. III* 318: 1207 (1995).
- 25 Curiel y col., "Long-term inhibition of clinical and laboratory human immunodeficiency virus strains in human T-cell lines containing an HIV-regulated diphtheria toxin A chain gene", *Hum. Gene Ther.* 4: 741 (1993).
- Davis y col., *ADVANCED BACTERIAL GENETICS: A MANUAL FOR GENETIC ENGINEERING* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1980).
- de Boer y col., "Roles of MinC and MinD in the site-specific septation block mediated by the MinCDE system of *Escherichia coli*", *J. Bacteriol.* 174: 63 (1992).
- 30 Dietrich y col., "Delivery of antigen-encoding plasmid DNA into the cytosol of macrophages by attenuated suicide *Listeria monocytogenes*", *Nature Biotechnol.* 16: 181 (1998).
- Dinges y col., "HIV-regulated diphtheria toxin A chain gene confers long-term protection against HIV type 1 infection in the human promonocytic cell line U937", *Hum. Gene Ther.* 6: 1437 (1995).
- 35 Dorward y col., "Export and intercellular transfer of DNA via membrane blebs of *Neisseria gonorrhoeae*", *J. Bacteriol.* 171: 2499 (1989).
- Fire y col., "A modular set of lacZ fusion vectors for studying gene expression in *Caenorhabditis elegans*", *Gene* 93: 189 (1990).
- Firth y col., "Structure and function of the F factor and mechanism of conjugation", in *ESCHERICHIA COLI AND SALMONELLA: CELLULAR AND MOLECULAR BIOLOGY* 2ª ed. (1996), en las páginas 2377-2401.
- 40 Forbes, "Crossflow microfiltration", *Australian J. Biotechnology* 1: 30 (1987).
- Frain y col., "Binding of a liver-specific factor to the human albumin gene promoter and enhancer", *Mol. Cell Biol.* 10: 991 (1990).
- Frazer & Curtiss, "Production, properties and utility of bacterial minicells", *Curr Top Microbiol. Immunol.* 69: 1 (1975).
- 45 Freshner, *ANIMAL CELL CULTURE: A PRACTICAL APPROACH* 2ª ed. (Oxford/New York, IRL Press, Oxford University Press, 1992).
- Gentschev y col., "Delivery of protein antigens and DNA by virulence-attenuated strains of *Salmonella*

- typhimurium and *Listeria monocytogenes*", *J. Biotechnol.* 83: 19 (2000).
- Grillot-Courvalin y col., "Functional gene transfer from intracellular bacteria to mammalian cells", *Nat. Biotechnol.* 16: 862 (1998).
- 5 Grillot-Courvalin y col., "Wild-type intracellular bacteria deliver DNA into mammalian cells", *Cell Microbiol.* 4: 177 (2002).
- Hanahan, "Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids", *J. Mol. Biol.* 166: 557 (1983).
- Haibin y col., "siRNA-mediated gene silencing in vitro and in vivo", *Nat. Biotechnol.* 20: 1006 (2002).
- Hanahan, "Heritable formation of pancreatic beta-cell tumors in transgenic mice expressing recombinant insulin/simian virus 40 oncogenes", *Nature* 315: 115 (1985).
- 10 Harlow y col., "Cloning and characterization of the gsk gene encoding guanosine kinase of *Escherichia coli*", *J. Bacteriol.* 177: 2236 (1995).
- Harrison y col., "Inhibition of human immunodeficiency virus-1 production resulting from transduction with a retrovirus containing an HIV-regulated diphtheria toxin A chain gene", *Hum. Gene Ther.* 3: 461 (1992a).
- 15 Harrison y col., "Inhibition of HIV production in cells containing an integrated, HIV- regulated diphtheria toxin A chain gene", *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 8: 39 (1992b).
- Harry, "Bacterial cell division: Regulating Z-ring formation", *Mol. Microbiol.* 40: 795 (2001).
- Hart, "Tissue specific promoters in targeting systematically delivered gene therapy", *Semin. Oncol.* 23: 154 (1996).
- 20 Hashimoto-Gotoh y col., "Specific-purpose plasmid cloning vectors. I. Low copy number, temperature-sensitive, mobilization-defective pSC101-derived containment vectors", *Gene* 16: 227 (1981).
- Heim y col., "Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein", *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 91: 12501 (1994).
- Hiraga y col., "Chromosome partitioning in *Escherichia coli*: novel mutants producing anucleate cells", *J. Bacteriol.* 171: 1496 (1989).
- 25 Hoiseth y col., "Aromatic-dependent *Salmonella typhimurium* are non-virulent and effective as live vaccines", *Nature* 291: 238 (1981).
- Hu & Lutkenhaus, "Topological regulation of cell division in *Escherichia coli* involves rapid pole to pole oscillation of the division inhibitor MinC under the control of MinD and MinE", *Mol. Microbiol.* 34: 82 (1999).
- 30 Ireton y col., "spo0J is required for normal chromosome segregation as well as the initiation of sporulation in *Bacillus subtilis*", *J. Bacteriol.* 176: 5320 (1994).
- Katabi y col., "Hexokinase Type II: A Novel Tumor Specific Promoter for Gene-Targeted Therapy Differentially Expressed and Regulated in Human Cancer Cells", *Human Gene Therapy* 10: 155 (1999).
- Katsui y col., "Heat-induced blebbing and vesiculation of the outer membrane of *Escherichia coli*", *J. Bacteriol.* 151: 1523 (1982).
- 35 Kelsey y col., "Species- and tissue-specific expression of human alpha 1-antitrypsin in transgenic mice", *Genes and Devel.* 1: 161 (1987).
- Kerem y col., "Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis", *Science* 245: 1073 (1989).
- Kihara y col., "Analysis of a FlIM-FlIN flagellar switch fusion mutant of *Salmonella typhimurium*", *J. Bacteriol.* 178: 4582 (1996).
- 40 Kurane y col., "Targeted Gene Transfer for Adenocarcinoma Using a Combination of Tumor specific Antibody and Tissue-specific Promoter", *Jpn. J. Cancer Res.* 89: 1212 (1998).
- Leder y col., "Consequences of widespread deregulation of the c-myc gene in transgenic mice: multiple neoplasms and normal development", *Cell* 45: 485 (1986).
- 45 Levin y col., "Identification of *Bacillus subtilis* genes for septum placement and shape determination", *J. Bacteriol.* 174: 6717 (1992).

- MacDonald y col., "Expression of the pancreatic elastase I gene in transgenic mice", *Hepatology* 7: 425 (1987).
- Macrina y col., "A cloning vector able to replicate in *Escherichia coli* and *Streptococcus sanguis*", *Gene* 19: 345 (1982).
- 5 Marcil & Higgins. "Direct transfer of plasmid DNA from yeast to *E. coli* by electroporation", *Nucl. Acids Res.* 20: 917 (1992).
- Mason y col., "The hypogonadal mouse: reproductive functions restored by gene therapy", *Science* 234: 1372 (1986).
- Matsuzaki y col., "Interactions of an antimicrobial peptide, magainin 2, with outer and inner membranes of Gram-negative bacteria", *Biochim Biophys. Acta.* 1327: 119 (1997).
- 10 Miller & Mekalanos, "A novel suicide vector and its use in construction of insertion mutations: osmoregulation of outer membrane proteins and virulence determinants in *Vibrio cholerae* requires *toxR*", *J. Bacteriol.* 170: 2575 (1988).
- Mori, "Complete and shotgun sequencing: *yehV*, *minE*, *minD*, *minC*, *ypjA* from *Escherichia coli* strain K12", direct submission to the DDBJ/EMBL/GenBank databases (1996).
- 15 Morton & Potter, "Rhabdomyosarcoma-specific expression of the herpes simplex virus thymidine kinase gene confers sensitivity to ganciclovir", *J. Pharmacology & Exper. Therapeutics* 286: 1066 (1998).
- Okada y col., "Possible function of the cytoplasmic axial filaments in chromosomal segregation and cellular division of *Escherichia coli*", *Sci. Prog.* 77: 253 (1993-94).
- 20 Okada y col., "Cytoplasmic axial filaments in *Escherichia coli* cells: possible function in the mechanism of chromosome segregation and cell division", *J. Bacteriol.* 176: 917 (1994).
- Pearson & Lipman, "Improved tools for biological sequence comparison", *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85: 2444 (1988).
- Pikaar y col., "Opsonic activities of surfactant proteins A and D in phagocytosis of gram-negative bacteria by alveolar macrophages", *J. Infect. Dis.* 172: 481 (1995).
- 25 Pinkert y col., "An albumin enhancer located 10 kb upstream functions along with its promoter to direct efficient, liver-specific expression in transgenic mice", *Genes and Devel.* 1: 268 (1987).
- Prasher y col., "Using GFP to see the light", *Trends in Genetics* 11: 320 (1995).
- Ragheb y col., "Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 by Tat/Rev-regulated expression of cytosine deaminase, interferon alpha2, or diphtheria toxin compared with inhibition by transdominant Rev", *Hum. Gene Ther.* 10: 103 (1999).
- 30 Ralph & Nakoinz, "Antibody-dependent killing of erythrocyte and tumor targets by macrophage-related cell lines: Enhancement by PPD and LPS", *J. Immunol.* 119: 950 (1977).
- Raskin & de Boer, "MinDE-dependent pole-to-pole oscillation of division inhibitor MinC in *Escherichia coli*", *J. Bacteriol.* 181: 6419 (1999).
- 35 Readhead y col., "Myelin deficient mice: expression of myelin basic protein and generation of mice with varying levels of myelin", *Cell* 48: 703 (1987).
- Reeve, "Use of minicells for bacteriophage-directed polypeptide synthesis", *Methods Enzymol.* 68: 493 (1979).
- Reeve & Cornett, "Bacteriophage SPO1-induced macromolecular synthesis in minicells of *Bacillus subtilis*", *J. Virol.* 15: 1308 (1975).
- 40 Riezman, "Three clathrin-dependent budding steps and cell polarity", *Trends in Cell Biology.* 3: 330 (1993).
- Riordan y col., "Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA", *Science* 245: 1066 (1989).
- Romano y col., "Gene transfer technology in therapy: current applications and future goals", *Oncoologist* 3: 225 (1998).
- 45 Romano y col., "Gene transfer technology in therapy: current applications and future goals", *Stem Cells.* 17: 191 (1999).

- Rommens y col., "Identification of the cystic fibrosis gene: Chromosome walking and jumping", *Science* 245: 1059 (1989).
- Sambrook y col., *MOLECULAR CLONING: LABORATORY MANUAL* 2ª ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989).
- 5 Sancar y col., "Simple method for identification of plasmid-coded proteins", *J. Bacteriol.* 137: 692 (1979).
- Sandvig & Deurs, "Endocytosis without clathrin", *Trends in Cell Biology.* 4: 275 (1994).
- Seeliger, *LISTERIOSIS*, 2ª ed., en la página 308 (Karger, 1961).
- Shangara y col., "Suicide genes: past, present and future perspectives", *Immunology Today* 21: 48 (2000).
- 10 Shaw & Griffen, "Phagocytosis requires repeated triggering of macrophage phagocytic receptors during particle ingestion", *Nature* 289: 409 (1981).
- Shigekawa & Dower, "Electroporation of eukaryotes and prokaryotes: A general approach to the introduction of macromolecules into cells", *BioTechniques* 6: 742 (1988).
- Simon y col., "A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria", *Biotechnology* 1: 784 (1983).
- 15 Sizemore y col., "Attenuated *Shigella* as a DNA delivery vehicle for DNA-mediated immunization", *Science* 270: 299 (1995).
- Speert y col., "Functional characterization of macrophage receptors for In-vitro phagocytosis of unopsonized *Pseudomonas-aeruginosa*", *J. Clin. Invest.* 82: 872 (1988).
- 20 Spencer, "Developments in suicide genes for preclinical and clinical applications", *Molecular Therapeutics* 2: 433 (2000).
- Stewart & D'Ari, "Genetic and morphological characterization of an *Escherichia coli* chromosome segregation mutant", *J. Bacteriol.* 174: 4513 (1992).
- Sullivan y col., "New shuttle vectors for *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* which allow rapid detection of inserted fragments", *Gene* 29: 21 (1984).
- 25 Swift y col., "Tissue-specific expression of the rat pancreatic elastase I gene in transgenic mice", *Cell* 38: 639 (1984).
- Trieu-Cuot y col., "Shuttle vectors containing a multiple cloning site and a lacZ alpha gene for conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to gram-positive bacteria", *Gene* 102: 99 (1991).
- 30 Wachi y col., "New mre genes mreC and mreD, responsible for formation of the rod shape of *Escherichia coli* cells", *J. Bacteriol.* 171: 6511 (1989).
- Wadhwa y col., "Cancer gene therapy: Scientific basis", *Ann. Rev. Med.* 53: 437 (2002).
- Wright & Jong, "Interferon-gamma depresses binding of ligand by c3b and c3bi receptors on cultured human monocytes, an effect reversed by fibronectin", *Experimental Medi.* 163: 1245 (1986).
- 35 Yanisch-Perron y col., "Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors", *Gene* 33: 103 (1985).
- Yazawa y col., "Current progress in suicide gene therapy for cancer", *World J. Surg.* 26: 783 (2002).

LISTADO DE SECUENCIAS

- 40 <110> EnGeneIC Molecular Delivery Pty Ltd.
- <120> MINICÉLULAS INTACTAS COMO VECTORES PARA TRANSFERENCIA DE ADN Y TERAPIA GÉNICA *IN VITRO* E *IN VIVO*
- 45 <130> 15781EP01
- <160> 19
- <170> PatentIn Ver. 3.2

# ES 2 584 305 T3

5  
<210> 1  
<211> 37  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

10  
<400> 1  
ctctcactgg aatcatgtc aaacacgcca atcgagc 37

15  
<210> 2  
<211> 38  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

20  
<400> 2  
ctctggcaa agcttttatt ttgactctc ggcttcg 38

25  
<210> 3  
<211> 44  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

30  
<400> 3  
ctctgtagt caccgggta cgcggaacc gcttctctt tacc 44

35  
<210> 4  
<211> 46  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

40  
<400> 4  
ctctgtagt caccgggtc tagagaaccg gtgattctg acgcca 46

45  
<210> 5  
<211> 37  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

50  
<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

55  
<400> 5  
ctctcactga atcatgtca aacactcaa tcgagct 37

60  
<210> 6  
<211> 35  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

65  
<400> 6  
ctctggcaa gcttattca gctctctgc ttccg 35

# ES 2 584 305 T3

5  
<210> 7  
<211> 43  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

10  
<400> 7  
ctctcataac ccgggtctag aggcgtgatc ccagaggatc aat 43

<210> 8  
<211> 42  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

20  
<400> 8  
ctctcattcc ccgggtacct gtggagcata aatacgctga cc 42

<210> 9  
<211> 37  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

30  
<400> 9  
ctccagtcta agcttaggag ccgcgcttac tattagc 37

<210> 10  
<211> 40  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

40  
<400> 10  
ctccagtctg agctcgaaga agaatgtca aattaaaggc 40

<210> 11  
<211> 42  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

50  
<400> 11  
ctccagtctg gatcctctag aatcccctgg aacctgaaca ac 42

<210> 12  
<211> 41  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

60  
<400> 12  
ctccagtctg gatccgttac cccggaata tcagcagttc g 41

# ES 2 584 305 T3

5  
<210> 13  
<211> 38  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

10  
<400> 13  
ctccagtctt ctagattttt gcgcttaaaa ccagtcac 38

15  
<210> 14  
<211> 38  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

20  
<400> 14  
ctccagtctg gtacaaaac cttctcaac taacgggg 38

25  
<210> 15  
<211> 38  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

30  
<400> 15  
ctccagtctt ctagagagat aagacgggtc gtgttcgt 38

35  
<210> 16  
<211> 38  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

40  
<400> 16  
ctccagtctg gtaccagaat gcagaagatg aaagctgg 38

45  
<210> 17  
<211> 38  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

50  
<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

55  
<400> 17  
ctccagtctg aattctgaag gatgcttagg aagacgag 38

60  
<210> 18  
<211> 35  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

65  
<400> 18  
ctccagtctg aattccgcca tgacagccat gataa 35

## ES 2 584 305 T3

<210> 19  
<211> 38  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

5

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

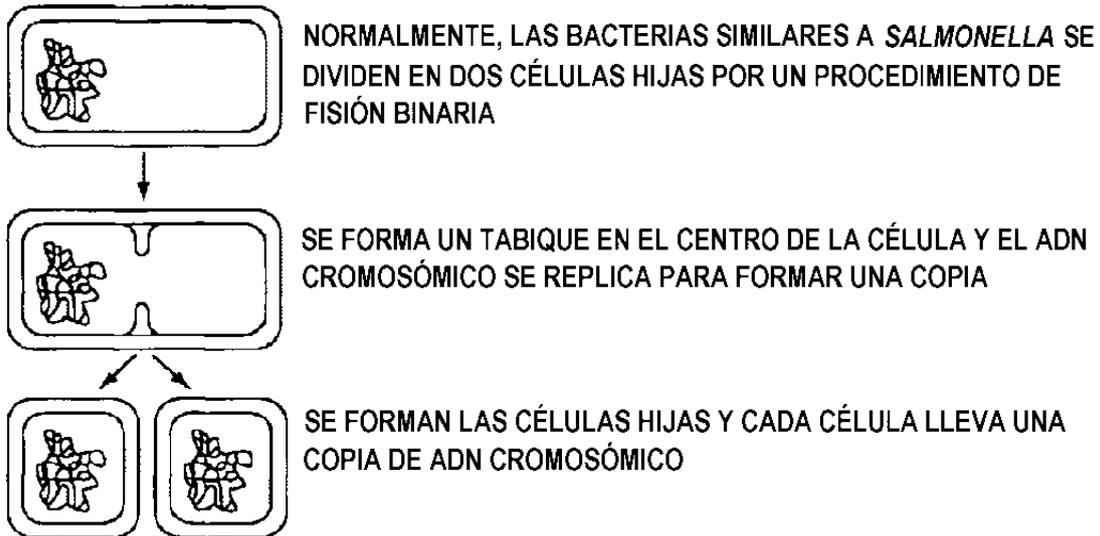
10

<400> 19  
ctccagctcg aattcaaggt gcgtgaagt gttggtat 38

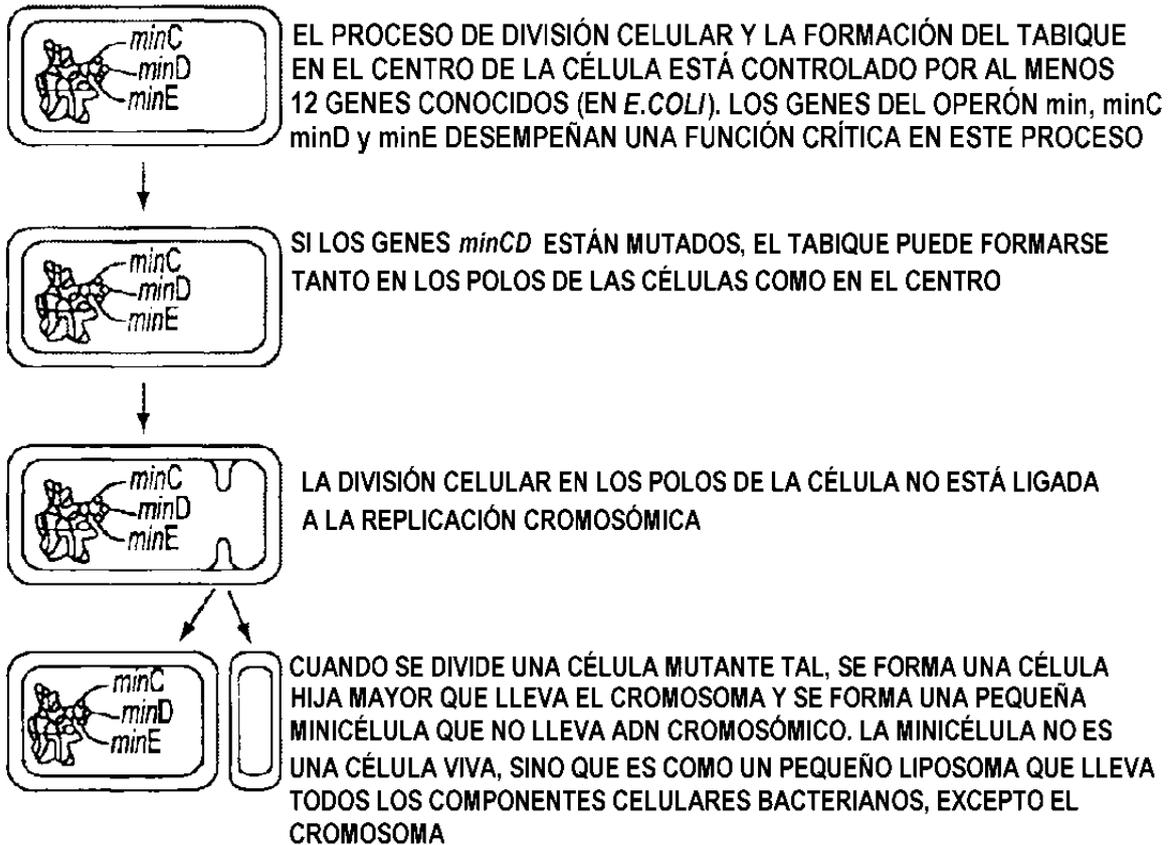
## REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende
  - (i) minicélulas bacterianas intactas recombinantes y
  - (ii) un vehículo farmacéuticamente aceptable para las mismas, en la que dichas minicélulas contienen una molécula de ácido nucleico terapéutico y en la que dicha composición está libre de bullas bacterianas de 0,2  $\mu\text{m}$  o menos de tamaño.
2. Una composición según la reivindicación 1, en la que dicha composición contiene menos de aproximadamente 1 célula parental contaminante bacteriana por  $10^7$  minicélulas.
3. Una composición según la reivindicación 1, en la que dicha composición contiene menos de aproximadamente 1 célula parental contaminante bacteriana por  $10^8$  minicélulas.
4. Una composición según la reivindicación 1, en la que dicha composición contiene aproximadamente 1 célula parental contaminante bacteriana por  $10^9$  minicélulas.
5. Una composición que consiste esencialmente en minicélulas bacterianas intactas recombinantes que contienen una molécula de ácido nucleico terapéutico, en la que dicha composición está libre de bullas bacterianas de 0,2  $\mu\text{m}$  o menos de tamaño.
6. Una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en la que dicha composición contiene al menos  $10^6$  minicélulas.
7. Un procedimiento de transformación genética que comprende (i) proporcionar minicélulas bacterianas intactas recombinantes que contienen una molécula de ácido nucleico terapéutico y (ii) poner dichas minicélulas en contacto *in vitro* con células de mamífero competentes para endocitosis no fagocíticas, de forma que dichas minicélulas sean reabsorbidas por dichas células de mamífero, preparando así células de mamífero que contienen dicho ácido nucleico terapéutico.
8. Uso de minicélulas bacterianas intactas recombinantes en la preparación de un medicamento para el tratamiento de cáncer, en el que dichas minicélulas contienen una molécula de ácido nucleico terapéutico y en el que dicho medicamento está libre de bullas bacterianas de 0,2  $\mu\text{m}$  o menos de tamaño.
9. Minicélulas bacterianas intactas recombinantes que contienen una molécula de ácido nucleico terapéutico, para su uso como fármaco, en el que dichas minicélulas están libres de bullas bacterianas de 0,2  $\mu\text{m}$  o menos de tamaño.
10. Una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 para su uso como producto farmacéutico.
11. Minicélulas bacterianas intactas recombinantes que contienen una molécula de ácido nucleico terapéutico, para uso en un procedimiento de tratamiento de cáncer, en las que dichas minicélulas están libres de bullas bacterianas de 0,2  $\mu\text{m}$  o menos de tamaño.
12. Una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, para su uso en un procedimiento de tratamiento de cáncer.

**PROCESO NORMAL DE DIVISIÓN CELULAR**



**EJEMPLO DEL PROCESO DE LA FORMACIÓN DE MINICÉLULAS**



**FIG. 1**

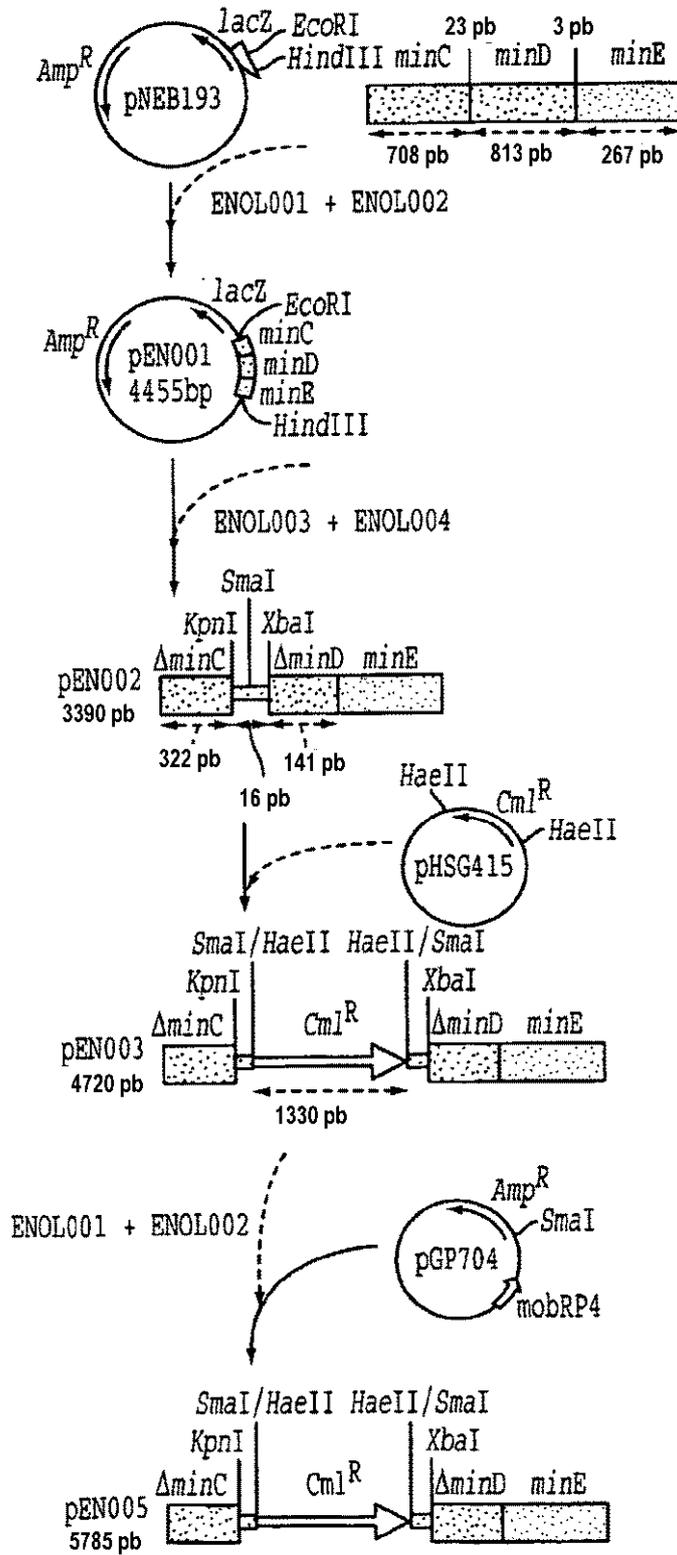


FIG. 2

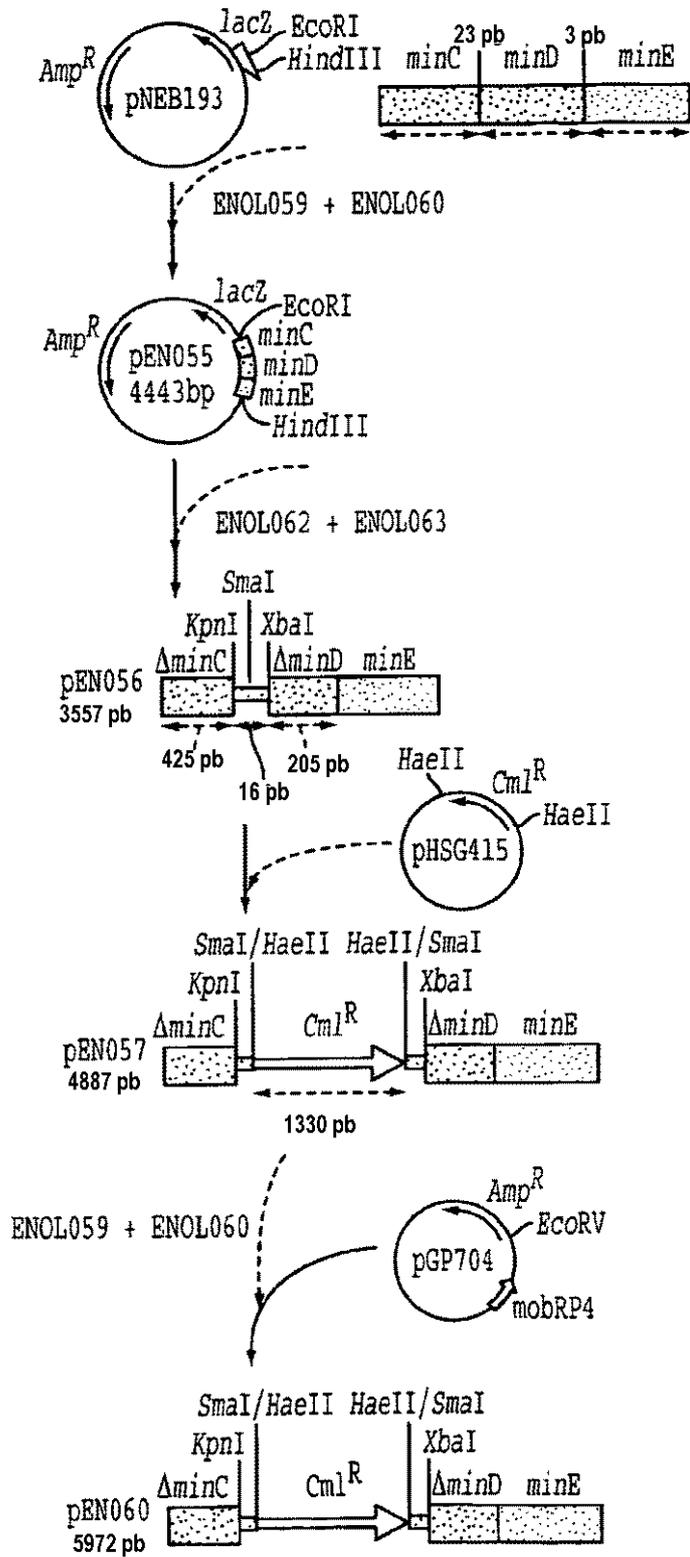


FIG. 3

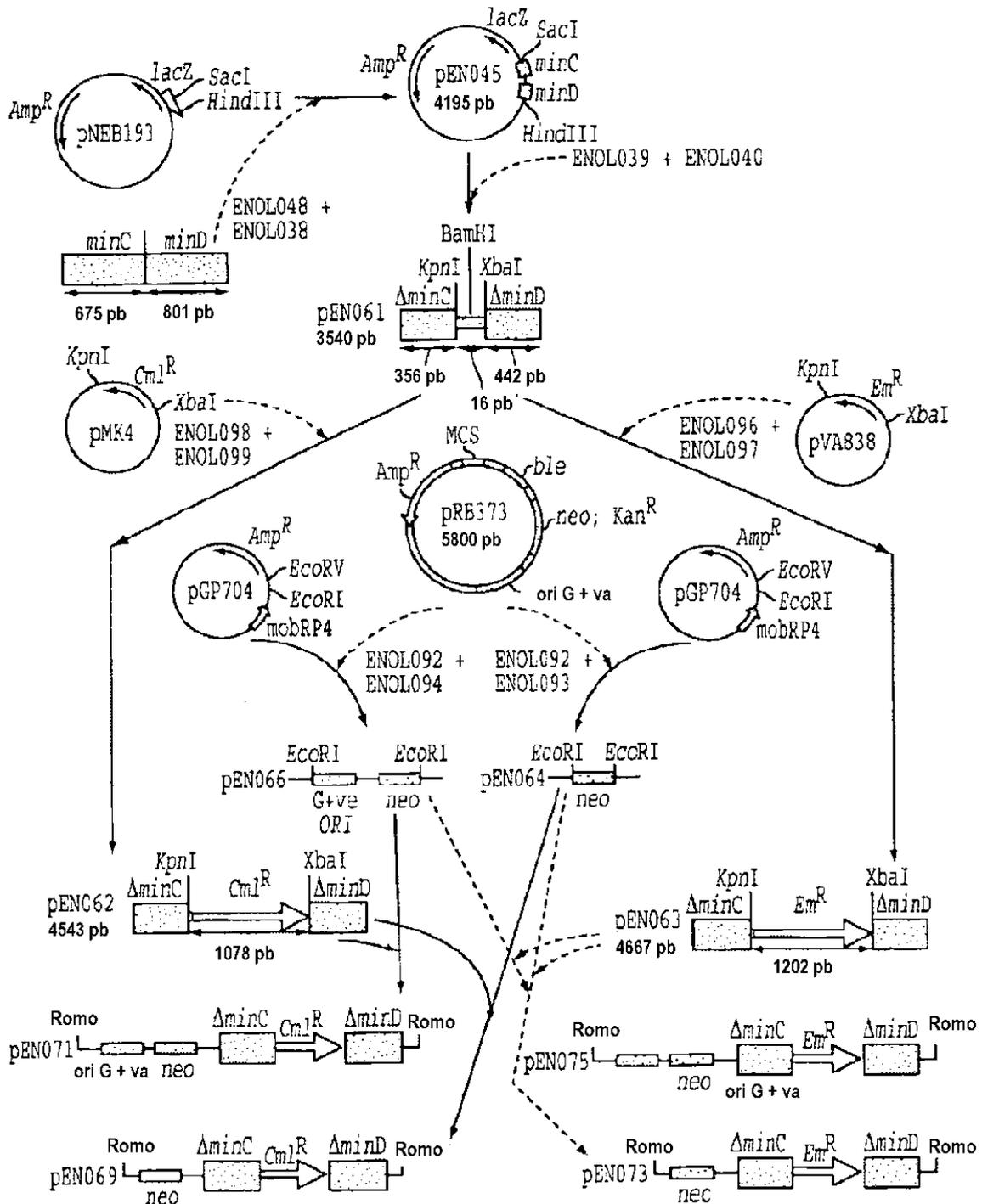


FIG. 4



30 min DESPUÉS DE LA INFECCIÓN. 20 K

FIG. 5A



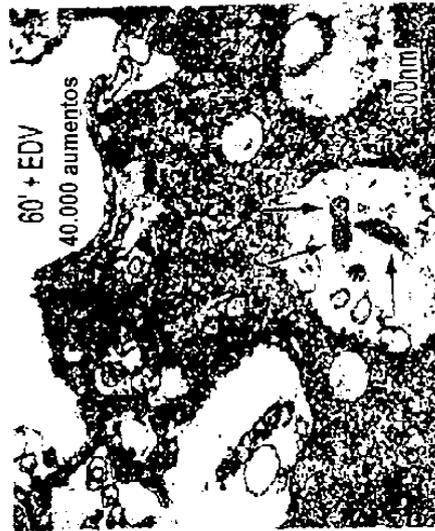
MISMO QUE (A) PERO A 30 K

FIG. 5B



30 min. DESPUÉS DE LA INFECCIÓN. 17 K

FIG. 5C



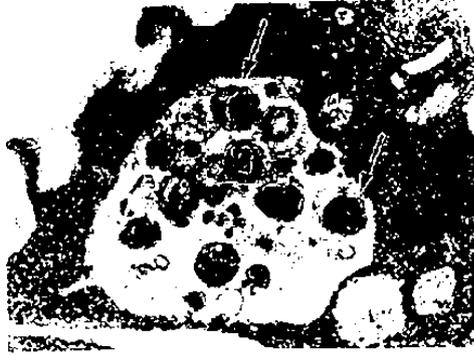
60 min. DESPUÉS DE LA INFECCIÓN. 40 K

FIG. 5D



2 h. DESPUÉS DE LA INFECCIÓN. 30 K

FIG. 5E



2 h. DESPUÉS DE LA INFECCIÓN. 27,5 K

FIG. 5F

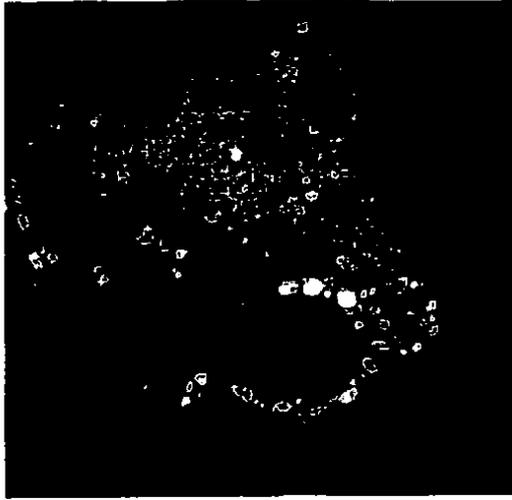


FIG. 6C

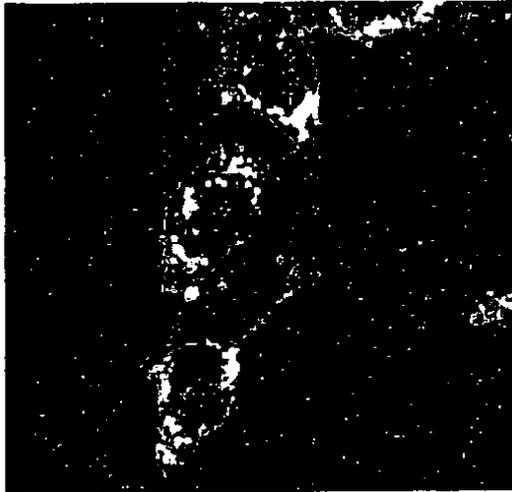


FIG. 6B



FIG. 6A

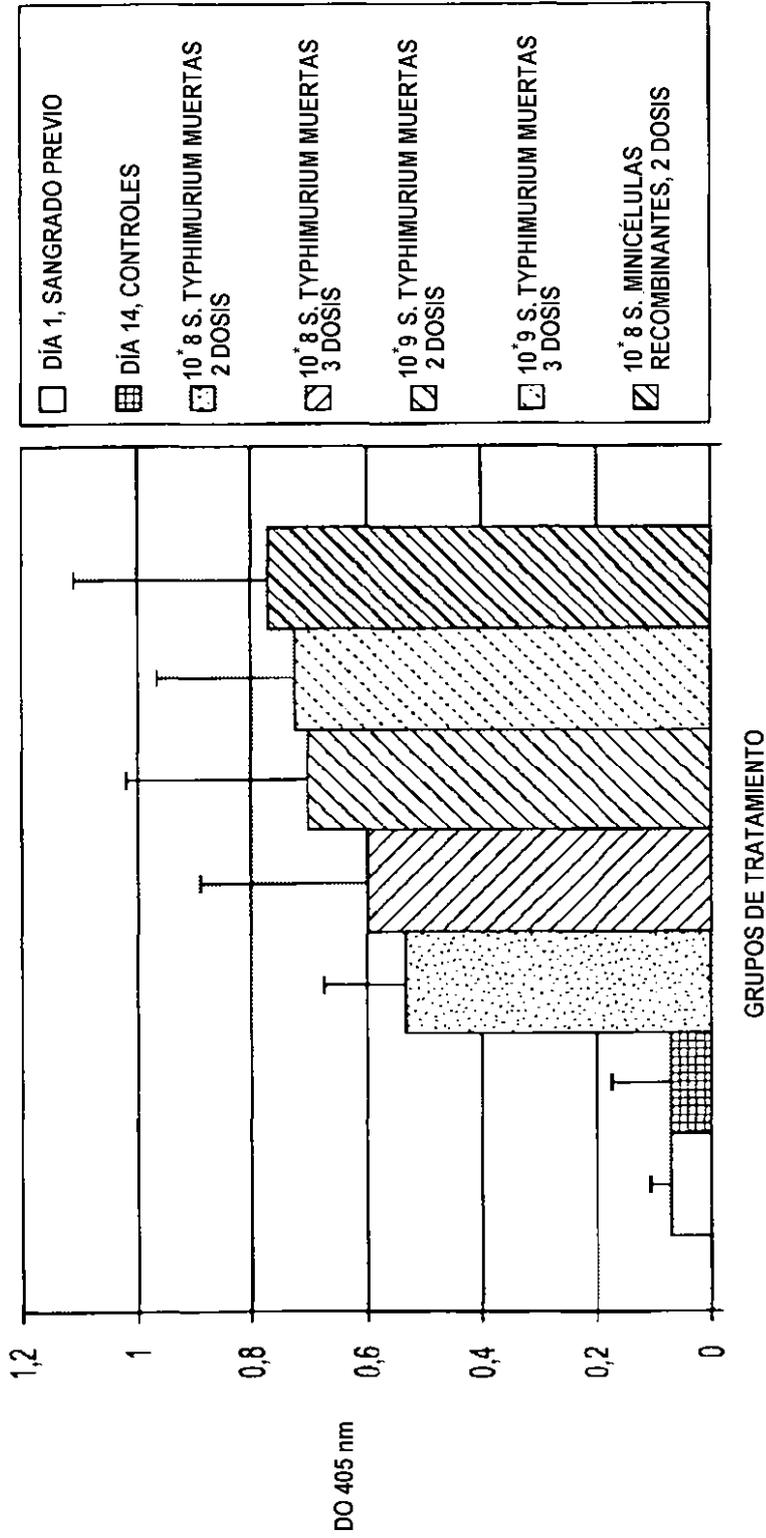


FIG. 7

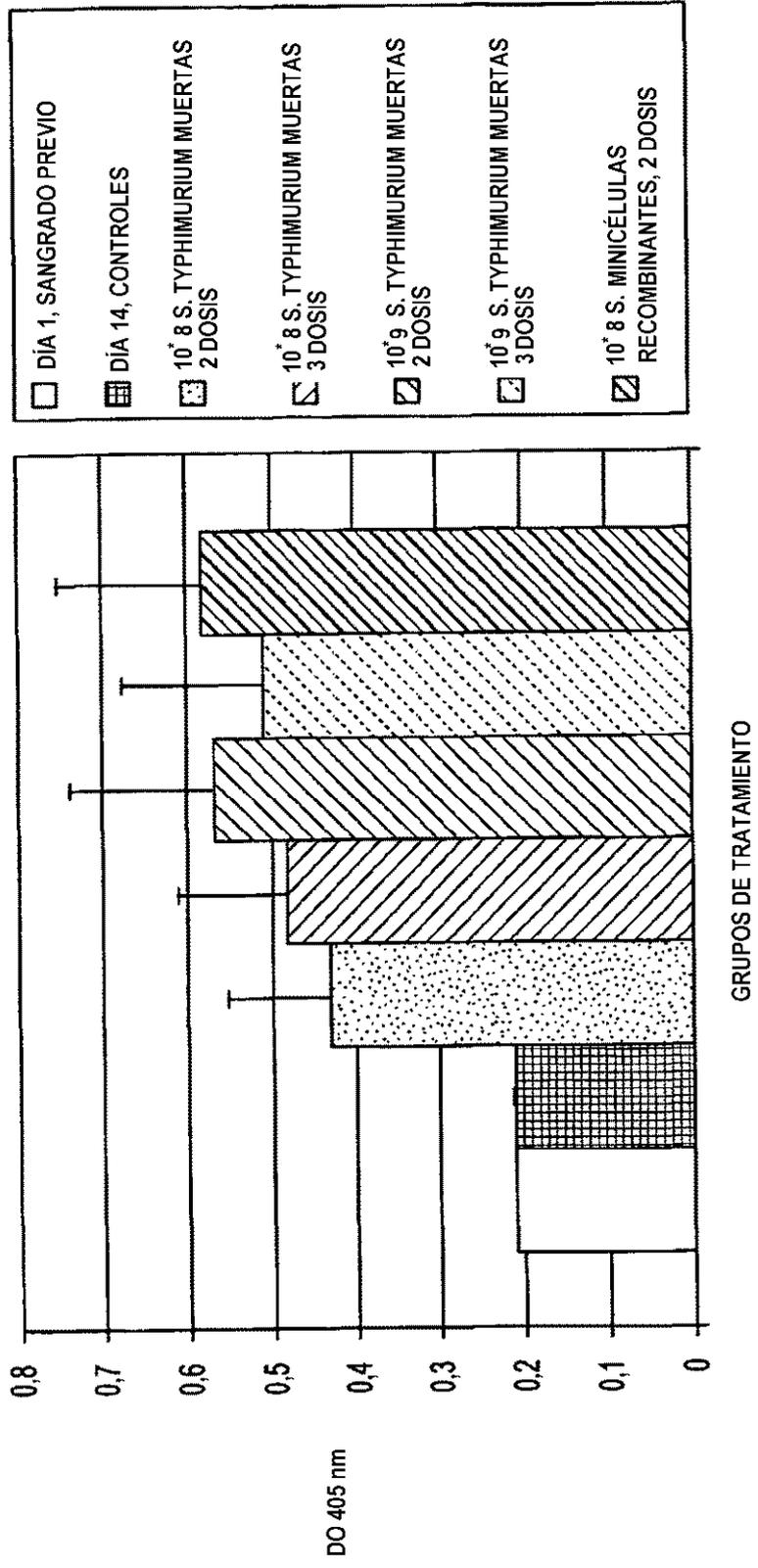


FIG. 8

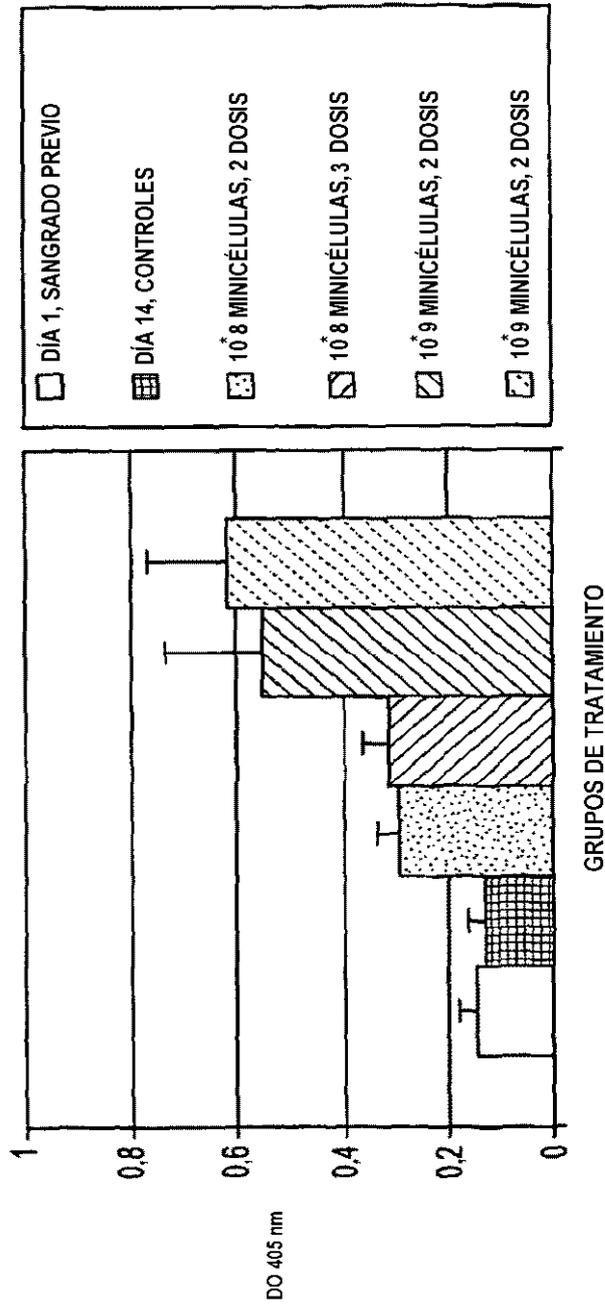


FIG. 9

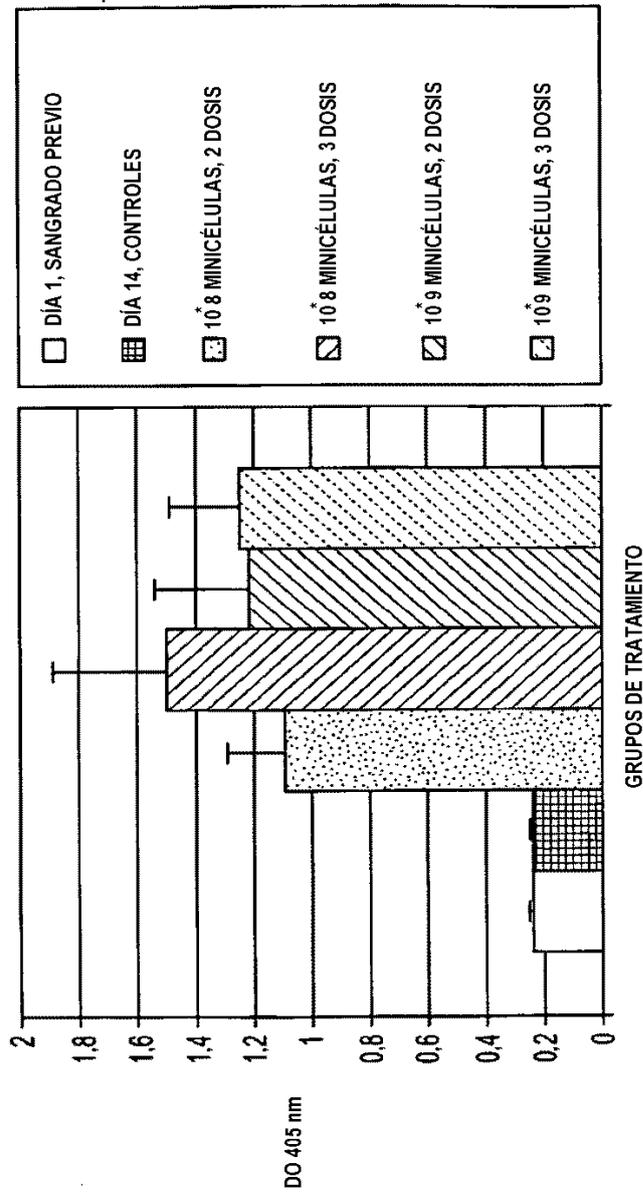


FIG. 10