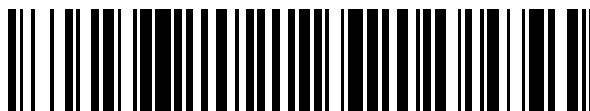


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 602 572**

51 Int. Cl.:

C12N 1/02

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.06.2004** **E 10180971 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.08.2016** **EP 2333044**

54 Título: **Método farmacéuticamente compatible para purificar minicélulas bacterianas intactas**

30 Prioridad:

24.06.2003 US 602021

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.02.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**BRAHMBHATT, HIMANSHU y
MACDIARMID, JENNIFER**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

Observaciones :

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques
o Bemerkungen) en el folleto original publicado
por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 602 572 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

Método farmacéuticamente compatible para purificar minicélulas bacterianas intactas

Antecedentes de la invención

La presente invención se refiere a una preparación de una composición purificada de minicélulas obtenidas a partir de bacterias que está esencialmente libre de endotoxinas.

Una minicélula es una forma anucleada de una célula de *E. coli* o de otra célula bacteriana, engendrada por una perturbación en la coordinación, durante la fisión binaria, de la división celular con segregación del ADN. La replicación cromosómica procariótica está ligada a la fisión binaria normal, que implica la formación de un septo celular medio. En *E. Coli*, por ejemplo, la mutación de los genes *min*, tal como *minCD*, puede eliminar la inhibición de la formación del septo en los polos de la célula durante la división celular, lo que da lugar a la producción de una célula hija normal y una minicélula anucleada (de Boer *et al.*, 1992; Raskin y de Boer, 1999; Hu y Lutkenhaus, 1999; Harry, 2001).

Además de las mutaciones del operón *min*, las minicélulas anucleadas también se generan después de una serie de otros reordenamientos genéticos o mutaciones que afectan a la formación del septo, por ejemplo, en el *divIVB1* en *B. subtilis* (Reeve y Cornett, 1975; Levin *et al.*, 1992). También pueden formarse minicélulas después de una perturbación en los niveles de expresión génica de las proteínas implicadas en la división celular/segregación cromosómica. Por ejemplo, la sobreexpresión de *minE* lleva a la división polar y producción de minicélulas. De forma similar, pueden producirse minicélulas sin cromosomas a partir de defectos en la segregación cromosómica, por ejemplo la mutación *smc* en *Bacillus subtilis* (Britton *et al.*, 1998), delección *spoOJ* en *B. subtilis* (Ireton *et al.*, 1994), mutación *mukB* en *E. coli* (Hiraga *et al.*, 1989) y mutación *parC* en *E. coli* (Stewart y D'Ari, 1992). Pueden proporcionarse productos génicos en *trans*. Cuando se sobreexpresa de un plásmido con un número de copias elevado, por ejemplo, CafA puede aumentar la tasa de división celular y/o inhibir la partición cromosómica después de la replicación (Okada *et al.*, 1994), dando como resultado la formación de células encadenadas y minicélulas anucleadas (Wachi *et al.*, 1989; Okada *et al.*, 1993).

Las minicélulas son distintas de otras vesículas pequeñas que se generan y se liberan espontáneamente en algunas situaciones y, a diferencia de las minicélulas, no se deben a reordenamientos genéticos específicos o expresión génica episomal. Ejemplos de dichas otras vesículas son las ampollas bacterianas, que son vesículas de membrana pequeñas (Dorward *et al.*, 1989). Se han observado ampollas en varias especies bacterianas de *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Bordetella*, *Escherichia*, *Neisseria*, *Pseudomonas*, *Salmonella* y *Shigella*, por ejemplo. Las ampollas bacterianas pueden producirse, por ejemplo, mediante la manipulación del entorno de crecimiento (Katsui *et al.*, 1982) y mediante el uso de agentes desestabilizadores de membrana exógenos (Matsuzaki *et al.*, 1997).

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

Una publicación de patente reciente, WO 03033519, ha descrito minicélulas intactas recombinantes que contienen moléculas de ácido nucleico terapéuticas. Dichas minicélulas son vectores eficaces para suministrar oligonucleótidos y polinucleótidos a células huésped *in vitro* e *in vivo*. Consecuentemente, son particularmente útiles para introducir moléculas de ácido nucleico que, por transcripción y/o traducción, actúan para mejorar o tratar de otro modo una enfermedad o modificar un rasgo asociado con un tipo de célula, tejido u órgano particular de un sujeto.

El documento Khachaturians *et al.*, *Preparative Biochemistry*, Vol. 3, Nº 3 (1973), páginas 291-298, describe un método para preparar minicélulas en el que las bacterias contaminantes presentes en cultivos de minicélulas después de centrifugación diferencial a baja velocidad se convierten en células filamentosas largas y se matan por tratamiento sónico.

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

Las técnicas convencionales implican (a) centrifugación a baja velocidad, para reducir la biocarga de células parentales y (b) sedimentación por velocidad diferencial en un gradiente de glicerol, sacarosa o percol. Una

centrifugación diferencial inicial, a baja velocidad, generalmente reduce las células parentales en tanto como 100 veces, dejando a la vez 50% a 70% de minicélulas en el fluido sobrenadante. Dos ciclos subsiguientes de sedimentación de velocidad diferencial producen entonces preparaciones de minicélulas que tienen una pureza de aproximadamente 1 célula vegetativa por 10^6 - 10^7 minicélulas. Dichos métodos convencionales han sido revisados en el documento de Frazer y Curtiss (1975) y se describen en los documentos de Reeve (1979), Clark-Curtiss y Curtiss (1983) y en la patente estadounidense N° 4.311.797 (de Khachatourians).

La pureza obtenida por los métodos de purificación convencionales puede no ser adecuada para todas las aplicaciones *in vivo*, algunas de las cuales pueden requerir dosis mayores de 10^6 minicélulas o incluso 10^{10} minicélulas. Con la relación de contaminación mencionada anteriormente, esto se traduciría en 10.000 células parentales vivas por dosis. Dicho nivel de contaminación podría ser letal, particularmente en pacientes inmunocomprometidos, tales como pacientes de cáncer y SIDA. Por ejemplo, la DI_{50} (dosis infecciosa para 50% de las personas infectadas) para los organismos *Shigella dysenteriae*, *Salmonella enteritidis* y *Listeria monocytogenes* es de aproximadamente 10, 1.000, y 10 respectivamente. Además, estudios previos han indicado que el nivel de contaminación de células parentales varía con las diferentes cepas bacterianas (Clarke-Curtiss y Curtiss, 1983). A este respecto, las aplicaciones de terapia génica descritas en el documento PCT/IB02/04632 pueden emplear minicélulas obtenidas a partir de una serie de cepas bacterianas Gram-negativas y Gram-positivas mutantes y requerirían minicélulas que estén esencialmente libres de contaminación de células bacterianas parentales vivas. Por lo tanto, los métodos de purificación de minicélulas convencionales no permiten el control de calidad para la elaboración según las cGMP (buenas prácticas de elaboración actuales) de dosis biofarmáceuticas de minicélulas.

Como un inconveniente adicional, los medios de formación de gradiente (percol, sacarosa y glicerol) empleados por los métodos de purificación convencionales son incompatibles con usos *in vivo*. El percol es tóxico y, por lo tanto, está restringido a contextos de "únicamente fines de investigación". La sacarosa confiere a los gradientes una osmolaridad elevada que puede producir cambios fisiológicos en las minicélulas. De hecho, los inventores han determinado que las minicélulas experimentan un choque osmótico en gradientes de sacarosa y, como consecuencia, se vuelven deformadas estructuralmente. El glicerol es muy viscoso y difícil de eliminar completamente de las suspensiones de minicélulas. Consecuentemente, aunque estos medios de gradiente de densidad separan eficazmente células y orgánulos o componentes celulares, no son adecuados para separar células biológicas que estén destinadas a uso clínico en humanos.

Se han desarrollado varios enfoques para mejorar las técnicas de purificación de minicélulas convencionales. Un enfoque emplea células parentales que llevan una mutación *recA* cromosómica y tratamiento con dosis bajas de radiación ultravioleta (UV) (Sancar *et al.*, 1979). El razonamiento de este enfoque es que la radiación UV degradará preferentemente el ADN cromosómico debido a su tamaño de diana grande, a diferencia del ADN plasmídico más pequeño. Sin embargo, las minicélulas recombinantes usadas para terapia génica y aplicaciones de vacuna deben estar libres de cualquier mutación y los métodos de mutagénesis no específicos tales como la radiación UV no asegurarían que todos los ADN plasmídicos permanezcan no mutados.

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

Recientemente, se ha informado de un nuevo enfoque para purificar minicélulas que aborda los problemas mencionados anteriormente (documento WO 03033519). El nuevo método combina filtración de flujo transversal (el flujo de alimentación es paralelo a la superficie de la membrana; Forbes, 1987) y filtración cerrada (el flujo de alimentación es perpendicular a la superficie de la membrana) para obtener una pureza de minicélulas superior a 10^7 (es decir, menos de una célula parental por 10^7 minicélulas) e incluso 10^9 . Opcionalmente, la combinación de filtración puede estar precedida por una centrifugación diferencial, a baja fuerza centrífuga, para eliminar alguna parte de las células bacterianas y enriquecer de este modo el sobrenadante en minicélulas.

Aunque este procedimiento de filtración supera los inconvenientes asociados con las técnicas de purificación de minicélulas convencionales, también tiene limitaciones. En primer lugar, la filtración de flujo transversal produce una pérdida considerable de minicélulas, lo que añade costes al procedimiento de elaboración. Adicionalmente, las preparaciones de minicélulas obtenidas por el procedimiento de filtración contienen alguna endotoxina bacteriana, lo que provoca un choque suave cuando se administran *in vivo*. Finalmente, la pureza de las minicélulas varía de un lote a otro cuando se emplean métodos de filtración.

Por lo tanto, sigue existiendo una necesidad de métodos para purificar minicélulas bacterianas que maximicen el rendimiento y la pureza de las minicélulas, empleando a la vez medios biológicamente compatibles.

Sumario de la invención

Para abordar estas y otras necesidades, la presente invención proporciona una preparación de una composición purificada de minicélulas obtenida a partir bacterias que está esencialmente libre de endotoxinas libres, en el que las minicélulas se purifican por un método de purificación que comprende someter a las minicélulas a una condición que provoca que las células bacterianas parentales adopten una forma filamentosa y a continuación filtrar la muestra, y las endotoxinas libres se eliminan usando anticuerpos anti-lípido A.

La presente invención también se refiere a un método para purificar minicélulas bacterianas que combina centrifugación por gradiente de densidad en un medio biológicamente compatible con filtración.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método de purificación de minicélulas en el que una muestra que contiene minicélulas se somete a una condición que provoca que las células bacterianas parentales adopten una forma filamentosa, seguido por filtración de la muestra para separar las minicélulas de las células bacterianas parentales.

En todavía otro aspecto, la presente invención se refiere a un método de purificación de minicélulas que incluye (a) someter a una muestra que contiene minicélulas a centrifugación por gradiente de densidad en un medio biológicamente compatible, (b) someter la muestra a una condición que provoca que las células bacterianas parentales adopten una forma filamentosa y a continuación (c) filtrar la muestra para obtener una preparación de minicélulas purificadas.

Los métodos descritos incluyen opcionalmente una o más etapas para eliminar las endotoxinas de las preparaciones de minicélulas purificadas y/o tratamiento de las preparaciones de minicélulas purificadas con un antibiótico.

Finalmente, la presente invención describe preparaciones de minicélulas purificadas preparadas según los métodos anteriores. Preferiblemente, las preparaciones de minicélulas purificadas contienen menos de aproximadamente 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} o 10^{11} minicélulas. También preferentemente, las preparaciones de minicélulas purificadas están esencialmente libres de endotoxinas y residuos celulares (incluyendo bacterias parentales muertas, fragmentos de membrana, ácidos nucleicos y componentes intracelulares) que pudieran provocar una respuesta inflamatoria o un choque endotóxico en un huésped inmunizado.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra una vía en la que las técnicas de purificación de minicélulas de la presente invención pueden integrarse con otros procedimientos de purificación de minicélulas.

La Figura 2 muestra micrografías electrónicas de barrido de bacterias *S. typhimurium* de la cepa *minCDE* (intervalo diferentes de tamaños) y minicélulas derivadas de la cepa. (A) Muestra una bacteria parental de tamaño pequeño ($1,1 \mu\text{m}$ de largo) y una minicélula ($0,4 \mu\text{m}$ de diámetro), (B) muestra una bacteria parental mayor ($1,32 \mu\text{m}$ de largo), (C) muestra una bacteria parental aún mayor ($1,6 \mu\text{m}$ de largo) y (D) muestra una mezcla de bacterias parentales y minicélulas, en la que las primeras varían de $1 \mu\text{m}$ a $4 \mu\text{m}$ de longitud.

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

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

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

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

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

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

Descripción detallada de los modos de realización preferidos

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

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

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

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

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

En otro aspecto, la presente invención combina la centrifugación por gradiente de densidad en un medio biológicamente compatible con etapas de filtración. Por ejemplo, la centrifugación por gradiente de densidad puede incorporarse en un procedimiento de filtración en serie como se ejemplifica en la figura 1. Uno de dichos procedimientos de filtración en serie se describe en el documento PCT/IB02/04632. Brevemente, este proceso combina filtración de flujo transversal (el flujo de alimentación es paralelo a una superficie de membrana) y filtración cerrada (el flujo de alimentación es perpendicular a una superficie de membrana). Opcionalmente, esta combinación puede estar precedida de una centrifugación diferencial, a baja fuerza centrífuga, para eliminar alguna parte de las células bacterianas parentales y de este modo enriquecer en minicélulas el sobrenadante. También opcionalmente,

la combinación puede estar seguida por un tratamiento antibiótico para matar las células bacterianas parentales residuales.

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

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

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

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

En un modo de realización, un método de purificación de minicélulas combina centrifugación por gradiente de densidad a través de un medio biológicamente compatible con una etapa de filtración que emplea al menos un filtro con un tamaño de poro menor o igual a aproximadamente 0,2 μm .

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

Los inventores también han descubierto que inducir que las células bacterianas parentales adopten una forma filamentosa, antes de la filtración, mejora significativamente la purificación de las minicélulas. Como las minicélulas y las células bacterianas parentales tienen el mismo diámetro (media de 0,4 μm) algunas células bacterianas pueden penetrar a través de un poro de filtro que apenas aloja una minicélula (p. ej., poros de flujo transversal o de filtro cerrado de 0,45 μm), incluso aunque la longitud de las células bacterianas sea de al menos 1 μm . Esto sucede cuando una célula bacteriana oblonga se aloja perpendicularmente a un filtro. Sin embargo, los filamentos de células bacterianas, que consisten en células bacterianas unidas por los extremos no pueden penetrar en dichos filtros.

Por lo tanto, otro aspecto de la memoria descriptiva se refiere a la inducción de que las células bacterianas parentales contaminantes formen filamentos antes de la filtración. Esto se consigue sometiendo a una suspensión de minicélulas a condiciones medioambientales que inducen una respuesta de estrés en las células parentales. Dichas condiciones son bien conocidas por los expertos en la técnica e incluyen condiciones anaerobias, condiciones de limitación de nutrientes y condiciones osmóticas anómalas. Los medios hipertónicos son particularmente útiles para inducir la filamentación. En un ejemplo, una suspensión de minicélulas se puede complementar con caldo de tripticasa de soja (medio de crecimiento) que contiene cloruro sódico al 5% (inductor de estrés). En dichas condiciones inductoras de estrés, las células no se tabican completamente durante la división celular y forman filamentos bacterianos largos que consisten en células múltiples.

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

Los inventores han descubierto además que la eliminación de endotoxina mejora las preparaciones de minicélulas. En estudios *in vivo* en ratones, observaron un choque suave resultante del uso de preparaciones de minicélulas que contenían endotoxinas residuales. Por lo tanto, las preparaciones de minicélulas útiles preferentemente están

esencialmente libres de endotoxinas, lo que significa que contienen niveles clínicamente insignificantes de endotoxina o niveles que no inducirían una respuesta inflamatoria o choque endotóxico en un paciente.

Los métodos para eliminar endotoxinas son bien conocidos en la técnica. Un método ejemplo usa perlas magnéticas (por ejemplo, Dynabeads™; Dynal Biotech, Oslo, Noruega) revestidas con anticuerpos anti-lípido A. Las perlas magnéticas revestidas con anticuerpo se pueden mezclar con una suspensión de minicélulas en un tubo e incubar para permitir que el anticuerpo se una a lipopolisacárido libre (LPS) mediante su parte de lípido A. El tubo que lleva la suspensión se coloca a continuación en un soporte magnético para inmovilizar las perlas magnéticas en complejo con el LPS-anti-lípido A y se recogen las minicélulas. Pueden realizarse múltiples ciclos de incubación con perlas nuevas para obtener el nivel deseado de pureza.

Los anticuerpos monoclonales que se unen a epítomos hallados en la parte de polisacárido del núcleo profundo del LPS también son útiles para eliminar la endotoxina libre. No se cree que la parte de polisacárido de núcleo profundo del LPS esté expuesta en las superficies de membranas bacterianas. Por lo tanto, los anticuerpos dirigidos contra esta parte del LPS no deberían unirse al LPS unido a células bacterianas. Antes de su uso, dichos anticuerpos deberían ensayarse para asegurar que no reaccionen de forma cruzada con componentes expuestos en la superficie celular del LPS.

Debido al potencial de las endotoxinas bacterianas para producir efectos secundarios adversos, los métodos de purificación de minicélulas preferidos incluyen una o más etapas para eliminarlas. Por lo tanto, en un aspecto, la invención proporciona un método de purificación de minicélulas que emplea una etapa de centrifugación por gradiente de densidad en un medio biológicamente compatible, seguido de una o más etapas para eliminar la endotoxina de la preparación de minicélulas enriquecida resultante. Más preferentemente, el procedimiento incluye además una o más etapas de filtración, como se ha descrito anteriormente.

Las técnicas de purificación de minicélulas descritas en la presente memoria pueden ser empleadas en varias combinaciones para obtener una preparación de una pureza deseada. Los métodos preferidos incluyen una combinación de centrifugación por gradiente de densidad y filtración. Los métodos preferidos también incluyen filamentación inducida por estrés de las células bacterianas parentales seguida por filtración y eliminación de la endotoxina de las preparaciones de minicélulas. Un ejemplo de un método (representado de forma esquemática en la figura 1) que emplea todas estas técnicas es el siguiente:

Etapas A: Centrifugación diferencial de un cultivo de células bacterianas que produce minicélulas. Esta etapa, que puede realizarse a 2.000g durante aproximadamente 20 minutos, elimina la mayoría de las células bacterianas parentales, mientras que deja las minicélulas en el sobrenadante.

Etapas B: Centrifugación por gradiente de densidad usando un medio de gradiente de densidad isotónico y no tóxico. Esta etapa separa las minicélulas de muchos contaminantes, incluyendo las células bacterianas parentales, con mínima pérdida de minicélulas. Preferiblemente, esta etapa se repite en un método de purificación.

Etapas C: Filtración de flujo transversal a través de un filtro de 0,45 µm para reducir adicionalmente la contaminación de células bacterianas parentales.

Etapas D: Filamentación inducida por estrés de las células bacterianas parentales residuales. Esto puede conseguirse sometiendo a la suspensión de minicélulas a cualquiera de varias condiciones ambientales inductoras de estrés.

Etapas E: Tratamiento con antibióticos para matar las células bacterianas parentales.

Etapas F: Filtración de flujo transversal para eliminar los contaminantes pequeños, tales como ampollas de membrana, fragmentos de membrana, residuos bacterianos, ácidos nucleicos, componentes del medio y demás, y para concentrar las minicélulas. Puede emplearse un filtro de 0,2 µm para separar las minicélulas de los contaminantes pequeños y puede emplearse un filtro de 0,1 µm para concentrar las minicélulas.

Etapas G: Filtración cerrada para eliminar las células bacterianas filamentosas muertas. Puede emplearse un filtro de 0,45 µm para esta etapa.

Etapas H: Eliminación de endotoxina de la preparación de minicélulas. Pueden emplearse perlas magnéticas revestidas con anti-lípido A para esta etapa.

Los expertos en la técnica pueden implementar variaciones de estas etapas e incorporar etapas adicionales de purificación, consistentes con los principios descritos en la presente memoria.

Los métodos anteriores para purificar minicélulas bacterianas proporcionan preparaciones de minicélulas purificadas útiles para aplicaciones *in vivo* tales como las descritas en el documento WO 03033519. Estas preparaciones contienen menos de aproximadamente 1 célula bacteriana parental contaminante por 10⁷ minicélulas,

preferiblemente menos de aproximadamente 1 célula bacteriana parental contaminante por 10^8 minicélulas, más preferiblemente menos de aproximadamente 1 célula bacteriana parental contaminante por 10^9 minicélulas, incluso más preferiblemente menos de aproximadamente 1 célula bacteriana parental contaminante por 10^{10} minicélulas y aún más preferiblemente menos de aproximadamente 1 célula bacteriana parental contaminante por 10^{11} minicélulas. Preferiblemente, cualquier célula bacteriana parental contaminante está muerta y estas preparaciones no contienen ninguna célula bacteriana parental viva. También preferiblemente, las preparaciones de minicélulas purificadas están esencialmente libres de endotoxinas y residuos celulares (incluyendo bacterias parentales muertas, fragmentos de membrana, ácidos nucleicos y componentes intracelulares). Como se ha explicado previamente, una preparación de minicélulas está esencialmente libre de endotoxinas si la preparación contiene niveles clínicamente insignificantes de endotoxina o niveles que no inducirían una respuesta inflamatoria o choque endotóxico en un paciente. De forma similar, una preparación de minicélulas está esencialmente libre de residuos celulares si contiene niveles clínicamente insignificantes de residuos celulares o niveles que no inducirían una respuesta inflamatoria en un paciente.

Con referencia a lo siguiente, los ejemplos ilustrativos ayudarán a proporcionar un entendimiento más completo de la invención.

Ejemplo 1- Incoherencia de la filtración sin las técnicas de la invención

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

Se analizan por microscopía electrónica de barrido (SEM) cepas bacterianas mutantes productoras de minicélulas de *S. typhimurium*, *E. coli* y *Shigella flexneri* para determinar el tamaño de las células bacterianas y las minicélulas. Para la microscopía electrónica de barrido de alta resolución se sigue el método siguiente. Los cultivos bacterianos se hacen crecer en caldo de tripticasa de soja (TSB) (marca BBL obtenida de Bacto Labs, Liverpool, NSW, Australia). El caldo de cultivo se prepara según las instrucciones del fabricante a 30 gm/L y se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 minutos. El cultivo líquido se deja crecer durante una noche en un incubador con agitación a 37°C. Para cambiar las disoluciones, las células se centrifugan a 13.000 rpm durante 20 minutos, se desecha el sobrenadante y las células se vuelven a poner en suspensión en el nuevo reactivo (descrito a continuación) usando un mezclador de vórtex. Esto lava los iones y biomateriales de las células y las deja en suspensión en un volumen pequeño de agua destilada. La secuencia de reactivos es (a) 1 mL de agua destilada - resedimentar, (b) 1 mL de agua destilada – volver a poner en suspensión, (c) depositar 250 µL en una placa de muestras de latón limpia, (d) secar durante la noche a 30°C, (e) revestir justo antes de la microscopía con 2 nm de metal cromo depositado en un dispositivo de revestimiento por pulverización a vacío limpio Xenosput. Las muestras de ensayo revestidas se examinan usando un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo Hitachi S-900 usando una energía de haz de 3 kilovoltios (Universidad de Nueva Gales de Sur, NSW, Australia). Las imágenes digitales a diferentes aumentos se registran usando un digitalizador ImageSlave.

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

Ejemplo 2 – Eliminación de las bacterias pequeñas: conversión en filamentos bacterianos

Este ejemplo demuestra que inducir que las bacterias forman filamentos antes de la filtración mejora los procedimientos de purificación de las minicélulas.

Se ha diseñado un estudio para abordar el problema descrito en el ejemplo 1, haciendo las bacterias parentales residuales de pequeño tamaño esencialmente mayores que el tamaño de poro de 0,45 µm de un filtro cerrado. Las condiciones inductoras de estrés en un entorno de crecimiento bacteriano pueden evitar la formación del septo completa durante la división celular bacteriana, dando como resultado filamentos bacterianos.

El estudio demuestra que los medios de crecimiento bacteriano hipertónicos (inductores de estrés) inducen de forma fiable la filamentación de las cepas bacterianas productoras de minicélulas de *S. typhimurium* y *E. coli*. Todas las bacterias se cultivan a partir de reservas de glicerol mantenidas a -80°C. Las cepas de *S. typhimurium* y *E. coli* se cultivan en caldo de tripticasa de soja (TSB) (marca BBL obtenida de Bacto Labs, Liverpool, NSW, Australia). Se prepara según las instrucciones del fabricante a 30 gm/L y se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 minutos. El cultivo líquido se hace crecer en un incubador con agitación a 37°C. El cultivo bacteriano de una noche se diluye 1:5000 en TSB preparado recientemente y se hace crecer hasta que la $DO_{600\text{ nm}}$ alcance 0,2. El cultivo se divide en diez alícuotas de 5 mL en frascos estériles y se añade NaCl estéril previamente esterilizado en autoclave a cada frasco para producir concentraciones finales de NaCl (p/v) de 0% (control), 2%, 3%, 4,5%, 5%, 5,5%, 6%, 7% y 8%. Los cultivos se incuban estáticamente a 37°C y se obtienen muestras a las 2 horas, 4 horas, 8 horas y 24 horas.

También se obtiene una muestra de control de tiempo cero para microscopía. Las muestras se centrifugan a 13.200 rpm y los sedimentos de bacterias/minicélulas se vuelven a poner en suspensión en agua destilada. Se coloca una gota de cada muestra en un portaobjetos de vidrio, se seca al aire y se fija por calor. Cada muestra se tiñe con Gram usando un lavado con alcohol al 95% seguido de flujo de safranina de Gram durante 1 minuto y un lavado con agua.

5 Los portaobjetos se visualizan usando el microscopio óptico Leica modelo DMLB con análisis de imagen por medio de una cámara Leica DC y un programa de tratamiento de imágenes Leica IM. Las muestras se observan a 40X o inmersión en aceite con un aumento de 100X.

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

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

Se realiza un estudio definitivo del efecto de varias concentraciones de NaCl sobre la viabilidad de las células bacterianas usando el kit de viabilidad bacteriana LIVE/DEAD BacLight (Molecular Probes, Eugene, OR, Estados Unidos). El kit emplea dos tinciones de ácido nucleico, la tinción verde fluorescente SYTO[®] 9 y la tinción de yoduro de propidio rojo fluorescente. Estas tinciones difieren en su capacidad para penetrar las células bacterianas sanas. La tinción SYTO 9 marca tanto bacterias vivas como muertas. Por el contrario, el yoduro de propidio (PI) solo penetra bacterias con membranas dañadas, reduciendo la fluorescencia del SYTO 9 cuando ambos colorantes están presentes. Por lo tanto, las bacterias vivas con membranas intactas fluorescen en verde, mientras que las bacterias muertas con membranas dañadas fluorescen en rojo. Se repite el experimento descrito anteriormente sobre filamentación inducida por sal y se obtienen muestras a 0 horas, 2 horas, 4 horas, 8 horas y 24 horas para las distintas concentraciones de NaCl. Las muestras se centrifugan a 13.200 rpm, se elimina el sobrenadante y se vuelve a poner en suspensión el sedimento de bacterias/minicélulas en 100 µL de BSG. Se añaden 0,5 µL de una mezcla 50/50 de SYTO 9/PI a cada muestra y se incuba durante 15 minutos. Las muestras se centrifugan a 13.200 rpm, se elimina el sobrenadante y se vuelven a poner en suspensión los sedimentos en 100 µL de agua destilada. Se coloca una gota de cada muestra en un portaobjetos de vidrio, se seca al aire y se cubre con una gota de aceite de montaje BacLight. Cada muestra se visualiza usando un microscopio óptico Leica modelo DMLB con análisis de imagen por medio de una cámara Leica DC y un programa de adquisición de imágenes digitales Leica. Las muestras se observan a 40X o en inmersión de aceite con un aumento de 100X.

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

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

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

células bacterianas pero parecían aproximadamente de 2 a 3 veces más largas que una minicélula. El sedimento llevaba principalmente células bacterianas.

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

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

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

La endotoxina libre residual se eliminó de las preparaciones de minicélulas purificadas como sigue. Se conjugaron perlas magnéticas revestidas con proteína G (Dynal Biotech, Oslo, Noruega) con anticuerpo policlonal anti-lípido A de cabra (Bioscience Resource Project, Saco, Maine, Estados Unidos). Este anticuerpo reacciona de forma cruzada con una serie de diferentes especies de LPS bacterianos Gram negativos incluyendo LPS de *S. typhimurium*. La reacción de conjugación se llevó a cabo incubando (O/N con mezcla suave a 4°C) Dynabeads-proteína G que se lavaron 3 veces en 0,5 mL de disolución tampón de Na-fosfato 0,1M (pH 5,0) con el anticuerpo anti-lípido A. El exceso de anticuerpo se eliminó lavando el conjugado de Dynabeads-proteína G/anti-lípido A tres veces con 0,5 mL de disolución tampón de Na-fosfato 0,1M (pH 5,0). El conjugado se volvió a poner en suspensión en 300 µL de la misma disolución tampón y se usaron 50 µL para tratar 500 µL de la suspensión de minicélulas purificadas para eliminar la endotoxina libre. La incubación conjunta se llevó a cabo durante 1 hora a 4°C y después se colocó el tubo en un imán (Dynal) y se recogió el sobrenadante de minicélulas. El tratamiento se realizó 3 veces con conjugado de Dynabeads-proteína G/anti-lípido A reciente para asegurar la máxima eliminación de la endotoxina libre residual.

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

Este experimento se diseñó para determinar la cinética del procedimiento de purificación de minicélulas con respecto al rendimiento de minicélulas, reducción de los recuentos de bacterias parentales y reducción de endotoxina libre. El procedimiento de purificación completo se realizó tres veces y se recogieron muestras en cada una de las 12 etapas descritas a continuación. Se analizaron en cada muestra los recuentos de minicélulas y de células bacterianas por citometría de flujo y recuento de viabilidad en placas de agar. También se determinaron las unidades de endotoxina (UE) para cada muestra mediante el ensayo de LAL (Charles River Laboratories, Inc. Wilmington, MA, Estados Unidos), realizado por Australian Microbiology Services Pty Ltd (Sydney, Australia). El procedimiento de purificación completo se describe brevemente a continuación.

Se cultivó durante la noche (O/N) la cepa recombinante *minCDE* de *S. typhimurium* que llevaba un número elevado de copias de plásmidos (marcador de ácido nucleico) a 37°C, agitando en 25 mL de caldo de tripticasa de soja (TSB). A continuación se inocularon seis matraces que contenían cada uno 1 L de TSB con 2 mL del cultivo O/N y se incubaron adicionalmente a 37°C con agitación (muestra 1). El cultivo se centrifugó diferencialmente a 2.000g/20 minutos en una centrífuga de sobremesa para sedimentar un número significativo de células bacterianas. El sobrenadante (muestra 2) se recogió y se concentró pasándolo a través de un filtro de flujo transversal de 0,1 µm. La suspensión se concentró adicionalmente por centrifugación a 13.200 rpm/60 minutos en una centrífuga Eppendorf y el sedimento con las células bacterianas/minicélulas se volvió a poner en suspensión en 16 mL de BSG estéril (muestra 3). Se prepararon dieciséis gradientes de densidad (6% a 12%) en tubos de centrífuga transparentes de polipropileno de 25 mL (Livingstone International Pty Ltd, Sydney, Australia) usando un medio biológicamente compatible OptiPrep™ (Axis-Shield PLC, Dundee, Escocia) y se superpuso 1 mL de suspensión de minicélulas/células bacterianas sobre cada gradiente. Los tubos se centrifugaron a 2.000g/20 minutos y la banda de minicélulas (figura 5A) se recogió de la parte superior de cada tubo con una jeringa. Se recogieron aproximadamente 24 mL de la suspensión de minicélulas en bruto (muestra 4) y se centrifugaron a 13.200 rpm/30 minutos en tubos Eppendorf. El sedimento se volvió a poner en suspensión en 12 mL de BSG estéril y se volvió a procesar en 12 gradientes de OptiPrep™ como anteriormente. Las bandas de minicélulas (figura 5B) se recogieron como anteriormente (muestra 5) y se volvieron a procesar a través de 4 gradientes de OptiPrep™ como anteriormente. Esto dio como resultado una banda de minicélulas difusa clara (figura 5C) en cada tubo y se recogió (muestra 6). La suspensión de minicélulas se añadió a 1 L de TSB y se incubó durante 2 horas/37°C/en reposo para reactivar las células bacterianas contaminantes (muestra 7). Se añadió NaCl (concentración final de 5% p/v) a la suspensión para

estresar a las células bacterianas vivas e inhibir el proceso de formación del septo durante la división celular. La suspensión se incubó durante 2 horas a 37°C/en reposo para asegurar que la mayoría de las células bacterianas contaminantes se convirtieran en filamentos bacterianos (muestra 8). Se añadieron antibióticos de amplio espectro, gentamicina (200 µg/mL) y kanamicina (200 µg/mL) a la suspensión y se incubaron O/N a 37°C para matar todas las células bacterianas vivas (muestra 9). La suspensión se pasó a través de un filtro de flujo transversal de 0,2 µm para intercambio de la disolución tampón y la suspensión se reconstituyó en BSG estéril (muestra 10). Este procedimiento eliminó todos los contaminantes menores de 0,2 µm por ejemplo endotoxina libre, fragmentos de minicélulas y bacterianos lisados, ácidos nucleicos y nutrientes de TSB. A continuación se eliminaron los filamentos bacterianos de la suspensión de minicélulas pasando la disolución a través de un filtro cerrado de 0,45 µm. La suspensión se concentró hasta un volumen de 50 mL pasándola a través de un filtro de flujo transversal de 100 kDa y a continuación se centrifugó a 13.200 rpm/20 minutos para sedimentar las minicélulas. Se desechó el sobrenadante y el sedimento se volvió a poner en suspensión en 1 mL de BSG estéril (muestra 11). La endotoxina libre residual se eliminó usando Dynabeads-proteína G conjugadas con un anticuerpo anti-lípido A como se ha descrito en el ejemplo 4. Esto dio como resultado la muestra 12.

El recuento de minicélulas y células bacterianas se llevó a cabo por citometría de flujo como sigue. Cada muestra del procedimiento de purificación de minicélulas se diluyó de forma apropiada para llevar aproximadamente 10^8 a 10^{10} minicélulas y se incubaron 250 µL de la muestra con colorante verde fluorescente Syto9 3,3µM (Molecular Probes, Eugene, OR, Estados Unidos). Este colorante penetra intacto y daña las membranas de las células bacterianas y se une a los ácidos nucleicos endógenos dando como resultado células bacterianas fluorescentes en verde. En los estudios preliminares de los inventores se ha mostrado que también penetra en la membrana de las minicélulas y da como resultado minicélulas recombinantes fluorescentes en verde. Todas las muestras se contaron en un citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA, Estados Unidos) usando el programa de adquisición y análisis Cellquest (Becton Dickinson). Los recuentos se realizaron durante 30 segundos en caudal medio con un umbral de 37 V en un activador de fluorescencia verde "FL1" que detecta entre 515-545 nm. La tensión de FL1 PMT se ajustó a 550 V. La tensión de "SSC" PMT de dispersión lateral se ajustó a 524 V. La dilución de muestra apropiada produjo entre 5.000-50.000 partículas cada 30 segundos y el recuento de partículas final fue una media de 5 repeticiones. Las minicélulas y las bacterias se distinguieron basándose en sus diferencias en SSC y fluorescencia verde.

Los resultados mostraron (figuras 6A-C) que al inicio del procedimiento de purificación, el cultivo de bacterias/minicélulas de 6 L llevaba aproximadamente 5×10^{12} minicélulas (figura 6A) y se produjeron pérdidas graduales a lo largo del procedimiento de purificación hasta producir un rendimiento de aproximadamente 5×10^{10} minicélulas al final.

El recuento de las células bacterianas parentales (figura 6B) al comienzo del procedimiento fue similar a los números de minicélulas, es decir, aproximadamente 5×10^{12} bacterias. El procedimiento de purificación dio como resultado la eliminación de más de 1.000 veces las células bacterianas en el punto de tratamiento con antibiótico. En este punto la relación de minicélulas:células bacterianas fue de más de 100:1 y por lo tanto las medidas de citometría de flujo no podían detectar células bacterianas en las muestras analizadas. Después del tratamiento con antibiótico, todas las muestras analizadas por ensayo de recuento de placa viable revelaron la ausencia de células bacterianas vivas. El análisis por PCR cuantitativa para la presencia de ADN genómico en la muestra purificada final reveló la presencia de menos de 1 célula bacteriana parental (célula muerta) en 10^{11} minicélulas purificadas.

El recuento de endotoxina libre en cada muestra (figura 6C) mostró que al inicio del procedimiento de purificación la muestra llevaba aproximadamente 10^9 unidades de endotoxina (UE). Las UE disminuyeron a aproximadamente 10^6 después de la tercera etapa de purificación por gradiente (figura 6C; muestra 6). Las UE aumentaron de nuevo una vez que se incubó la suspensión de minicélulas/células bacterianas residuales en TSB para la filamentación inducida por sal (figura 6C; muestras 7-9) pero disminuyó a 10^4 a 10^5 UE en las etapas de purificación subsiguientes.

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

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

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

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

Los resultados mostraron (tabla 1 siguiente) que, como se esperaba, la mayoría de las UE que se midieron mediante el ensayo de LAL estaban asociados con el LPS unido a la membrana de superficie de las minicélulas (columna D) que no es una endotoxina como se ha visto en los estudios *in vivo* en el ejemplo 7. Este resultado es similar al observado en la figura 6C (muestra 12). El sobrenadante (columna C) también llevaba una cantidad significativa de UE y presumiblemente está es la forma micelar del LPS ya que cada muestra se había procesado previamente con el conjugado de Dynabeads-proteína G/anti-lípido A. El interesante resultado se observó en la columna B que mostró que cada vez que se realiza el tratamiento con anti-lípido A, las únicas cantidades de forma libre del LPS que se podían encontrar en la preparación de minicélulas purificadas estaban entre 20 UE y 45 UE. Este valor es mucho menor que los estándares de endotoxina actuales para liberación en lote de agentes farmacéuticos parentales que es de 350 UE/dosis (Grandics, 2000).

Tabla 1

	A	B	C	D
	Suspensión de minicélulas	Dynabeads-proteína G/anti-lípido A recuperado	Sobrenadante después de que las minicélulas se sedimenten por centrifugación	Sedimento con las minicélulas vuelto a poner en suspensión
UE/mL de disolución original				
Después del 1 ^{er} procedimiento de eliminación de la endotoxina libre	15.560	43,8	3.490	9.910
Después del 2 ^o procedimiento de eliminación de la endotoxina libre	18.910	35,1	2.250	16.940
Después del 3 ^{er} procedimiento de eliminación de la endotoxina libre	26.920	19,0	2.143	10.090
Después del 4 ^o procedimiento de eliminación de la endotoxina libre	20.230	25,2	1.870	11.620
Después del 5 ^o procedimiento de eliminación de la endotoxina libre	15.400	27,8	1.361	15.080

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

Las preparaciones de minicélulas purificadas se trataron secuencialmente (3 veces) para eliminar las endotoxinas usando el procedimiento de conjugado de Dynabeads-proteína G/anti-lípido A descrito anteriormente. Cada una de las preparaciones que llevaban 10⁹ minicélulas purificadas, es decir, previamente a la eliminación de la endotoxina, y después de la primera, segunda y tercera etapas de eliminación de la endotoxina, se inyectó en la vena de la cola de ratones desnudos atímicos hembra de 6 semanas de edad (5 ratones por grupo). Los ratones usados en este ejemplo se obtuvieron de Animal Resources Centre, Perth, WA, Australia, y todos los experimentos con animales se realizaron en conformidad con la guía de cuidado y uso de animales de laboratorio y con la aprobación del Comité

de Ética Animal. Los experimentos se realizaron en la instalación de animales pequeños acreditada por NSW Agriculture en EnGeneIC Pty Ltd (Sydney, NSW, Australia). Los ratones se observaron cuidadosamente durante un periodo de 4 semanas para registrar cualquier señal de choque endotóxico, p. ej., fiebre, letargo, pérdida de apetito y peso y muerte posterior. Los resultados mostraron que sin el procedimiento de eliminación de la endotoxina la mayoría de los ratones desarrollaron rápidamente fiebre y permanecieron aletargados dentro de las primeras 12 horas. La mayoría de los animales murieron en dos semanas. Los ratones que recibieron las minicélulas después del primer procedimiento de eliminación de la endotoxina fueron más estables y mostraron una fiebre suave durante las primeras 24 horas. Sin embargo, los ratones se recuperaron después de 3 días. Los ratones que recibieron las minicélulas purificadas que se habían sometido a dos y tres ciclos de eliminación de la endotoxina no mostraron efectos secundarios adversos y permanecieron saludables. Esto sugirió que la nueva etapa de eliminación de la endotoxina libre era esencial si las minicélulas van a usarse para fines farmacéuticos en un huésped mamífero.

Publicaciones citadas

Brahmbhatt, "Cloning and molecular characterization of the *rfb* gene cluster of *Salmonella typhimurium*". Tesis doctoral, Universidad de Adelaide, Australia (1987).

Britton *et al.*, "Characterization of a prokaryotic SMC protein involved in chromosome partitioning". *Genes Dev.* 12: 1254 (1998).

Clark-Curtiss y Curtiss, "Analysis of recombinant DNA using *Escherichia coli* minicells". *Methods Enzymol.* 101: 347 (1983).

de Boer *et al.*, "Roles of MinC and MinD in the site-specific septation block mediated by the MinCDE system of *Escherichia coli*". *J. Bacteriol.* 174: 63 (1992).

Dorward *et al.*, "Export and intercellular transfer of DNA via membrane blebs of *Neisseria gonorrhoeae*". *J. Bacteriol.* 171: 2499 (1989).

Forbes, "Crossflow microfiltration". *Australian J. Biotechnology* 1: 30 (1987).

Grandics, P. *Pyrogens in parental pharmaceuticals. Pharmaceutical Technology.* (2000).

Frazer y Curtiss, "Production, properties and utility of bacterial minicells". *Curr. Top Microbiol. Immunol.* 69: 1 (1975).

Harlow *et al.*, "Cloning and characterization of the *gsk* gene encoding guanosine kinase of *Escherichia coli*". *J. Bacteriol.* 177: 2236 (1995).

Harry, "Bacterial cell division: Regulating Z-ring formation". *Mol. Microbiol.* 40: 795 (2001).

Hiraga *et al.*, "Chromosome partitioning in *Escherichia coli*: novel mutants producing anucleate cells". *J. Bacteriol.* 171: 1496 (1989).

Hu y Lutkenhaus, "Topological regulation of cell division in *Escherichia coli* involves rapid pole to pole oscillation of the division inhibitor MinC under the control of MinD and MinE". *Mol. Microbiol.* 34: 82 (1999).

Ireton *et al.*, "*spo0J* is required for normal chromosome segregation as well as the initiation of sporulation in *Bacillus subtilis*". *J. Bacteriol.* 176: 5320 (1994).

Katsui *et al.*, "Heat-induced blebbing and vesiculation of the outer membrane of *Escherichia coli*". *J. Bacteriol.* 151: 1523 (1982).

Kihara *et al.*, "Analysis of a *FliM-FliN* flagellar switch fusion mutant of *Salmonella typhimurium*". *J. Bacteriol.* 178: 4582 (1996).

Levin *et al.*, "Identification of *Bacillus subtilis* genes for septum placement and shape determination". *J. Bacteriol.* 174: 6717 (1992).

Matsuzaki *et al.*, "Interactions of an antimicrobial peptide, magainin 2, with outer and inner membranes of Gram-negative bacteria". *Biochim Biophys. Acta.* 1327: 119 (1997).

Okada *et al.*, "Possible function of the cytoplasmic axial filaments in chromosomal segregation and cellular division of *Escherichia coli*". *Sci. Prog.* 77: 253 (1993-94).

Okada *et al.*, "Cytoplasmic axial filaments in *Escherichia coli* cells: possible function in the mechanism of chromosome segregation and cell division". *J. Bacteriol.* 176: 917 (1994).

PCT/IB02/04632. *Intact minicells as vectors for DNA transfer and gene therapy in vitro and in vivo.*

Raskin y de Boer, "*MinDE-dependent pole-to-pole oscillation of division inhibitor MinC in Escherichia coli*". *J. Bacteriol.* 181: 6419 (1999).

Reitschel ET, Seydel U, Zähringer FU et al., "*Bacterial endotoxin: molecular relationships between structure and activity*". *Infect Dis Clin N Am.* 5: 753 (1991).

- 5 Reeve, "*Use of minicells for bacteriophage-directed polypeptide synthesis*". *Methods Enzymol.* 68: 493 (1979).

Reeve y Cornett, "*Bacteriophage SPO1-induced macromolecular synthesis in minicells of Bacillus subtilis*". *J. Virol.* 15: 1308 (1975).

Sancar et al., "*Simple method for identification of plasmid-coded proteins*". *J. Bacteriol.* 137: 692 (1979).

- 10 Stewart y D'Ari, "*Genetic and morphological characterization of an Escherichia coli chromosome segregation mutant*". *J. Bacteriol.* 174: 4513 (1992).

Wachi et al., "*New mre genes mreC and mreD, responsible for formation of the rod shape of Escherichia coli cells*". *J. Bacteriol.* 171: 6511 (1989).

REIVINDICACIONES

- 1.- Una preparación de una composición purificada de minicélulas obtenidas a partir de bacterias que está esencialmente libre de endotoxinas, en la que las minicélulas están purificadas por un método de purificación que comprende someter a las minicélulas a una condición que induce que las células bacterianas parentales adopten una forma filamentosa y a continuación filtrar la muestra, y las endotoxinas libres se eliminan usando anticuerpos anti-lípido A.
- 2.- La preparación de minicélulas obtenidas a partir de bacterias según la reivindicación 1, que contiene menos de aproximadamente 1 célula bacteriana parental contaminante por 10^{10} minicélulas.
- 3.- La preparación de minicélulas obtenidas a partir de bacterias según la reivindicación 2, que contiene menos de aproximadamente 1 célula bacteriana parental contaminante por 10^{11} minicélulas.

FIGURA 1

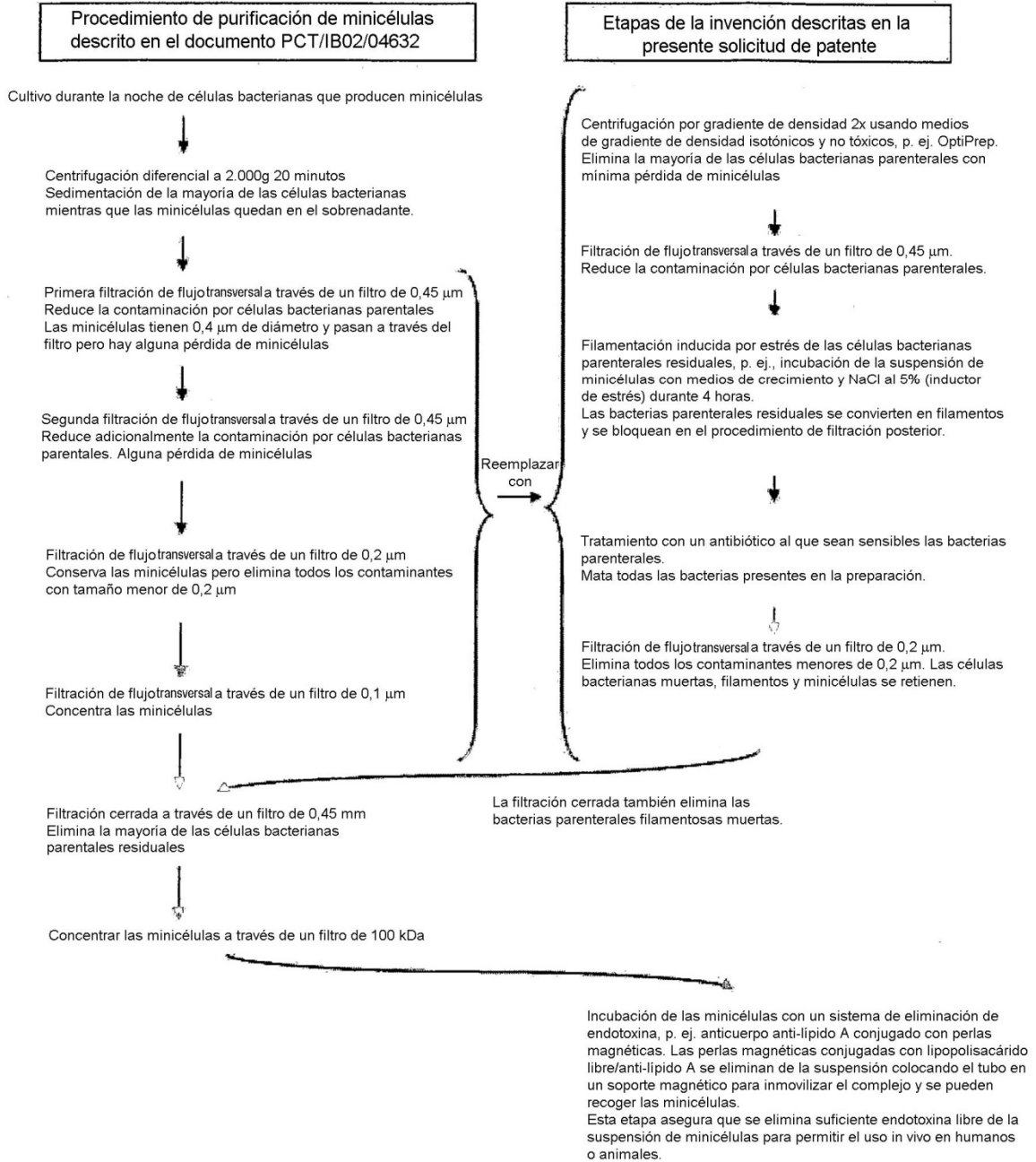


Figura 2

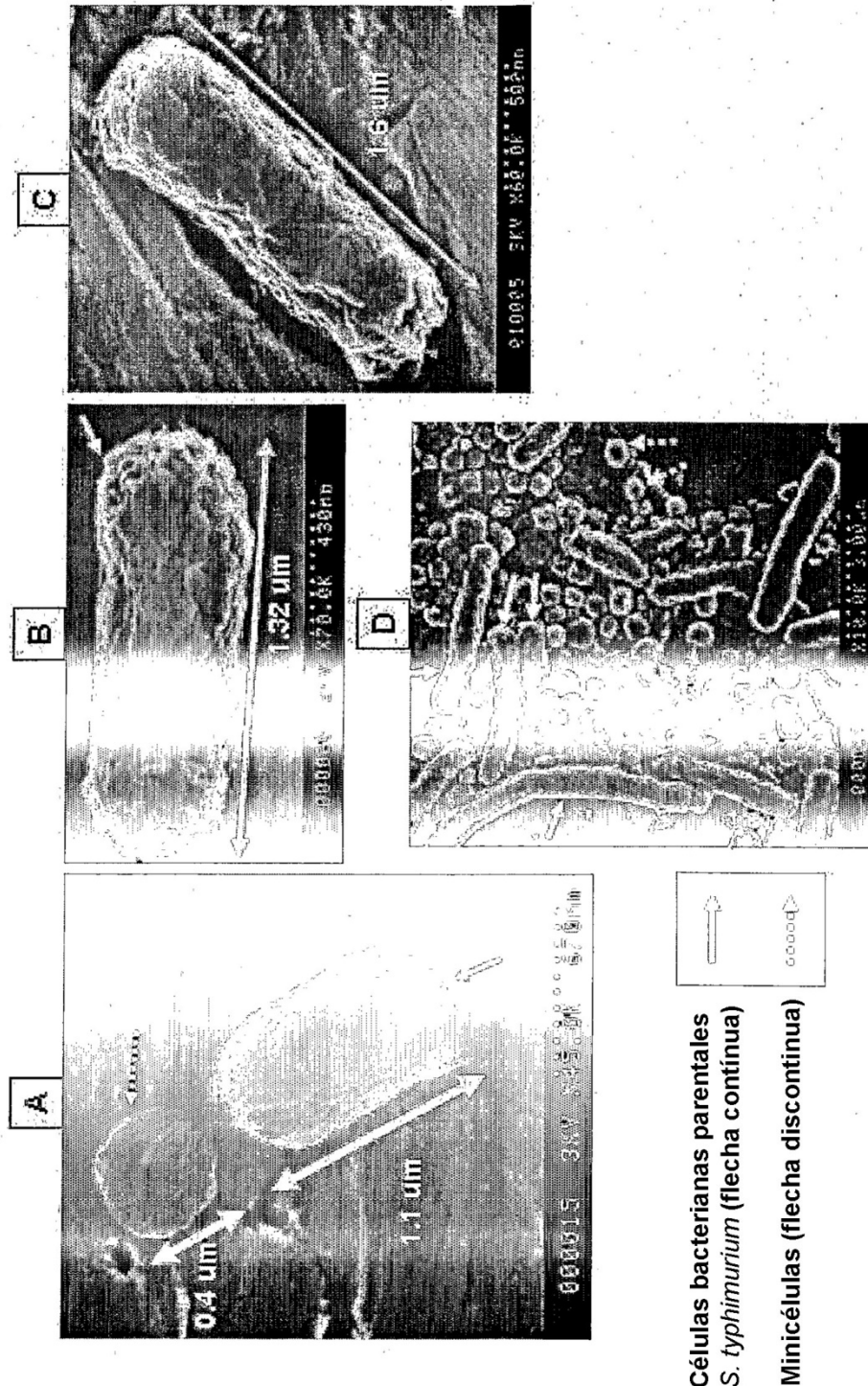


Figura 3A

Filamentación de *S. typhimurium* (ENSsm001) después de la adición de NaCl (aumento de 1.250x)
Concentración de NaCl (p/V)

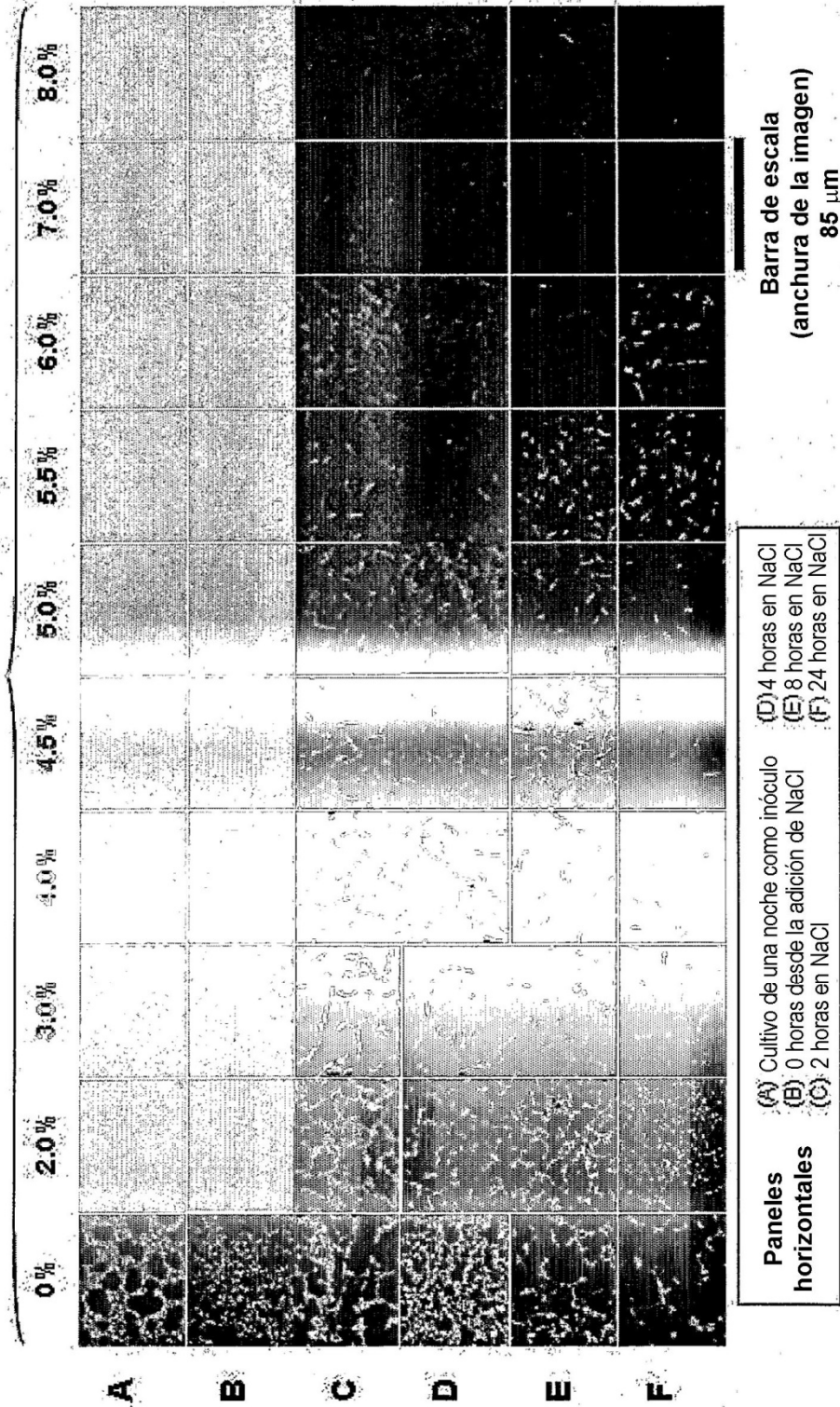
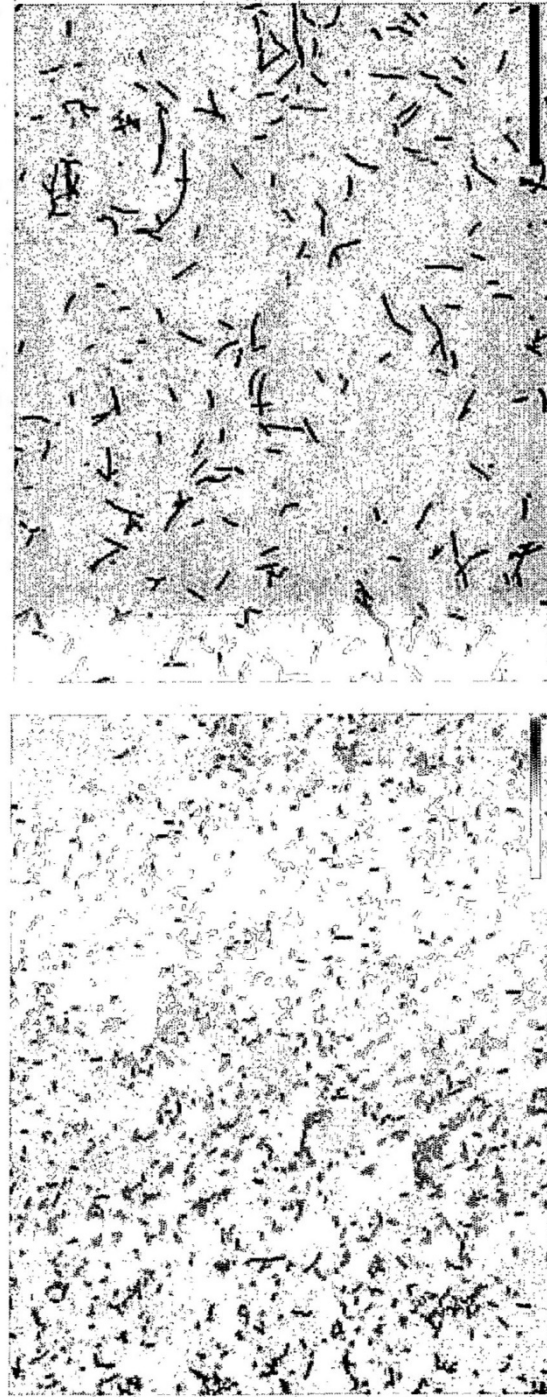


Figura 3B
Filamentación inducida por sal en *Salmonella typhimurium* ENSm026



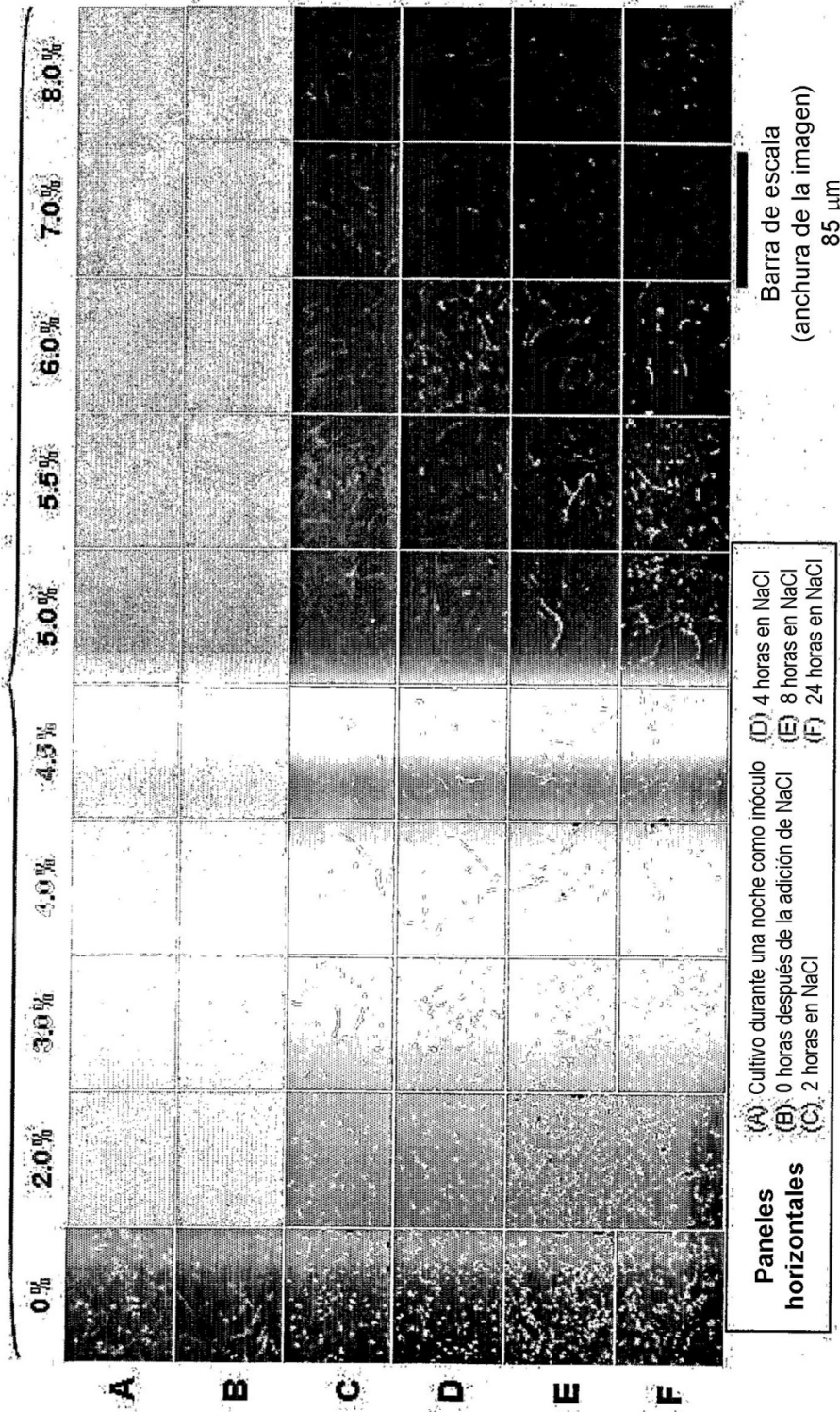
4 horas después de inóculo de cultivo Log (NaCl 5,0%)

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

Barra de escala
50 µm

Figura 4A

Filamentación de *E. Coli* después de adición de NaCl (aumento de 1.250x)
Concentración de NaCl (p/V)



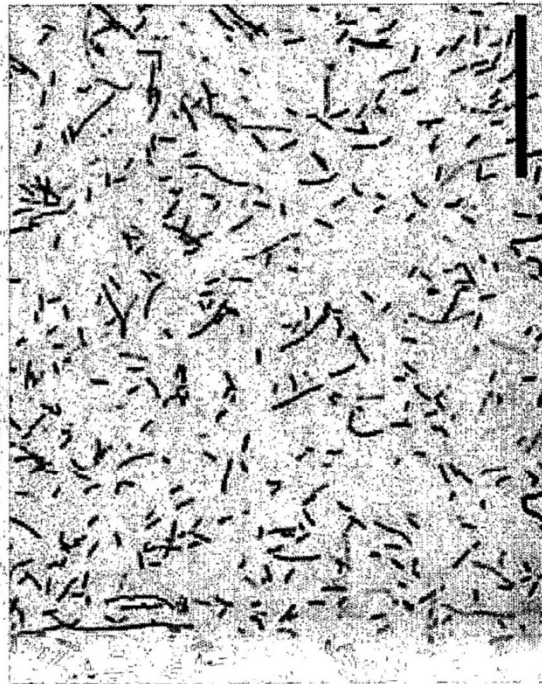
Paneles horizontales
(A) Cultivo durante una noche como inóculo
(B) 0 horas después de la adición de NaCl
(C) 2 horas en NaCl
(D) 4 horas en NaCl
(E) 8 horas en NaCl
(F) 24 horas en NaCl

Figura 4B

Filamentación inducida por sal en *E. Coli*



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



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

Barra de escala
50 μ m

Figura 5

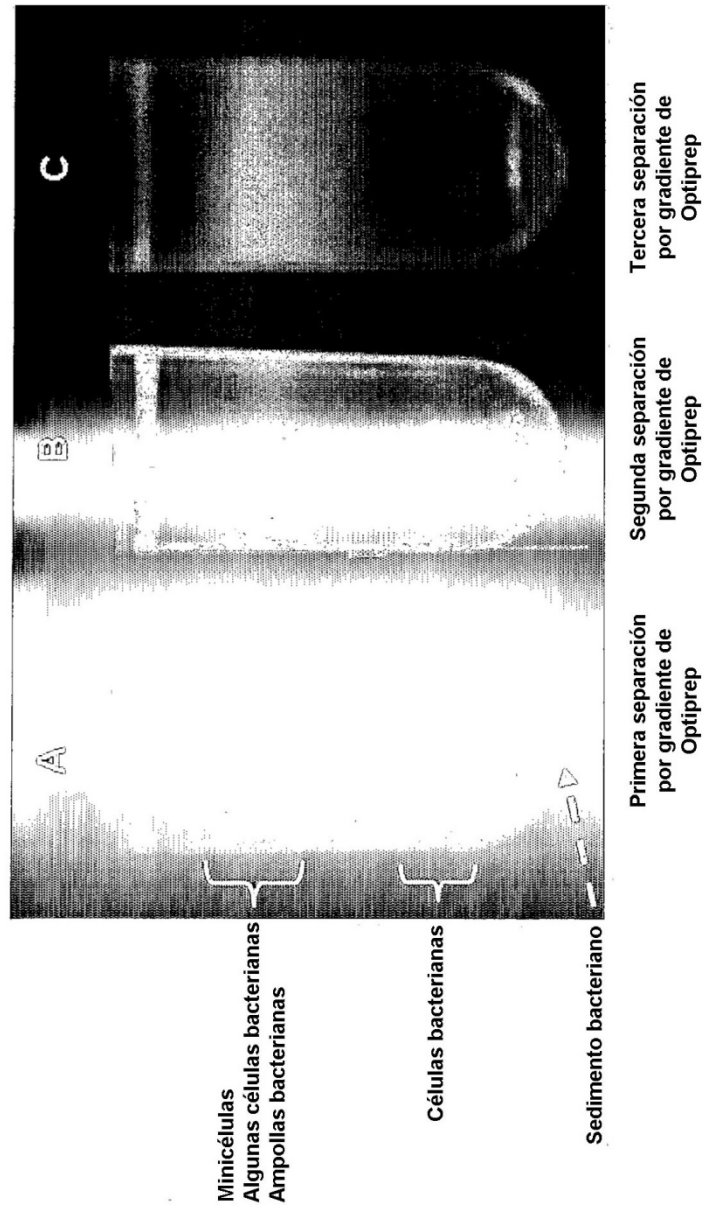


Figura 6A

Recuento total de minicélulas intactas en cada etapa
del procedimiento de purificación de minicélulas

