



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 342 830**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04743793 .4**

96 Fecha de presentación : **23.06.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1636344**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **22.03.2006**

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

30 Prioridad: **24.06.2003 US 602021**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
15.07.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
15.07.2010

73 Titular/es: **EnGeneIC Molecular Delivery Pty. Ltd.**
Building 2, 25 Sirius Road Lane Cove West
Sydney, NSW 2066, AU

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

74 Agente: **Arias Sanz, Juan**

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.

5 Antecedentes de la invención

La presente invención se refiere a un método farmacéuticamente compatible para purificar minicélulas bacterianas intactas.

10 Una minicélula es una forma anucleada de una *E. coli* u otra célula bacteriana, engendrada por una alteración en la coordinación, durante la fisión binaria, de la división celular con la segregación de ADN. La replicación cromosómica procariota está unida a la fisión binaria normal, que implica la formación de un septo en mitad de la célula. Por ejemplo, en *E. coli*, la mutación de los genes *min*, tal como *minCD*, puede eliminar la inhibición de la formación del septo en los polos celulares durante la división celular, lo que resulta en la producción de una célula hija normal y una minicélula anucleada (de Boer *et al.*, 1992; Raskin & de Boer, 1999; Hu & Lutkenhaus, 1999; Harry, 2001).

Además de las mutaciones en el operón *min*, las minicélulas anucleadas también se generan siguiendo una gama de otras reorganizaciones o mutaciones genéticas que afectan a la formación del septo, por ejemplo en el *divIVB1* en *B. subtilis* (Reeve y Cornett, 1975; Levin *et al.*, 1992). Las minicélulas también se pueden formar después de una alteración en los niveles de la expresión génica de proteínas implicadas en la división celular/segregación cromosómica. Por ejemplo, la sobreexpresión de *minE* produce división polar y la producción de minicélulas. De forma similar, las minicélulas sin cromosoma pueden provenir de defectos en la segregación cromosómica, por ejemplo la mutación *smc* en *Bacillus subtilis* (Britton *et al.*, 1998), la delección *spoOJ* en *B. subtilis* (Ireton *et al.*, 1994), la mutación *mukB* en *E. coli* (Hiraga *et al.*, 1989) y la mutación *parC* en *E. coli* (Stewart y D'Ari, 1992). Los productos génicos se pueden suministrar *in trans*. Cuando se sobreexpresa de un plásmido de alto número de copia, por ejemplo, CafA puede aumentar la velocidad de división celular y/o inhibir el reparto cromosómico después de la replicación (Okada *et al.*, 1994), lo que produce la formación de células encadenadas y minicélulas anucleadas (Wachi *et al.*, 1989; Okada *et al.*, 1993).

30 Las minicélulas son diferentes de otras pequeñas vesículas que se generan y liberan de forma espontánea en ciertas situaciones y, al contrario que las minicélulas, no se deben a reorganizaciones genéticas específicas o expresión génica episomal. Ejemplares de tales otras vesículas son ampollas bacterianas que son pequeñas vesículas de membrana (Dorward *et al.*, 1989). Se han observado las ampollas en varias especies de bacterias desde *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Bordetella*, *Escherichia*, *Neisseria*, *Pseudomonas*, *Salmonella* y *Shigella*, por ejemplo. Las ampollas bacterianas se pueden producir, por ejemplo, mediante manipulación del entorno de crecimiento (Katsui *et al.*, 1982) y mediante el uso de agentes exógenos que desestabilizan la membrana (Matsuzaki *et al.*, 1997).

Puesto que la replicación de plásmidos en células procariotas es independiente de la replicación cromosómica, los plásmidos pueden segregarse tanto en células hijas normales como minicélulas durante la división celular anómala descrita anteriormente. De esta manera, las minicélulas derivadas de *E. coli min*⁻ recombinantes tienen números significativos de copias de plásmidos, con todos los componentes celulares bacterianos excepto cromosomas y se han usado como tales para estudiar expresión de genes codificados en 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 tener plásmidos recombinantes con insertos de ADN tan grandes como de 20 kb, ausente cualquier ADN cromosómico, y pueden expresar nueve o más proteínas recombinantes de forma simultánea.

Una publicación de patente reciente, WO03033519, describe minicélulas recombinantes intactas que contienen moléculas de ácido nucleico terapéutico. Tales minicélulas son vectores eficaces para distribuir oligonucleótidos y polinucleótidos a células huésped *in vitro* e *in vivo*. Según esto, son particularmente útiles para introducir moléculas de ácido nucleico que, tras la transcripción y/o traducción, funcionan para mejorar o tratar de otra manera una enfermedad o modificar un rasgo asociado con un tipo celular, tejido u órgano particular de un sujeto.

55 Khachatourians *et al.*, (1973) describe un método para preparar minicélulas en donde las bacterias contaminantes presentes en cultivos de minicélulas después de centrifugación diferencial a baja velocidad se transforman en células filamentosas largas y se matan mediante tratamiento sónico.

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

65 Las técnicas convencionales implican (a) centrifugación a baja velocidad, para reducir la carga biológica de células parentales y (b) sedimentación a velocidad diferencial en un gradiente de glicerol, sacarosa o percoll. Una centrifugación diferencial inicial a baja velocidad típicamente reduce las células parentales en tanto como 100 veces, mientras que deja del 50% al 70% de las minicélulas en el líquido sobrenadante. Dos ciclos posteriores de sedimentación a velocidad diferencial producen después preparaciones de minicélulas que tienen una pureza de alrededor de 1 célula

vegetativa por 10^6 - 10^7 minicélulas. Tales métodos convencionales se revisan en Frazer & Curtiss (1975) y se describen en Reeve (1979), Clark-Curtiss & Curtiss (1983) y la patente de EE. UU. No. 4311797 (a Khachatourians).

La pureza alcanzada mediante los métodos convencionales de purificación puede no ser adecuada para todas las aplicaciones *in vivo*, algunas de las cuales pueden requerir dosis mayores de 10^6 minicélulas o incluso 10^{10} minicélulas. A la relación de contaminación anteriormente mencionada, esto se traduciría en 10.000 células parentales vivas por dosis. Tal nivel de contaminación podría ser letal, particularmente en pacientes inmunodeprimidos tales como pacientes de cáncer y SIDA. Por ejemplo, la DI_{50} (dosis infecciosa en el 50% de las personas infectadas) para organismos de *Shigella dysenteriae*, *Salmonella enteritidis* y *Listeria monocytogenes* es aproximadamente 10, 1.000 y 10 respectivamente. Además, estudios previos han descrito que el nivel de contaminación celular parental varía con diferentes cepas bacterianas (Clarke-Curtiss y Curtiss, 1983). A ese respecto, las aplicaciones de terapia génica descritas en WO03033519 pueden emplear minicélulas derivadas de una gama de cepas bacterianas mutantes Gram negativas y Gram positivas y requerirían minicélulas que están esencialmente libres de contaminación de células bacterianas parentales vivas. De esta manera, los métodos convencionales de purificación de minicélulas no permiten control de calidad para la fabricación cGMP (buena práctica de fabricación actual, en sus siglas en inglés) de dosis biofarmacéuticas de minicélulas.

Como desventaja adicional, los medios de formación del gradiente (percoll, sacarosa y glicerol) empleados por los métodos convencionales de purificación son incompatibles con usos *in vivo*. El percoll es tóxico y, por lo tanto, está restringido a contextos de "solo fines de investigación". La sacarosa da una gran osmolaridad a los gradientes que puede producir cambios fisiológicos en la minicélulas. En efecto, los presentes inventores han determinado que las minicélulas experimentan un choque osmótico en gradientes de sacarosa y, como consecuencia, de vuelven estructuralmente deformadas. El glicerol es muy viscoso y difícil de eliminar por completo de las suspensiones de minicélulas. Según esto, aunque estos medios de gradientes de densidad separan eficazmente células y orgánulos o componentes celulares, no son adecuados para separar células biológicas que están destinadas para uso clínico en seres humanos.

Se han desarrollado varios planteamientos para mejorar las técnicas convencionales de preparación de minicélulas. Un planteamiento emplea células parentales que tienen una mutación cromosómica *recA* y tratamiento con dosis bajas de radiación ultravioleta (UV) (Sancar *et al.*, 1979). La base lógica de este planteamiento es que la radiación UV degradará preferentemente el ADN cromosómico debido a su gran tamaño diana, en contraposición al ADN plasmídico menor. Sin embargo, las minicélulas recombinantes usadas para aplicaciones de terapia génica y vacunas deben estar libres de cualquier mutación y los métodos de mutagénesis no específica tales como la radiación UV no asegurarían que todos los ADN plasmídicos permanezcan sin mutar.

Otro planteamiento para mejorar la purificación de minicélulas opera inhibiendo la síntesis de la pared celular bacteriana, tal como usando ampicilina o cicloserina, o ayunando las cepas que requieren ácido diaminopimélico (DAP) de DAP (Clarke-Curtiss y Curtiss, 1983). Sin embargo, este planteamiento también padece varias desventajas. Primero, muchos plásmidos recombinantes usados para terapia génica tendrán un marcador de resistencia a ampicilina, que hace que las células parentales tengan el plásmido resistente a ampicilina. Segundo, muchas aplicaciones *in vivo* de minicélulas emplearán minicélulas derivadas de una gama de diferentes especies bacterianas, muchas de las cuales pueden no ser susceptibles a mutaciones que requieran DAP. Tercero, cualquier uso a gran escala de antibióticos es indeseable debido a los riesgos relacionados de generar bacterias resistentes a antibióticos.

Recientemente, se describió un planteamiento nuevo para purificar minicélulas que aborda las preocupaciones mencionadas anteriormente (WO 03033519). El nuevo método combina filtración de flujo transversal (el flujo de alimentación es paralelo a una superficie de la membrana, Forbes, 1987) y filtración frontal (el flujo de alimentación es perpendicular a la superficie de la membrana) para alcanzar una pureza de minicélulas que supera 10^{-7} (es decir, menor de una células 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 parte de las células bacterianas y enriquecer de esta manera los sobrenadantes en minicélulas.

Aunque este procedimiento de filtración supera las desventajas asociadas con las técnicas convencionales de purificación de minicélulas también tiene sus limitaciones. Primero, la filtración de flujo transversal produce una pérdida considerable de minicélulas, lo que añade costes al proceso de fabricación. Además, las preparaciones de minicélulas obtenidas mediante el procedimiento de filtración contienen alguna endotoxina bacteriana, que produce un choque leve cuando se administra *in vivo*. Por último, la pureza de las minicélulas varía entre lotes cuando se emplean los métodos de filtración.

Por lo tanto, permanece una necesidad para métodos de purificación de minicélulas bacterianas que maximicen el rendimiento y pureza de las minicélulas mientras que emplean medios biológicamente compatibles.

Compendio de la invención

Para abordar estas y otras necesidades, la presente invención proporciona un método para purificar minicélulas bacterianas que implica someter una muestra que contiene minicélulas a centrifugación en gradiente de densidad en un medio biológicamente compatible. El método opcionalmente incluye un paso preliminar de centrifugación diferencial.

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

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método de purificación de minicélulas en el que se somete una muestra que contiene minicélulas a una condición que induce 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 aún otro aspecto, la presente invención proporciona un método de purificación de minicélulas que incluye (a) someter una muestra que contiene minicélulas a centrifugación en gradiente de densidad en un medio biológicamente compatible, (b) someter la muestra a una condición que induzca que las células bacterianas parentales adopten una forma filamentosa, después (c) filtrar la muestra para obtener una preparación purificada de minicélulas.

Los métodos inventivos opcionalmente incluyen uno o más pasos para eliminar la endotoxina de las preparaciones purificadas de minicélulas y/o tratamiento de las preparaciones purificadas de minicélulas con un antibiótico.

Por último, la presente invención proporciona preparaciones purificadas de minicélulas, preparadas según los métodos anteriores. Preferiblemente, las preparaciones purificadas de minicélulas contienen menos de alrededor 1 célula bacteriana parental contaminante por 10^{10} ó 10^{11} minicélulas. También preferiblemente, las preparaciones purificadas de minicélulas están sustancialmente libres de endotoxina y restos celulares (incluyendo bacterias parentales muertas, fragmentos de membrana, ácidos nucleicos y componentes intracelulares) que podrían inducir una respuesta inflamatoria o choque endotóxico en un huésped inmunizado.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 representa una manera en que las técnicas de purificación de minicélulas de la presente invención se pueden integrar con otros procedimientos de purificación de minicélulas.

La figura 2 muestra micrografías electrónicas de barrido de bacterias de la cepa *minCDE* de *S. typhimurium* (gama de diferentes tamaños) y minicélulas derivadas de la cepa. (A) muestra una bacteria parental de pequeño tamaño (1,1 μm de longitud) y una minicélula (0,4 μm de diámetro), (B) muestra una bacteria parental mayor (1,32 μm de longitud), (C) muestra una bacteria parental incluso mayor (1,6 μm de longitud) y (D) muestra una mezcla de bacterias parentales y minicélulas, donde las primeras varían en longitud desde 1 a 4 μm .

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

La figura 3B muestra imágenes de microscopia de fluorescencia que comparan los tamaños de bacterias de la cepa *minCDE* de *S. typhimurium* incubadas en medio de crecimiento durante 4 horas en ausencia de NaCl (parte izquierda de la imagen) y de filamentos bacterianos formados después de 4 horas de incubación en presencia de NaCl al 5% (parte derecha de la imagen).

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

La figura 4B muestra imágenes de microscopia de fluorescencia que comparan los tamaños de bacterias de la cepa *minCDE* de *E. coli* incubadas en medio de crecimiento durante 4 horas en ausencia de NaCl (parte izquierda de la imagen) y de filamentos bacterianos formados después de 4 horas de incubación en presencia de NaCl al 5% (parte derecha de la imagen).

Las figuras 5A-C muestran 3 fases secuenciales de purificación de minicélulas usando medios biológicamente compatibles, por ejemplo Optiprep, para la centrifugación en gradiente de densidad como se describe en el ejemplo 3. La preparación cruda de minicélulas separada por la primera centrifugación en gradiente de densidad (Fig. 5A) revela los contaminantes, es decir, precipitado bacteriano significativo y células bacterianas de tamaño relativamente pequeño que forman una banda entre las minicélulas y el precipitado bacteriano. La banda de minicélulas se recogió y procesó mediante un segundo gradiente de Optiprep (Fig. 5B) revelando una banda de minicélulas más clara, una banda más definida de células bacterianas pequeñas y un precipitado bacteriano insignificante. La banda de minicélulas se recogió y procesó mediante un tercer gradiente de Optiprep (Fig. 5C) revelando una purificación significativa de las minicélulas.

Las figuras 6A-C muestran los recuentos de minicélulas (Fig. 6A), células bacterianas viables (Fig. 6B) y endotoxina (UE; Fig. 6C), respectivamente, durante los pasos de un procedimiento de purificación de minicélulas. Las diferentes fases en el proceso de purificación donde se recogieron 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 de un proceso de purificación separado. Se muestran las barras de los errores estándar.

Descripción detallada de formas de realización preferidas

Los presentes 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 normalmente
5 usados, mientras que son eficaces al separar minicélulas de contaminantes, con frecuencia tienen efectos negativos sobre las minicélulas. Por ejemplo, los métodos convencionales normalmente emplean gradientes de sacarosa al 30% y requieren de dos a tres purificaciones repetidas en gradiente de sacarosa para alcanzar la pureza adecuada. Esto expone las minicélulas a alta presión osmótica durante hasta dos horas, produciendo probablemente un choque osmótico para las minicélulas. Los presentes inventores han encontrado que las minicélulas purificados por gradiente de
10 sacarosa con frecuencia están significativamente deformadas con respecto a las minicélulas purificadas por otros medios. Presumiblemente, la deformidad proviene de la desestabilización de la membrana, que permite exceso de líquido en las minicélulas. Tal desestabilización de la membrana, y su aumento relacionado en la porosidad de la membrana, también podrían permitir que contenidos del citosol, incluyendo ácidos nucleicos terapéuticos salieran de las minicélulas.

En un aspecto, por lo tanto, la presente invención contempla un método de purificación de minicélulas que comprende separar minicélulas de células bacterianas parentales y otros contaminantes mediante centrifugación en gradiente de densidad en un medio biológicamente compatible. Después de la centrifugación, se recoge una banda de minicélulas del gradiente y, opcionalmente, las minicélulas se pueden someter a rondas adicionales de centrifugación
20 en gradiente de densidad para maximizar la pureza. El método puede incluir además un paso preliminar de realizar una centrifugación diferencial en la muestra que contiene las minicélulas. Cuando se realiza a baja fuerza centrífuga, la centrifugación diferencial eliminará parte de las células bacterianas parentales, enriqueciendo de esta manera el sobrenadante en minicélulas.

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

OptiPrep™ (Axis-Shield PLC, Dundee, Escocia), que es una solución estéril al 60% (peso/volumen) de yodixanol (5,5'-[(2-hidroxi-1-3-propanediil)-bis(acetilamino)]-bis[N,N'-bis(2,3-dihidroxipropil-2,4,6-triyodo-1,3-bencenocarboxamida)] en agua, constituye un ejemplo altamente preferido de un medio biológicamente compatible. Los
35 investigadores han usado extensivamente OptiPrep™ y otros medios de gradiente de densidad similares para purificar células y orgánulos de mamífero, así como vesículas de membrana, virus, proteínas, ácidos nucleicos y lipoproteínas. Estos usos se revisan en *Density Gradient Media. Applications and Products 2002*, Axis-Shield PLC, Dundee, Escocia. Sin embargo, tales medios no se emplearon previamente para purificar minicélulas derivadas de bacterias. En efecto, antes de la observación de los presentes inventores de que otros medios afectaban negativamente a la fisiología y morfología de las minicélulas, ni siquiera se reconocía la necesidad para medios biológicamente compatibles para purificar minicélulas.

Con OptiPrep™ es posible usar gradientes preformados o formar un gradiente *in situ* mediante centrifugación (gradiente de autogeneración). Los gradientes preformados pueden ser gradientes continuos o discontinuos. Los gradientes
45 preformados de OptiPrep™ se pueden formar poniendo capas de las soluciones de las concentraciones deseadas en un tubo de centrífuga y dejando que las soluciones difundan sellando la parte superior del tubo y colocándolo sobre el lateral durante la difusión. La preparación de gradientes de densidad isosmóticos con OptiPrep™ depende de preparar soluciones en gradiente mediante dilución de la solución de OptiPrep™ con una solución diluyente apropiada. La selección de una solución diluyente y equilibradores osmóticos está dentro de la técnica normal o practicantes.

En otro aspecto, la presente invención combina centrifugación en gradiente de densidad en un medio biológicamente compatible con pasos de filtración. Por ejemplo, la centrifugación en gradiente de densidad se puede incorporar en un proceso de filtración en serie, como se ejemplifica en la figura 1. Uno de tales procesos de filtración en serie se describe en WO03033519. Brevemente, ese proceso combina la filtración de flujo transversal (el flujo de alimentación
55 es paralelo a una superficie de membrana) con filtración frontal (el flujo de alimentación es perpendicular a una superficie de membrana). Opcionalmente, esta combinación puede estar precedida por una centrifugación diferencial, a baja fuerza centrífuga, para eliminar parte de las células bacterianas parentales y enriquecer de esta manera el sobrenadante en minicélulas. También opcionalmente, la combinación puede estar seguida por un tratamiento con un antibiótico para matar las células bacterianas parentales residuales.

La filtración de flujo transversal, dependiendo del tamaño de poro del filtro, puede separar minicélulas de contaminantes mayores tales como células bacterianas parentales, y de contaminantes más pequeños tales como ampollas bacterianas, endotoxina libre, ácidos nucleicos, restos celulares y líquido en exceso. Para separar minicélulas de contaminantes mayores, el tamaño nominal de poro de los filtros de flujo transversal debe permitir que las minicélulas
65 atraviesen los filtros, pero no las células bacterianas grandes. Se prefiere un tamaño de poro de 0,45 µm para este fin porque las minicélulas tienen aproximadamente 0,4 µm de diámetro, mientras que las células bacterianas son mayores. Para separar las minicélulas de los contaminantes más pequeños, el tamaño nominal del poro de los filtros de flujo transversal debe permitir que los contaminantes más pequeños pasen a través de los filtros, pero no las minicélulas. Se

prefiere un tamaño de poro de $0,2\ \mu\text{m}$ para este fin porque las ampollas bacterianas varían en diámetro de $0,05\ \mu\text{m}$ a $0,2\ \mu\text{m}$, y los otros contaminantes más pequeños son menores de $0,2\ \mu\text{m}$.

La aplicación eficaz de la filtración de flujo transversal en este contexto típicamente supone al menos paso que implica un tamaño de poro mayor, alrededor de $0,45\ \mu\text{m}$, seguido por al menos un paso con un tamaño de poro menor, alrededor de $0,2\ \mu\text{m}$. Entre o durante los pasos de filtración de flujo transversal en serie, se puede realizar diafiltración para maximizar la recuperación de 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 se eliminan los solutos y las partículas menores indeseables.

El uso de filtración de flujo transversal acomoda suspensiones que tienen cargas pesadas de materia particulada, tales como cultivos bacterianos, que pueden tener cargas de 10^{11} a 10^{13} poblaciones de bacterias y minicélulas por litro de cultivo. Para minimizar que se ensucie el filtro y la consiguiente pérdida de minicélulas, se puede diluir el cultivo de bacterias/minicélulas, preferiblemente de 5 veces a 10 veces. Las diluciones también permiten el uso de presión de bomba y velocidad de flujo apropiadamente bajos.

Para eliminar las células bacterianas parentales residuales que permanecen después de la filtración de flujo transversal, se puede realizar una filtración frontal. Para este fin, se prefiere el uso de al menos una filtración frontal, que emplea un tamaño de poro de alrededor de $0,45\ \mu\text{m}$.

En una forma de realización, un método de purificación de minicélulas combina centrifugación en gradiente de densidad a través de un medio biológicamente compatible con un paso de filtración que emplea al menos un filtro con un tamaño de poro menor que o igual a alrededor de $0,2\ \mu\text{m}$.

En otra forma de realización, un método de purificación de minicélulas combina centrifugación en gradiente de densidad a través de un medio biológicamente compatible con un paso de filtración en línea que emplea un filtro con un tamaño de poro de alrededor de $0,45\ \mu\text{m}$.

Los presentes inventores también han descubierto que inducir a las células bacterianas parentales a adoptar una forma filamentosa, antes de la filtración, mejora significativamente la purificación de minicélulas. Puesto que las minicélulas y las células bacterianas parentales tienen el mismo diámetro (media de $0,4\ \mu\text{m}$) algunas células bacterianas pueden atravesar un poro de filtro que apenas acomoda una minicélula (por ejemplo, poros de $0,45\ \mu\text{m}$ de filtro de flujo transversal o frontal), incluso aunque la longitud de las células bacterianas sea al menos de $1\ \mu\text{m}$. Esto sucede cuando una célula bacteriana oblonga se coloca perpendicular a un filtro. Sin embargo, los filamentos de células bacterianas, que consisten en células bacterianas unidas por los extremos no pueden penetrar tales filtros.

De esta manera, otro aspecto de la invención supone inducir que las células bacterianas parentales contaminantes formen filamentos antes de la filtración. Esto se consigue sometiendo una suspensión de minicélulas a condiciones medioambientales que inducen una respuesta a estrés en las células parentales. Tales condiciones las conoce bien el experto en la materia, e incluyen condiciones anaeróbicas, condiciones de limitación de nutrientes y condiciones osmóticas anormales. Los medios hipertónicos son particularmente útiles para inducir la filamentación. En un ejemplo, se puede suplementar una suspensión de minicélulas con caldo de soja tripticasa (medio de cultivo) que contiene cloruro de sodio al 5% (inductor de estrés). En tales condiciones inductoras de estrés, las células fallan en tabicar completamente durante la división celular y forman largos filamentos bacterianos que consisten en múltiples células.

Las formas de realización preferidas de la invención explotan la filamentación bacteriana para aumentar la pureza de las minicélulas. De esta manera, en un aspecto, la invención proporciona un método de purificación de minicélulas que incluye los pasos de (a) someter una muestra que contiene minicélulas a centrifugación en gradiente de densidad en un medio biológicamente compatible y (b) someter la muestra que contiene las minicélulas a una condición que induzca las células bacterianas parentales a adoptar una forma filamentosa, seguido por (c) filtrar la muestra para obtener una preparación purificada de minicélulas.

Los presentes inventores han descubierto además que la eliminación de endotoxina mejora las preparaciones de minicélulas. En estudios en ratones *in vivo*, observaron un choque leve resultante del uso de preparaciones de minicélulas que contenían endotoxinas residuales. De esta manera, las preparaciones de minicélulas útiles preferiblemente están sustancialmente libres de endotoxinas, lo que significa que contienen niveles clínicamente insignificantes de endotoxinas o niveles que no inducirían una respuesta inflamatoria o choque endotóxico en un paciente.

Los métodos para eliminar endotoxinas se conocen bien en la técnica. Un método ejemplar utiliza bolas magnéticas (por ejemplo, Dynabeads™; Dynal biotech, Oslo, Noruega) recubiertas con anticuerpos anti-lípido A. Se pueden mezclar las bolas magnéticas recubiertas con anticuerpos con una suspensión de minicélulas en un tubo e incubar para permitir que el anticuerpo se una al lipopolisacárido (LPS) libre a través de su parte lípido A. El tubo que tiene la suspensión se coloca luego en un soporte magnético para inmovilizar las bolas magnéticas en complejo con anti-lípido A-LPS, y se recogen las minicélulas. Se pueden realizar ciclos múltiples de incubación con bolas recientes para alcanzar el nivel de pureza deseado.

También son útiles para eliminar la endotoxina libre los anticuerpos monoclonales que se unen a epítomos encontrados en la parte de polisacárido del núcleo profundo del LPS. No se piensa que la parte de polisacárido del núcleo

profundo esté expuesta en superficies de membranas bacterianas. Por lo tanto, los anticuerpos dirigidos contra esta parte de LPS no se deben unir a LPS unido a células bacterianas. Antes de usar, se deben probar tales anticuerpos para asegurar que no dan reacción cruzada con componentes de LPS expuestos en la superficie celular.

Debido al potencial de las endotoxinas bacterianas de causar efectos secundarios dañinos, los métodos preferidos de purificación de minicélulas incluyen uno o más pasos para eliminarlas. De esta manera, en un aspecto, la invención proporciona un método de purificación de minicélulas que emplea un paso de centrifugación en gradiente de densidad en un medio biológicamente compatible, seguido por uno o más pasos para eliminar la endotoxina de la preparación enriquecida en minicélulas resultante. Más preferiblemente, el método incluye además uno o más pasos de filtración, como se ha descrito anteriormente.

Las técnicas de purificación de minicélulas descritas aquí se pueden emplear en varias combinaciones para obtener una preparación de una pureza deseada. Los métodos preferidos incluyen una combinación de centrifugación en gradiente de densidad y filtración. Los métodos preferidos también incluyen filamentosación inducida por estrés de las células bacterianas parentales seguido por filtración y eliminación de endotoxina de las preparaciones de minicélulas. Un ejemplo de un método (esquemáticamente representado en la figura 1) que emplea todas estas técnicas es como sigue:

Paso A: Centrifugación diferencial de un cultivo de células bacterianas que producen minicélulas. Este paso, que se puede realizar a 2000 g durante aproximadamente 20 minutos, elimina la mayoría de las células bacterianas parentales, mientras que deja las minicélulas en el sobrenadante.

Paso B: Centrifugación en gradiente de densidad usando un medio isotónico y no tóxico de gradiente de densidad. Este paso separa las minicélulas de muchos contaminantes, incluyendo células bacterianas parentales, con pérdida mínima de minicélulas. Preferiblemente, este paso se repite en un método de purificación.

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

Paso D: Filamentación inducida por estrés de células bacterianas parentales residuales. Esto se puede conseguir sometiendo la suspensión de minicélulas a cualquiera de varias condiciones ambientales que inducen estrés.

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

Paso F: Filtración de flujo transversal para eliminar contaminantes pequeños, tales como ampollas de membrana, fragmentos de membrana, restos bacterianos, ácidos nucleicos, componentes del medio, etcétera, y para concentrar las minicélulas. Se puede emplear un filtro de 0,2 μm para separar las minicélulas de contaminantes pequeños, y se puede emplear un filtro de 0,1 μm para concentrar las minicélulas.

Paso G: Filtración frontal para eliminar células bacterianas filamentosas muertas. Para este paso se puede emplear un filtro de 0,45 μm .

Paso H: Eliminación de endotoxina de la preparación de minicélulas. Para este paso se pueden emplear bolas magnéticas recubiertas con anti-lípido A.

Los expertos en la materia pueden realizar variaciones de estos pasos e incorporar pasos adicionales de purificación, consistentes con los principios mostrados aquí.

Los métodos anteriores para purificar minicélulas bacterianas proporcionan preparaciones purificadas de minicélulas útiles para aplicaciones *in vivo* tales como las descritas en WO03033519. Estas preparaciones contienen menos de alrededor de 1 célula bacteriana parental contaminante por 10^7 minicélulas, preferiblemente menos de alrededor de 1 célula bacteriana parental contaminante por 10^8 minicélulas, más preferiblemente menos de alrededor de 1 célula bacteriana parental contaminante por 10^9 minicélulas, incluso más preferiblemente menos de alrededor de 1 célula bacteriana parental contaminante por 10^{10} minicélulas y aún más preferiblemente menos de alrededor de 1 célula bacteriana parental contaminante por 10^{11} minicélulas. Preferiblemente cualquier células bacteriana parental contaminante está muerta, y estas preparaciones no contienen ninguna célula bacteriana parental *viva*. También preferiblemente, las preparaciones purificadas de minicélulas están sustancialmente libres de endotoxina y restos celulares (incluyendo bacterias parentales muertas, fragmentos de membrana, ácidos nucleicos y componentes intracelulares). Como se ha explicado previamente, una preparación de minicélulas está sustancialmente libre de endotoxina 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 sustancialmente libre de restos celulares si contiene niveles clínicamente insignificantes de restos celulares o niveles que no inducirían una respuesta inflamatoria en un paciente.

La referencia a los siguientes ejemplos ilustrativos ayudará a proporcionar una comprensión más completa de la invención.

Ejemplo 1

Inconsistencia de la filtración sin las técnicas inventivas

5 Este ejemplo ilustra que el uso de filtración para purificar minicélulas, sin las técnicas inventivas, puede producir resultados inconsistentes.

Se analizan cepas bacterianas mutantes que producen minicélulas de *S. typhimurium*, *E. coli* y *Shigella flexneri* mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) para determinar el tamaño de las células bacterianas y minicélulas. Para la microscopía electrónica de barrido de alta resolución se sigue el método siguiente. Se hacen crecer los cultivos bacterianos en caldo de soja tripticasa (TSB) (marca BBL adquirido de Bacto Labs, Liverpool, NSW, Australia). El medio 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 durante la noche en un incubador con agitación a 37°C. Para cambiar soluciones las células se centrifugan a 13.000 rpm durante 20 minutos, se desecha el sobrenadante y las células se resuspenden en el nuevo reactivo (descrito posteriormente) usando un mezclador vortex. Esto lava iones y biomateriales de las células y las deja resuspendidas en un volumen pequeño de agua destilada. La secuencia de reactivos es (a) 1 ml de agua destilada - reprecipitar, (b) 1 ml de agua destilada - resuspender, (c) depositar 250 μ l en una placa de muestras 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 un metalizador a vacío limpio Xenosput. Las muestras recubiertas se examinan usando un microscopio electrónico de campo de emisión Hitachi S-900 usando una energía de haz de 3 kilovoltios (Universidad de Nueva Gales del Sur, NSW, Australia). Se registran imágenes digitales a distintos aumentos usando un digitalizador ImageSlave.

Los resultados muestran (en las figuras 2A-D se muestran imágenes representativas de la cepa *minCDE* de *S. typhimurium*) que las células bacterianas parentales varían en longitud de 0,9 μ m a 4 μ m y de 0,4 μ m a 0,5 μ m de anchura. Después de los pasos de filtración esbozados en la parte izquierda de la figura 1, algunos lotes muestran contaminación bacteriana residual. Las bacterias contaminantes son de pequeño tamaño, es decir, alrededor de 0,9 μ m de longitud. Esto indica que algunas bacterias de pequeño tamaño que tienen aproximadamente la misma anchura que las minicélulas (fig. 2A) pasan a través de los filtros de flujo transversal y frontal de 0,45 μ m.

Ejemplo 2

Eliminación de bacterias pequeñas: conversión en filamentos bacterianos

35 Este ejemplo demuestra que inducir que las bacterias filamen antes de la filtración mejora los procesos de purificación de minicélulas.

Se diseña un estudio para abordar el problema descrito en el ejemplo 1, haciendo las bacterias parentales de pequeño tamaño residuales sustancialmente mayores que los 0,45 μ m del tamaño de poro de un filtro frontal. Las condiciones que inducen estrés en un entorno de crecimiento bacteriano pueden prevenir la tabicación completa durante la división celular bacteriana produciendo filamentos bacterianos.

El estudio demuestra que el medio de crecimiento bacteriano hipertónico (inductor de estrés) induce fehacientemente la filamentación de cepas bacterianas productoras de minicélulas de *S. typhimurium* y *E. coli*. Todas las bacterias se hacen crecer a partir de soluciones madre en glicerol mantenidas a -80°C. Las cepas de *S. typhimurium* y *E. coli* se hacen crecer en caldo de soja tripticasa (TSB) (marca BBL adquirido 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 la noche se diluye 1:5.000 en TSB reciente y se hace crecer hasta que la DO_{600nm} alcanza 0,2. El cultivo se divide en diez alícuotas de 5 ml en viales estériles y se añade NaCl estéril previamente esterilizado en autoclave a cada vial para producir concentraciones finales de NaCl (peso/volumen) del 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 control a las 0 horas para microscopía. Las muestras se centrifugan a 13.200 rpm y los precipitados de bacterias/minicélulas se resuspenden en agua destilada. Se coloca una gota de cada muestra en un portaobjetos de vidrio, se seca al aire y se fija con calor. Cada muestra se tiñe con Gram usando un lavado de alcohol al 95% seguido por inmersión en safranina de Gram durante 1 minuto y un lavado con agua. Los portaobjetos se visualizan usando el microscopio óptico de Leica modelo DMLB con análisis de imágenes por medio de una cámara DC de Leica y software de tratamiento de imágenes IM de Leica. Las muestras se ven a 40X o con inmersión en aceite a 100X aumentos.

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

65 Los resultados muestran (figuras 3A-B y 4A-B) que al aumentar la concentración de NaCl, las células bacterianas forman filamentos que comprenden de dos a veinte cocabacilos pegados de extremo a extremo. En el intervalo de concentraciones de NaCl del 2% al 3%, la filamentación es variable (figuras 3A y 4A), porque varias células bacterianas no forman filamentos incluso después de periodos de incubación más largos. Sin embargo, en NaCl del 4% al

5%, las células bacterianas se vuelven filamentos fehacientemente (figuras 3B y 4B). El periodo de incubación óptimo para la filamentación en NaCl del 4% al 5% es de alrededor de 4 horas y la incubación adicional de hasta 24 horas generalmente no es necesaria. Concentraciones de sal mayores del 5,5% al 8% disminuyen la formación de filamentos. Estudios preliminares para determinar un recuento de bacterias viables de cada muestra mediante plaqueo con dilución en placas de TBS-agar sugiere que números significativos de células bacterianas son aniquiladas a concentraciones de sal mayores (NaCl del 5,5% al 8%), una potencial razón por la que se observa un descenso en la filamentación a estas concentraciones de NaCl.

Se realiza un estudio definitivo del efecto de varias concentraciones de NaCl en la viabilidad celular bacteriana usando el kit de viabilidad bacteriana LIVE/DEAD BacLight (Molecular Probes, Eugene, OR, EE. UU.). El kit emplea dos colorantes de ácido nucleico, el colorante fluorescente verde SYTO® 9 y el colorante fluorescente rojo yoduro de propidio. Estos colorantes se diferencian en su capacidad de penetrar células bacterianas sanas. El colorante SYTO 9 marca tanto bacterias vivas como muertas. Por el contrario, el yoduro de propidio (YP) penetra sólo bacterias con membranas dañadas, reduciendo la fluorescencia de SYTO 9 cuando ambos colorantes están presentes. De esta manera, 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 de la filamentación inducida por sal y se obtienen muestras a las 0 horas, 2 horas, 4 horas, 8 horas y 24 horas para las varias concentraciones de NaCl. Las muestras se centrifugan a 13.200 rpm, se desecha el sobrenadante y el precipitado de bacterias/minicélulas se resuspende en 100 µl de BSG. Se añaden 0,5 µl de una mezcla 50/50 de SYTO 9/YP a cada muestra y se incuban durante 15 minutos. Las muestras se centrifugan a 13.200 rpm, se desechan los sobrenadantes y los precipitados se resuspenden en 100 µl de agua destilada. Se coloca una gota de cada muestra en un portaobjetos de vidrio, se seca al aire y se recubre con una gota de aceite de montar BacLight. Cada muestra se visualiza usando el microscopio óptico de Leica modelo DMLB con análisis de imágenes por medio de una cámara DC de Leica y software de adquisición de imágenes digitales de Leica. Las muestras se ven a 40X o con inmersión en aceite a 100X aumentos.

Los resultados muestran (fotos en color no mostradas) que a concentraciones de NaCl del 5,5% y mayores, números significativos de células bacterianas fluorescen en rojo (células muertas) y a concentraciones de NaCl del 7% y el 8% casi todas las células bacterianas están muertas a las 2 horas de incubación. Este resultado muestra que el NaCl del 4% al 5% durante un tiempo de incubación de 4 horas es el límite máximo para alcanzar filamentación. Después de 2 horas de incubación, las células bacterianas vivas se vuelven filamentos. Sin embargo, al aumentar el tiempo de incubación los filamentos fluorescen en rojo, lo que sugiere que incluso NaCl del 4% al 5% es suficiente estrés para las células bacterianas y que empiezan a morir después unas pocas generaciones de crecimiento. Puesto que este estrés parece inhibir la tabicación completa durante la división celular bacteriana, es suficiente para permitir la formación de filamentos bacterianos. Estos datos también explican por qué la filamentación no se alcanza a mayores concentraciones de sal: el estrés es tóxico, inhibe el crecimiento bacteriano y la división celular y causa muerte celular.

Ejemplo 3

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

Después de la centrifugación diferencial del cultivo de células bacterianas/minicélulas, se eliminaron un número significativo de contaminantes celulares mediante centrifugación en gradiente de densidad usando un medio biológicamente compatible. OptiPrep™ (Axis-Shield PLC, Dundee, Escocia), que es una solución estéril al 60% (peso/volumen) de yodixanol (5,5'-[(2-hidroxi-1-3-propanediil)-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 del 6% al 12% en tubos de centrifuga transparentes de polipropileno de 25 ml (Livingstone International Pty Ltd, Sídney, Australia) y se colocó 1 ml de la suspensión de minicélulas/células bacterianas sobre cada gradiente. Los tubos se centrifugaron a 2.000 g/20 minutos. Se recogieron veintitrés muestras de 1 ml del tubo y se analizaron mediante microscopía óptica usando un objetivo de 100X aumentos de inmersión en aceite. Los resultados mostraron 3 segmentos principales como muestra la figura 5A. El segmento superior contenía principalmente minicélulas con células bacterianas contaminantes y ampollas bacterianas. Un segundo segmento inferior tenía principalmente células bacterianas pero parecían aproximadamente de 2 a 3 veces mayores que una minicélula. El precipitado tenía principalmente células bacterianas.

Se recogió la suspensión cruda de minicélulas (banda superior; Fig. 5A) y se centrifugó a 13.200 rpm/30 minutos en tubos Eppendorf. El precipitado se resuspendió en 2 ml de BSG estéril y se volvió a procesar en gradientes de OptiPrep™ como antes. Los resultados mostraron (Fig. 5B) que había un precipitado bacteriano relativamente menor, la banda media era mucho más clara y la banda de minicélulas parecía distinta. Se analizaron todas las zonas (volúmenes de 2 ml) en el tubo mediante microscopía óptica como antes y los resultados fueron similares excepto que la banda de minicélulas parecía tener muy pocos contaminantes bacterianos. Se recogió la banda de minicélulas como anteriormente y se volvió a procesar en un tercer gradiente de OptiPrep™ como antes. Esto produjo una banda clara (Fig. 5C) y cuando se analizó microscópicamente reveló la presencia de minicélulas principalmente con muy pocos contaminantes bacterianos. Los experimentos se repitieron 10 veces con resultados similares.

Ejemplo 4

Reducción significativa de la endotoxina libre de preparaciones purificadas de minicélulas intactas

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

Se eliminó la endotoxina libre residual de las preparaciones purificadas de minicélulas como sigue. Se conjugaron bolas magnéticas recubiertas con proteína G (Dynal Biotech, Oslo, Noruega) a un anticuerpo policlonal de cabra anti-lípido A (Biodesign, Saco, Maine, EE. UU.). Este anticuerpo da reacción cruzada con una gama de diferentes especies de LPS bacteriana Gram negativas incluyendo LPS de *S. typhimurium*. La reacción de conjugación se llevó a cabo incubando (durante la noche con agitación suave a 4°C) Dynabeads-proteína G que se habían lavado tres veces en 0,5 ml de tampón fosfato de sodio 0,1 M (pH 5,0) con el anticuerpo anti-lípido A. Se eliminó el exceso de anticuerpo lavando el conjugado Dynabeads-proteína G/anti-lípido A tres veces con 0,5 ml de tampón fosfato de sodio 0,1 M (pH 5,0). El conjugado se resuspendió en 300 µl del mismo tampón y se usaron 50 µl para tratar 500 µl de la suspensión purificada de minicélulas para la eliminación de la endotoxina libre. La coincubación se llevó a cabo durante 1 hora a 4°C seguido por la colocación del tubo en un imán (Dynal) y recogida el sobrenadante de minicélulas. El tratamiento se llevó a cabo tres veces con conjugado Dynabeads-proteína G/anti-lípido A reciente para asegurar la máxima eliminación de la endotoxina libre residual.

Ejemplo 5

Enumeración de los recuentos de minicélulas intactas, células bacterianas y endotoxina 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 en recuentos bacterianos parentales y reducción de endotoxina libre. Se llevó a cabo el procedimiento completo de purificación tres veces y se recogieron muestras en cada uno de los 12 pasos esbozados posteriormente. Se analizó cada muestra para el recuento de minicélulas y células bacterianas mediante citometría de flujo y la viabilidad contando en placas de agar. También se determinaron las unidades de endotoxina (UE) para cada muestra mediante el ensayo LAL (Charles River Laboratories, Inc. Wilmington, MA, EE. UU.), llevado a cabo por los Servicios australianos de microbiología Pty Ltd (Sídney, Australia). El proceso completo de purificación se resume a continuación.

Se hizo crecer una cepa recombinante *minCDE* de *S. typhimurium* con un plásmido de alto número de copia (marcador de ácido nucleico) durante la noche (O/N) a 37°C con agitación en 25 ml de caldo de soja tripticasa (TSB). Se inocularon después seis matraces que contenía cada uno 1 L de TSB con 2 ml de cultivo O/N y se incubaron adicionalmente a 37°C con agitación (muestra 1). El cultivo se centrifugó diferencialmente a 2000 g/20 minutos en una centrífuga de mesa para sedimentar un número significativo de células bacterianas. Se recogió el sobrenadante (muestra 2) y se concentró pasándolo a través de un filtro de flujo transversal de 0,1 µm. La solución se concentró adicionalmente mediante centrifugación a 13.200 rpm/60 minutos en una centrífuga Eppendorf y se resuspendió el precipitado de minicélulas/células bacterianas en 16 ml de BSG estéril (muestra 3). Se prepararon dieciséis gradientes de densidad (del 6% al 12%) en tubos de centrifuga transparentes de polipropileno de 25 ml (Livingstone International Pty Ltd, Sídney, Australia) usando un medio biológicamente compatible OptiPrep™ (Axis-Shield PLC, Dundee, Escocia) y se colocó 1 ml de la suspensión de minicélulas/células bacterianas sobre cada gradiente. Los tubos se centrifugaron a 2.000 g/20 minutos y se recogió la banda de minicélulas (Fig. 5A) de la parte superior de cada tubo con una jeringuilla. Se recogieron aproximadamente 24 ml de una suspensión cruda de minicélulas (muestra 4) y se centrifugó a 13.200 rpm/30 minutos en tubos Eppendorf. El precipitado se resuspendió en 12 ml de BSG estéril y se volvió a procesar en 12 gradientes de OptiPrep™ como antes. Se recogieron las bandas de minicélulas (Fig. 5B) como anteriormente (muestra 5) y se volvieron a procesar a través de 4 gradientes de OptiPrep™ como antes. Esto produjo una banda de minicélulas difusa clara (Fig. 5C) en cada tubo y se recogió (muestra 6). Se añadió la suspensión de minicélulas a 1 L de TSB y se incubó durante 2 horas a 37°C en reposo para reactivar las células bacterianas contaminantes (muestra 7). Se añadió NaCl (concentración final del 5% peso/volumen) a la suspensión para estresar 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 convierten en filamentos bacterianos (muestra 8). Se añadieron los antibióticos de amplio espectro, gentamicina (200 µg/ml) y kanamicina (200 µg/ml) a la suspensión y se incubó O/N a 37°C para matar todas las células bacterianas vivas (muestra 9). La suspensión se pasó a través de filtro de flujo transversal de 0,2 µm para intercambiar tampón y la suspensión se reconstituyó en BSG estéril (muestra 10). Este proceso eliminó todos los contaminantes menores de 0,2 µm por ejemplo, endotoxina libre, fragmentos bacterianos y de minicélulas lisados, ácidos nucleicos y nutrientes de TBS. Los filamentos bacterianos de la suspensión de minicélulas se eliminaron después pasando la solución a través de filtro frontal de 0,45 µm. La suspensión se concentró a un volumen de 50 ml pasándola a través de un filtro de flujo transversal de 100 kDa y después se centrifugó a 13.200 rpm/20 minutos para precipitar las minicélulas. Se desechó el sobrenadante y el precipitado se

resuspendió en 1 ml de BSG estéril (muestra 11). La endotoxina libre residual se eliminó usando Dynabeads-proteína G conjugada a anticuerpo anti-lípido A como se describe en el ejemplo 4. Esto produjo la muestra 12.

La enumeración de las minicélulas y las células bacterianas se llevó a cabo mediante citometría de flujo como sigue. Cada muestra de un procedimiento de purificación de minicélulas se diluyó apropiadamente para tener aproximadamente de 10^8 a 10^{10} minicélulas y se incubaron 250 μ l de la muestra con colorante fluorescente verde Syto 9 (Molecular Probes, Eugene, OR, EE. UU.) 3,3 μ M. Este colorante atraviesa las membranas intactas y dañadas de las células bacterianas y se une a los ácidos nucleicos endógenos produciendo células bacterianas fluorescentes verdes. En los estudios preliminares se había mostrado que también atraviesa la membrana de minicélulas y produce minicélulas recombinantes fluorescentes verdes. Se contaron todas las muestras en el citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA, EE. UU.) usando el software de adquisición y análisis Cellquest (Becton Dickinson). Se realizaron recuentos durante 30 segundos a velocidad de flujo media con un umbral de 37 V en un disparador "FL1" de fluorescencia verde que detecta entre 515-545 nm. La diferencia de potencial FL1 PMT se ajustó a 550 V. La diferencia de potencial de dispersión ortogonal "SSC" PMT se ajustó a 524 V. La dilución apropiada de la muestra devolvió entre 5000-50000 partículas por 30 segundos y el recuento final de partículas fue una media de 5 repeticiones. Se distinguieron las minicélulas y las células bacterianas en base a sus diferencias en SSC y fluorescencia verde.

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

El recuento de células bacterianas parentales (Fig. 6B) al comienzo del procedimiento era similar al número de minicélulas, es decir, aproximadamente 5×10^{12} bacterias. El proceso de purificación produjo la eliminación de más de 1000 veces de células bacterianas en el momento del tratamiento con antibióticos. En este punto la relación de minicélula:célula bacteriana era más de 100:1 y por lo tanto las medidas de citometría de flujo no pudieron detectar células bacterianas en las muestras analizadas. Después del tratamiento con antibióticos, todas las muestras analizadas mediante ensayo de recuento de placas viables no revelaron la presencia de células bacterianas vivas. El análisis por PCR cuantitativa para la presencia de ADN genómico en la muestra final purificada 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 (Fig. 6C) mostró que al inicio del proceso de purificación la muestra tenía aproximadamente 10^9 unidades de endotoxina (UE). Las UE descendieron hasta aproximadamente 10^6 después del tercer paso de purificación por gradiente (Fig. 6C; muestra 6). Las UE aumentaron de nuevo al incubar la suspensión de minicélulas/células bacterianas en TSB para la filamentación inducida por sal (fig. 6C; muestras 7-9) pero se redujo de 10^4 a 10^5 UE en pasos posteriores de purificación.

Se sabe que en soluciones acuosas, el LPS purificado se pueden encontrar como LPS libre y como micelas ya que el grupo lípido A es hidrofóbico, mientras que el segmento de hidrato de carbono (polisacárido nuclear y O-polisacárido) son hidrofílicos. Esto produce micelas donde el lípido A hidrofóbico está enterrado mientras que el polisacárido hidrofílico interacciona con el entorno acuoso. Se sabe que estas micelas están presentes en una gama de diferentes tamaños moleculares 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 enterrada dentro de la membrana de bicapa y no es una endotoxina. El LPS libre es una endotoxina puesto que el grupo lípido A está disponible para interaccionar con membranas de células de mamífero produciendo serios efectos endotóxicos. No se sabe si las micelas de LPS son endotoxinas *in vivo*.

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

Ejemplo 6

Determinación de los niveles de endotoxina libre en preparaciones purificadas de minicélulas

Para demostrar lo anterior, se realizaron una serie de experimentos adicionales para determinar qué forma de LPS mide realmente el ensayo LAL. La preparación purificada de minicélulas se trató secuencialmente 5 veces para la eliminación de LPS libre usando conjugado Dynabeads-proteína G/anti-lípido A recién preparado y de cada purificación se analizaron las siguientes muestras mediante el ensayo LAL; (a) suspensión purificada de minicélulas que se espere tenga las 3 formas de LPS, es decir, forma libre, micelar y unida a la membrana de la superficie de minicélulas, (b) el conjugado Dynabeads-proteína G/anti-lípido A recuperado que presumiblemente lleva unido LPS en forma libre, (c) el sobrenadante después de la centrifugación de la suspensión de minicélulas a 13.200 rpm/20 minutos después del tratamiento con Dynabeads-proteína G/anti-lípido A. Esta presumiblemente lleva la forma micelar de LPS ya que la forma libre se debe eliminar por el anti-lípido A y el LPS unido a minicélulas se debe encontrar en el precipitado de minicélulas, (d) el precipitado de (c) que se resuspendió en BSG estéril sin pirógeno. También se incluyeron una

serie de controles, por ejemplo, LPS purificado de *S. typhimurium* (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EE. UU.) tratado con conjugado Dynabeads-proteína G/anti-lípido A para confirmar que el anticuerpo anti-lípido A se unió y eliminó la forma libre de LPS, muestras de diluyente para asegurar que los diluyentes no contribuyen a las UE observadas, etc.

Los resultados mostraron (tabla 1, a continuación) que como se esperaba, la mayoría de las UE que mide el ensayo LAL se asocian con el LPS unido a la membrana de la superficie de las minicélulas (columna D) que no es una endotoxina como se ve en los estudios *in vivo* en el ejemplo 7. Este resultado es similar al visto en la figura 6C (muestra 12). El sobrenadante (columna C) también tenía una cantidad significativa de UE y presumiblemente esta es la forma micelar de LPS ya que cada muestra se había procesado previamente con el conjugado Dynabeads-proteína G/anti-lípido A. El resultado interesante se vio en la columna B que mostró que cada vez que se lleva a cabo el tratamiento con anti-lípido A, las únicas cantidades de forma libre de LPS que se pudieron encontrar en la preparación purificada de minicélulas estaba entre 20 UE a 45 UE. Este valor es mucho menor que los estándares actuales de endotoxina para liberación de lotes de fármacos parenterales que es de 350 UE/dosis (Grandics, 2000).

TABLA 1

	A	B	C	D
Muestra	Suspensión de minicélulas	Dynabeads-proteína G/anti-lípido A recuperado	Sobrenadante después de precipitar las minicélulas por centrifugación	Precipitado de minicélulas resuspendido
	UE/ml de la solución original			
Después del 1 ^{er} proceso de eliminación de endotoxina libre	15.560	43,8	3.490	9.910
Después del 2 ^o proceso de eliminación de endotoxina libre	18.910	35,1	2.250	16.940
Después del 3 ^{er} proceso de eliminación de endotoxina libre	26.920	19,0	2.143	10.900
Después del 4 ^o proceso de eliminación de endotoxina libre	20.230	25,2	1.870	11.620
Después del 5 ^o proceso de eliminación de endotoxina libre	15.400	27,8	1.361	15.080

Ejemplo 7

Confirmación in vivo de que las minicélulas purificadas tienen niveles insignificantes de endotoxina

Las preparaciones purificadas de minicélulas se trataron secuencialmente (3 veces) para la eliminación de la endotoxina usando el procedimiento del conjugado Dynabeads-proteína G/anti-lípido A descrito anteriormente. Cada una de las preparaciones que tenía 10⁹ minicélulas purificadas, es decir, antes de la eliminación de endotoxina, y después del primer, segundo y tercer paso de eliminación de endotoxina, se inyectó en la vena de la cola de ratones desnudos atímicos hembras de 6 semanas de edad (5 ratones por grupo). Los ratones usados en este ejemplo se adquirieron del Centro de recursos animales, Perth, WA, Australia, y todos los experimentos con animales se realizaron de acuerdo 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 las instalaciones para animales pequeños acreditadas por Agricultura de NSW en EnGeneIC Pty Ltd (Sídney, NSW, Australia). Los ratones se observaron cuidadosamente durante un periodo de 4 semanas para registrar cualquier signo de choque por endotoxina, por ejemplo, fiebre, letargia, pérdida de apetito y peso y muerte posterior. Los resultados mostraron que sin el procedimiento de eliminación de endotoxina la mayoría de los ratones rápidamente desarrollaron fiebre y estaban letárgicos en las primeras 12 horas. La mayoría de los animales murieron en dos semanas. Los ratones que recibieron minicélulas después del primer procedimiento de eliminación de endotoxina fueron más estables y mostraron fiebre leve durante las primeras 24 horas. Sin embargo, los ratones se recuperaron después de 3 días. Los ratones que recibieron minicélulas purificadas que se habían sometido a dos y tres rondas de eliminación de endotoxina no mostraron efectos secundarios negativos y permanecieron sanos. Esto sugiere que el nuevo paso de eliminación de la endotoxina libre era esencial si las minicélulas se van a utilizar 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 Adelaida, Australia (1987).

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

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

De Boer 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 parenteral pharmaceuticals. *Pharmaceutical Technology*. (2000).

Frazer & 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 & 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 FlhM-FlhN 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/IB302/04632. Intact minicells as vectors for DNA transfer and gene therapy *in vitro* and *in vivo*.

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

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

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

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

ES 2 342 830 T3

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

Stewart & D’Ari, “Genetic and morphological characterization of an *Escherichia coli* chromosome segregation mutant”, *J. Bacteriol.* 174: 4513 (1992).

Wachi *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. Un método de purificación que comprende someter una muestra enriquecida en minicélulas a una condición que induce que las células bacterianas parentales adopten una forma filamentosas y después filtrar dicha muestra, produciendo una composición purificada de minicélulas.
2. Un método según la reivindicación 1, en donde dicha condición es una condición osmótica, una condición anaeróbica o una condición de limitación de nutrientes, que inducen estrés.
3. Un método según la reivindicación 1, en donde dicha muestra se incuba en un medio hipertónico.
4. Un método según la reivindicación 1, en donde el paso de filtración es una filtración frontal con un filtro que emplea un tamaño de poro de alrededor de 0,45 μm .
5. Un método según la reivindicación 1, en donde el paso de filtración emplea un filtro que tiene un tamaño de poro lo suficientemente pequeño para permitir que las minicélulas pasen a través de los poros, pero no las células bacterianas parentales filamentosas.
6. Un método según la reivindicación 1, en donde el paso de filtración comprende filtración de flujo transversal.
7. Un método según la reivindicación 1, en donde el paso de filtración comprende un proceso de filtración en serie que combina filtración de flujo transversal y filtración frontal.
8. Un método según la reivindicación 7, en donde el paso de filtración emplea al menos un filtro que emplea un tamaño de poro menor que o igual a alrededor de 0,2 μm .
9. Un método según la reivindicación 7, en donde el paso de filtración emplea al menos un filtro que emplea un tamaño de poro mayor que o igual a alrededor de 0,45 μm .
10. Un método según la reivindicación 7, en donde dicho proceso de filtración en serie está precedido por centrifugación diferencial.
11. Un método según la reivindicación 1, en donde el paso de filtración emplea al menos un filtro que emplea un tamaño de poro menor que o igual a alrededor de 0,2 μm .
12. Un método según la reivindicación 1, en donde el paso de filtración emplea al menos un filtro que emplea un tamaño de poro mayor que o igual a alrededor de 0,45 μm .
13. Un método según la reivindicación 1, que además comprende un paso de someter las minicélulas a centrifugación en gradiente de densidad.
14. Un método según la reivindicación 13, que además comprende un paso de someter las minicélulas a centrifugación diferencial.
15. Un método según la reivindicación 13, en donde dicho medio es isotónico y no tóxico.
16. Un método según la reivindicación 13, en donde dicho medio consiste esencialmente en yodixanol y agua.
17. Un método según la reivindicación 1, que además comprende un paso de tratar dicha composición purificada de minicélulas con un antibiótico.
18. Un método según la reivindicación 1, que comprende además un paso de eliminar la endotoxina libre de dicha composición purificada de minicélulas.
19. Un método según la reivindicación 18, en donde dicho paso de eliminar la endotoxina libre emplea anticuerpos anti-lípido A.
20. Una preparación purificada de minicélulas, obtenible según el método de la reivindicación 1, que contiene menos de alrededor de 1 célula bacteriana parental contaminante por 10^{10} minicélulas, en donde el paso de filtración de dicho método comprende un proceso de filtración en serie que combina filtración de flujo transversal y filtración frontal, en donde dicho proceso de filtración en serie está precedido por centrifugación diferencial y dicho método comprende además un paso de someter las minicélulas a centrifugación en gradiente de densidad.
21. Una preparación purificada de minicélulas, obtenible según el método de la reivindicación 1, que contiene menos de alrededor de 1 célula bacteriana parental contaminante por 10^{11} minicélulas, en donde el paso de filtración de dicho método comprende un proceso de filtración en serie que combina filtración de flujo transversal y filtración frontal, en donde dicho proceso de filtración en serie está precedido por centrifugación diferencial y dicho método comprende además un paso de someter las minicélulas a centrifugación en gradiente de densidad.

FIGURA 1

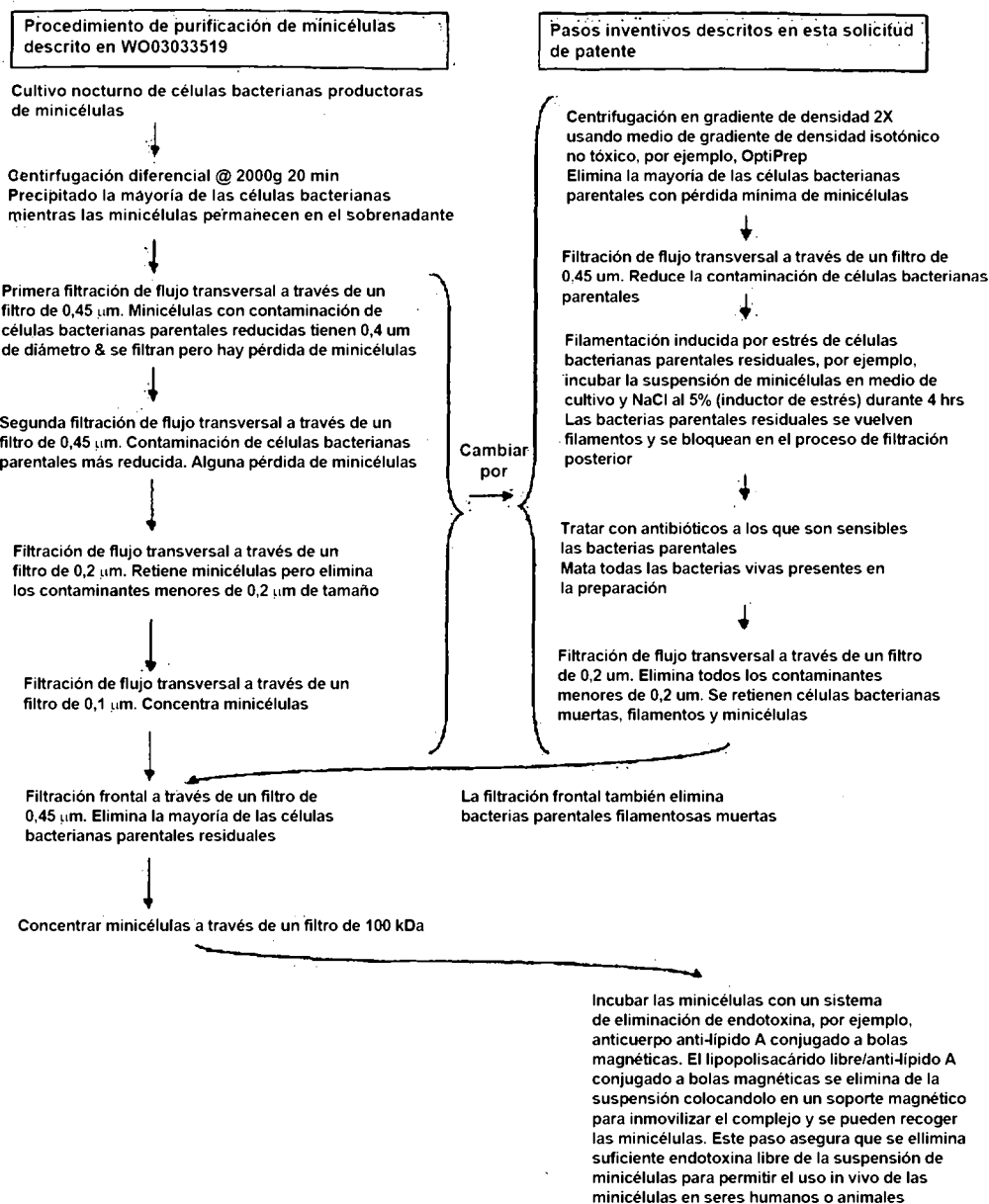


Figura 2

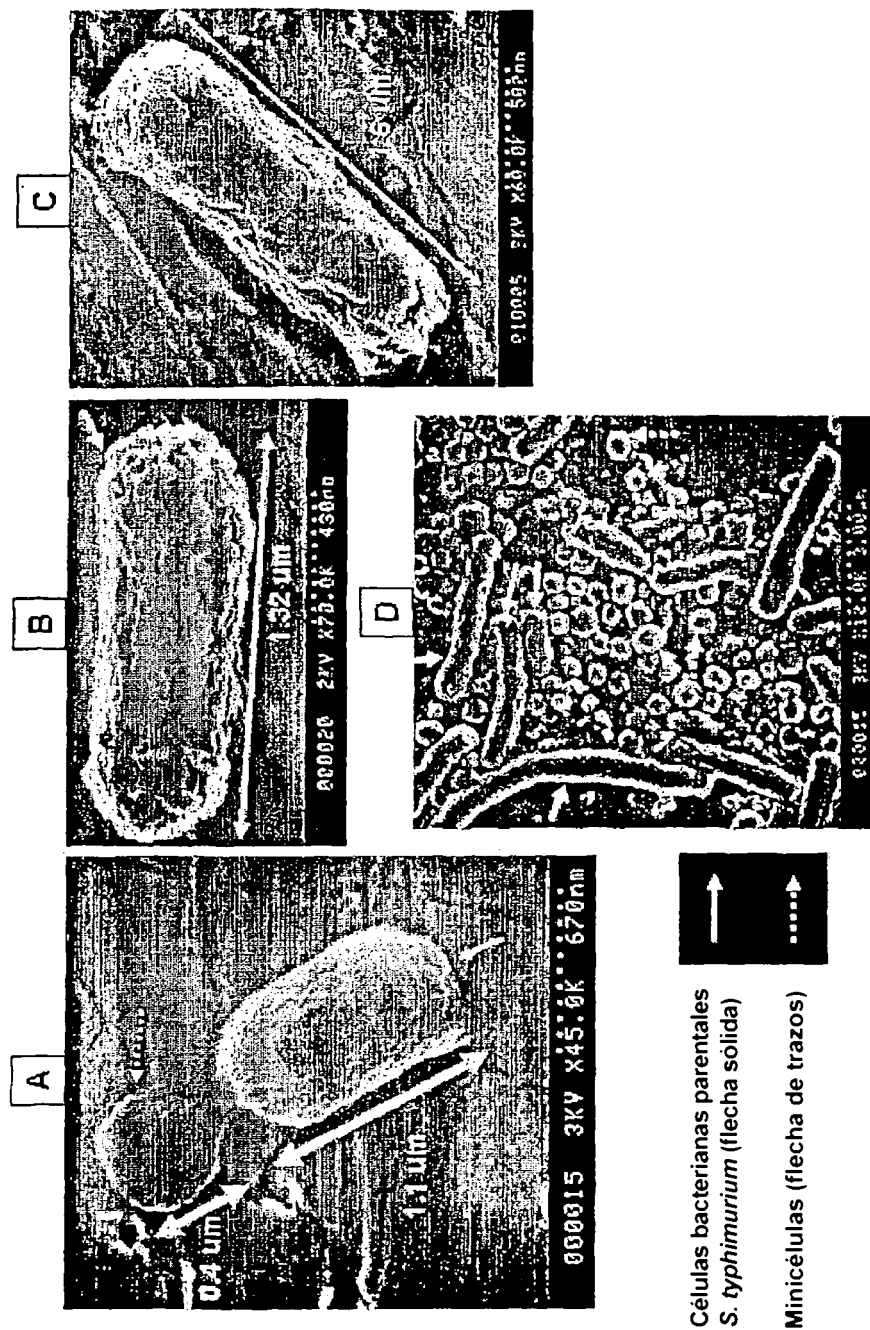


Figura 3A

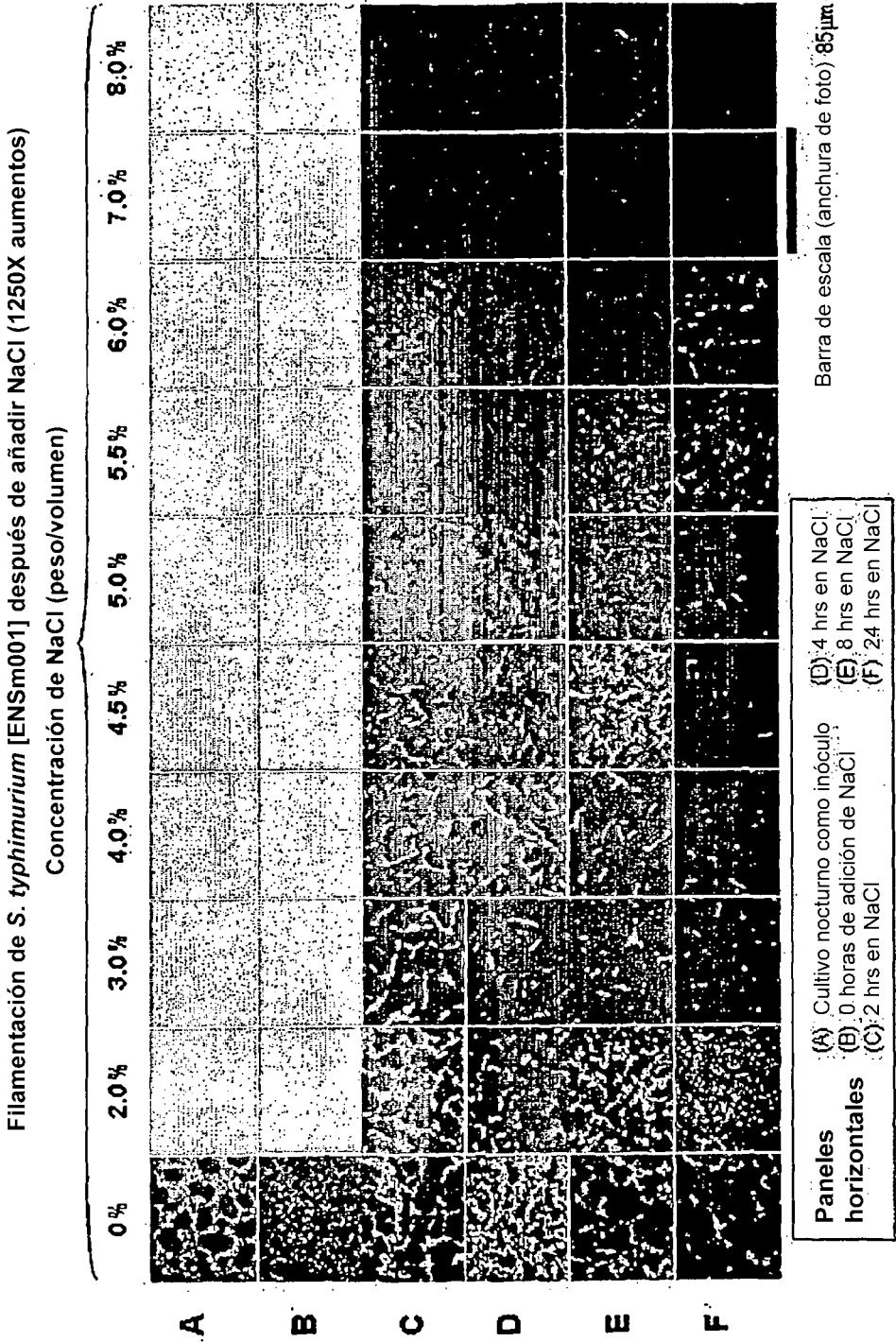
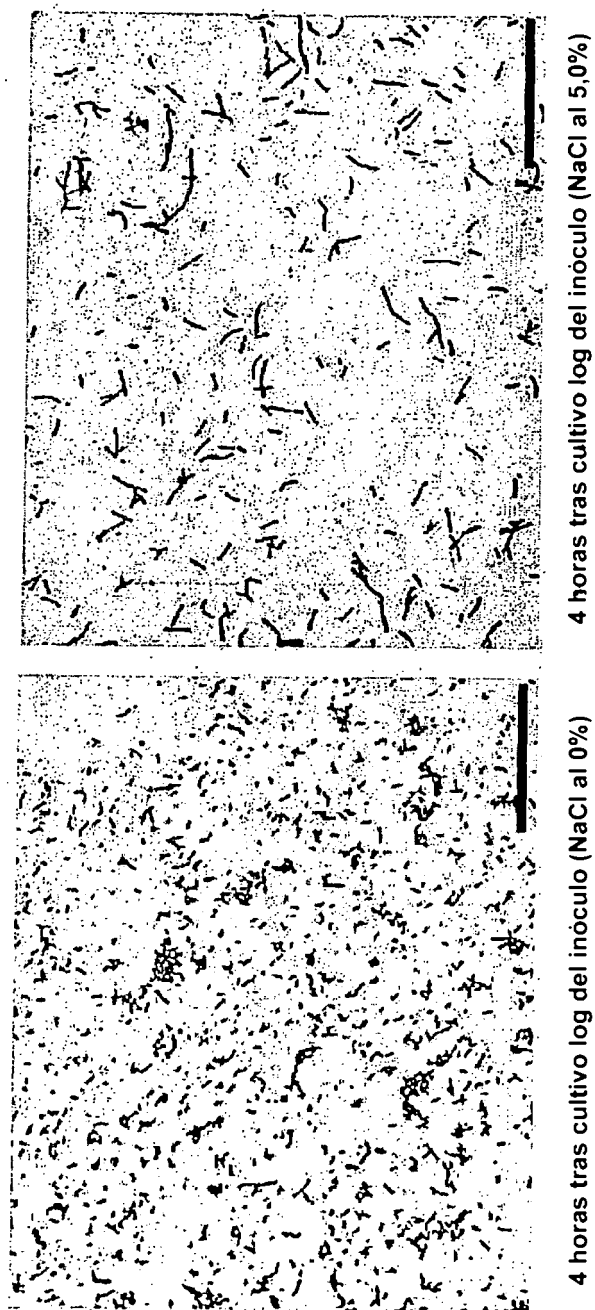


Figura 3B

Filamentación inducida por sal en *Salmonella typhimurium* ENSm026



Barra de escala 50µm

Figura 4A

Filamentación de *E. coli* tras añadir NaCl (1250X aumentos)
Concentración de NaCl (peso/volumen)

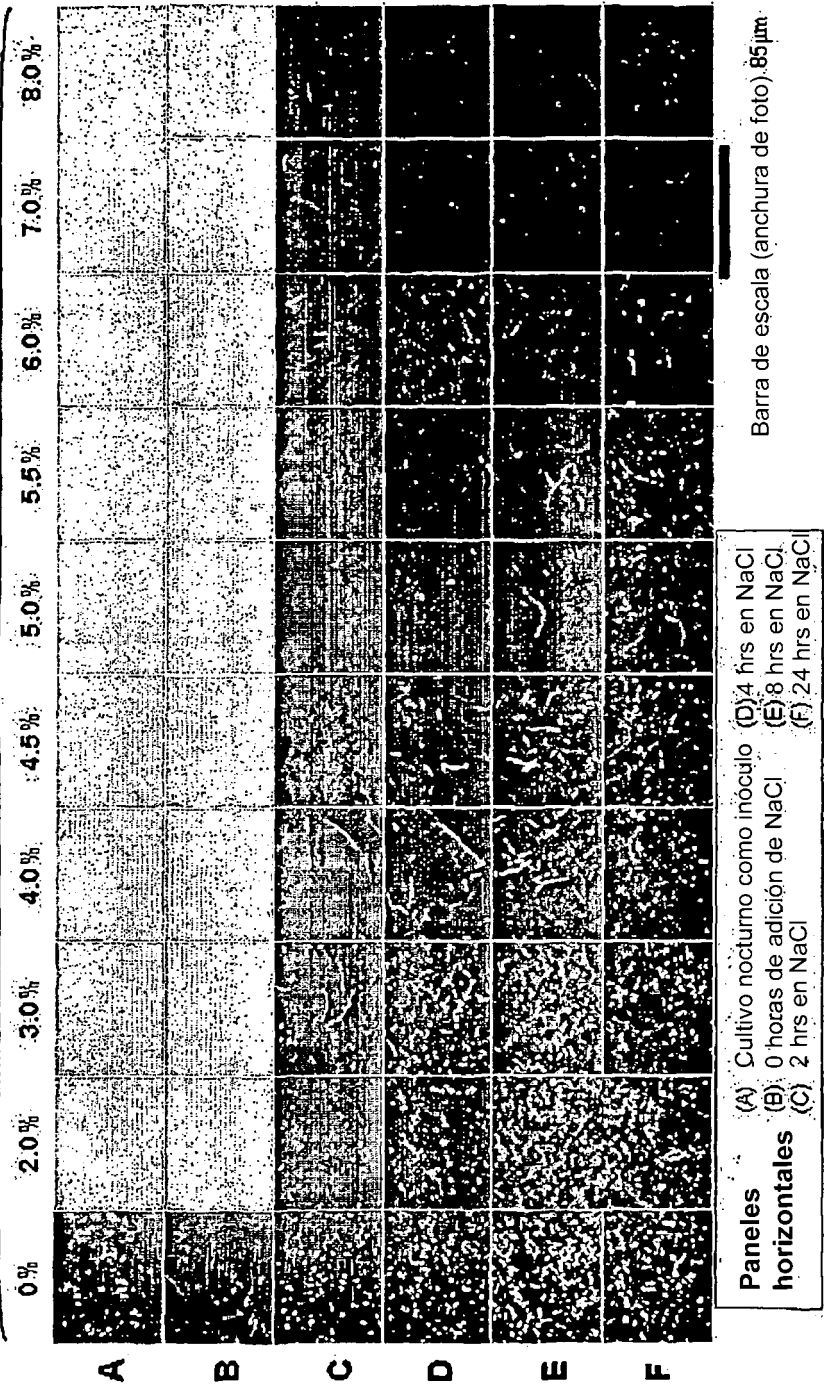
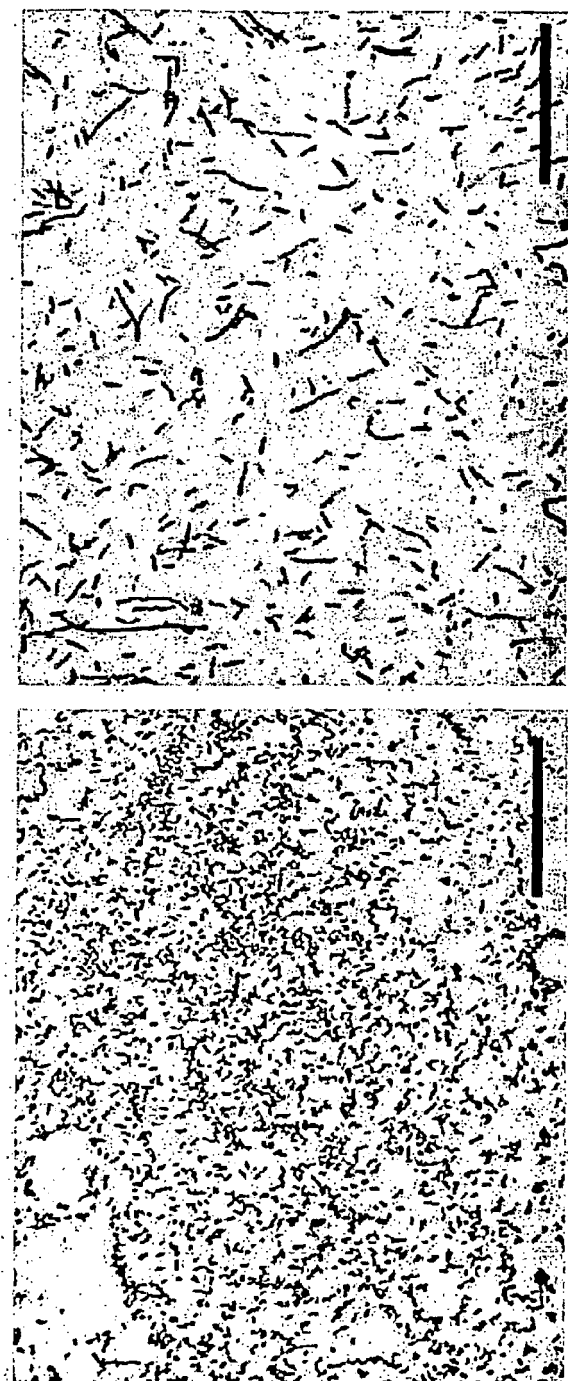


Figura 4B

Filamentación inducida por sal en *E. coli*



4 horas tras cultivo log del inóculo (NaCl al 0%)

4 horas tras cultivo log del inóculo (NaCl al 5.0%)

Barra de escala 50 μm

Figura 5

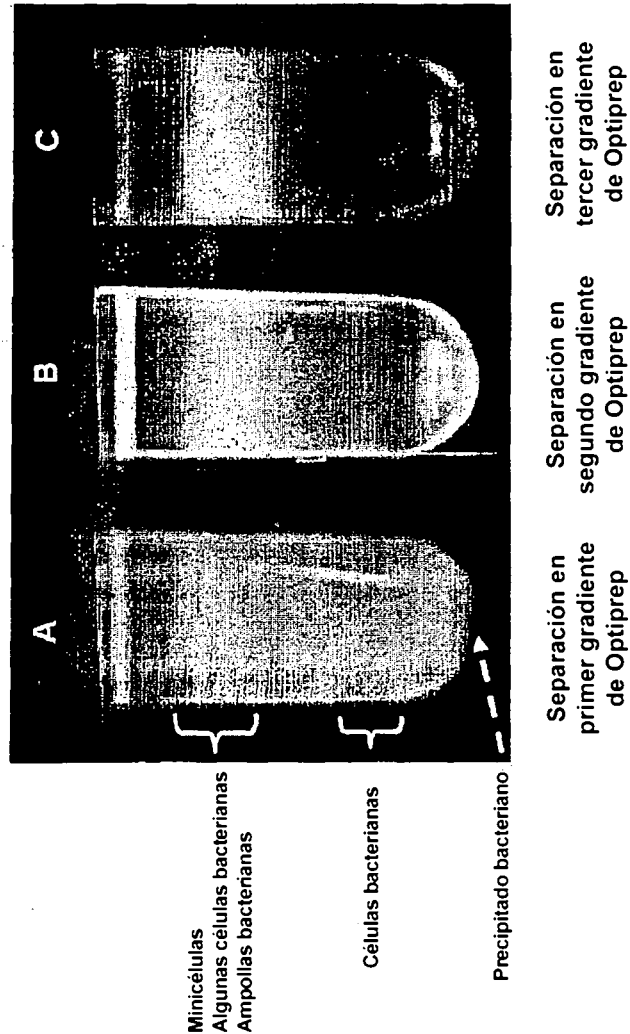
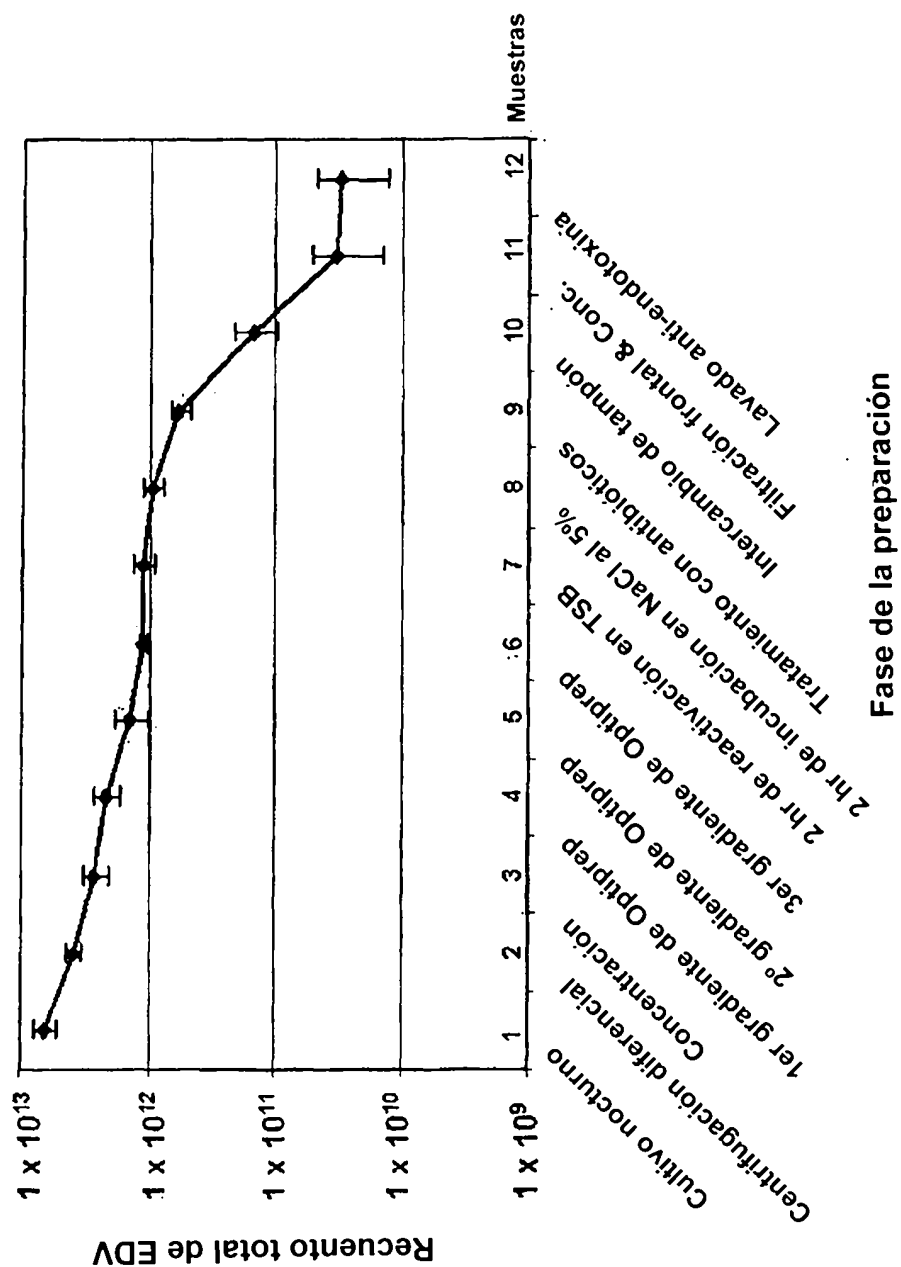


Figura 6A

Recuento total de micicélulas intactas en cada fase del procedimiento de purificación de micicélulas



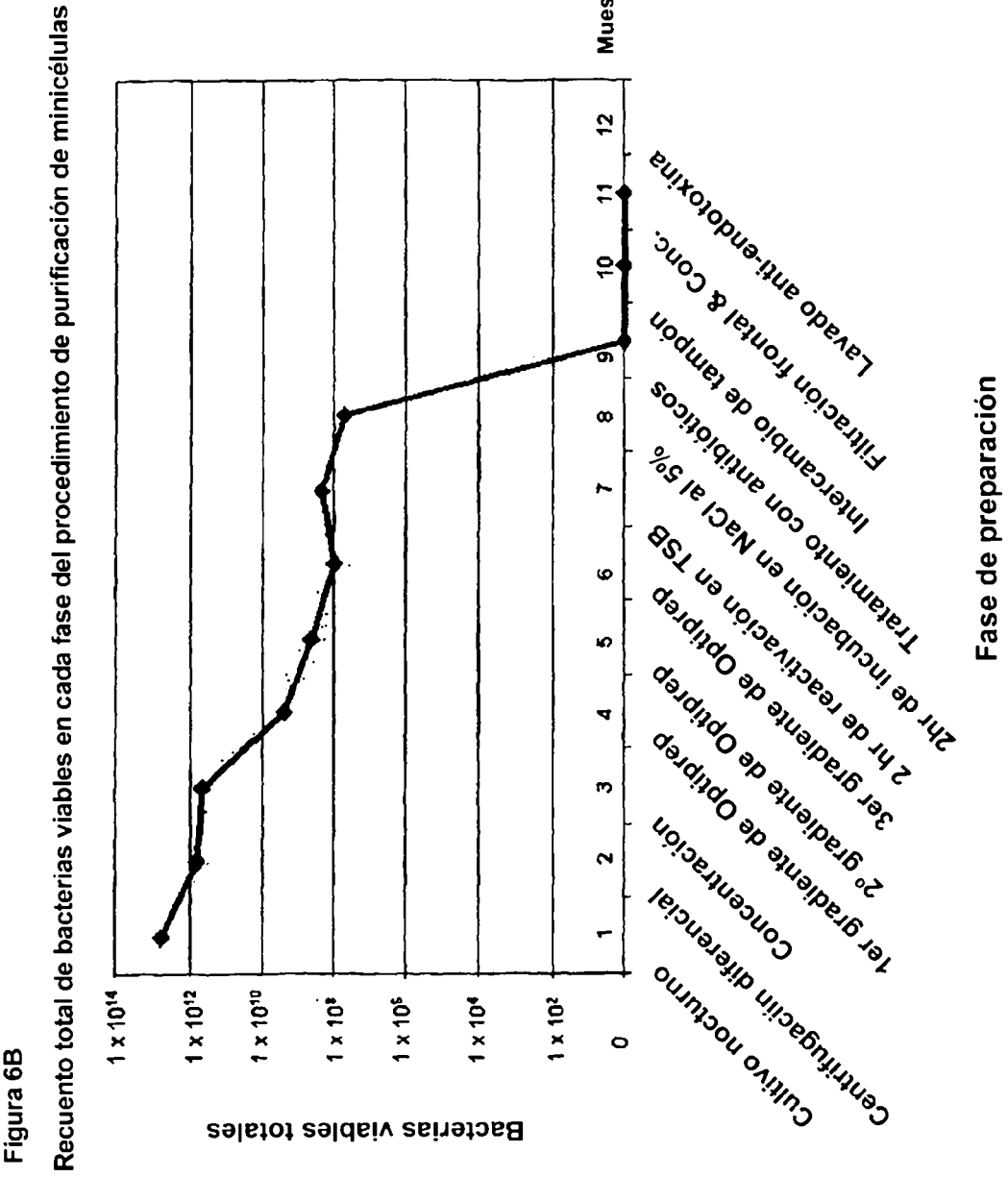


Figura 6C Endotoxina total (UE) en cada fase del procedimiento de purificación de minicélulas

