

Reivindicaciones

1. Un método para suministrar una carga a una célula objetivo, el método comprende:

- 5 (a) proporcionar una composición que comprende una pluralidad de sistemas activos dinámicos acromosómicos altamente activos (ADAS), en donde los ADAS tienen una concentración inicial de ATP de al menos 1,25 mM, los ADAS comprenden una carga, y la composición está sustancialmente libre de células bacterianas viables; y
- 10 (b) poner en contacto la célula objetivo con la composición de la etapa (a) para suministrar la carga a la célula objetivo.

2. El método de la reivindicación 1, en el que la célula diana es una célula animal, una célula vegetal o una célula de insecto.

15

3. El método de las reivindicaciones 1 o 2, en el que la carga es un ácido nucleico, un plásmido, un polipéptido, una proteína, una enzima, un aminoácido, una molécula pequeña, un sistema de edición de genes, una hormona, un inmunomodulador, un carbohidrato, un lípido, una partícula orgánica, una partícula inorgánica o un complejo de ribonucleoproteína (RNP).

20

4. El método de la reivindicación 1, en el que la carga incluye una proteína heteróloga codificada por un plásmido en el ADAS.

25

5. El método de la reivindicación 1, en el que los ADAS se deriva de bacterias madre que comprenden un factor de especificidad topológica de división celular, y en el que las bacterias madre son *Escherichia*, *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Anabaena*, *Aquifex*, *Azoarcus*, *Azotobacter*, *Bordetella*, *Bradyrhizobium*, *Brucella*, *Buchnera*, *Burkholderia*, *Candidatus*, *Chromobacterium*, *Crocospaera*, *Dechloromonas*, *Desulfotobacterium*, *Desulfotalea*,
30 *Erwinia*, *Francisella*, *Fusobacterium*, *Gloeobacter*, *Gluconobacter*, *Helicobacter*, *Legionella*, *Magnetospirillum*, *Mesorhizobium*, *Methylococcus*, *Neisseria*, *Nitrosomonas*, *Nostoc*, *Photobacterium*, *Photorhabdus*, *Polaromonas*, *Prochlorococcus*, *Pseudomonas*, *Psychrobacter*, *Ralstonia*, *Rubrivivax*, *Salmonella*, *Shewanella*, *Shigella*, *Sinorhizobium*, *Synechococcus*, *Synechocystis*, *Thermosynechococcus*, *Thermotoga*, *Thermus*, *Thiobacillus*,
35 *Trichodesmium*, *Vibrio*, *Wigglesworthia*, *Wolinella*, *Xanthomonas*, *Xylella*, *Yersinia*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Deinococcus*, *Exiguobacterium*, *Geobacillus*, *Lactobacillus*, *Lactobacillus*, *Moorella*, *Oceanobacillus*, *Symbiobacterium*, o bacterias

Thermoanaerobacter y el factor de especificidad topológica de división celular es el minE endógeno o DivIVA de la bacteria original.

- 5 6. El método de la reivindicación 1, en el que proporcionar incluye reconstituir ADAS previamente liofilizado.
- 10 7. El método de la reivindicación 6, en el que los ADAS reconstituidos tienen una concentración de ATP que es al menos el 95 % de la concentración de ATP de un ADAS que no ha sido liofilizado.
8. El método de la reivindicación 1, en el que los ADAS tienen una concentración inicial de ATP de al menos 1.3 nM, 1.4 mM, 1.5 mM, 1.6 mM, 2 mM, 2.5 mM, 3 mM, 4 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM, 30 mM o 50 mM.
- 15 9. Un método para fabricar una composición que comprende una pluralidad de sistemas activos dinámicos acromosómicos altamente activos (ADAS), en el que la composición está sustancialmente libre de células bacterianas viables, el método comprende:
- 20 (a) fabricar, proporcionar u obtener una pluralidad de bacterias madre que tienen una reducción en el nivel o actividad de un factor de especificidad topológica de división celular, en el que la reducción incluye una reducción en la expresión de minE y al menos uno de un polipéptido minC o un polipéptido minD;
- 25 (b) exponer las bacterias originales a condiciones que permitan la formación de minicélulas;
- y
- 30 (c) separar las minicélulas de las bacterias originales, produciendo así una composición que comprende una pluralidad de ADAS que está sustancialmente libre de células bacterianas viables.
10. El método de la reivindicación 9, en el que la concentración de ATP del ADAS aumenta después de la incubación a 37 °C durante 12 horas.
- 35 11. El método de la reivindicación 9, en el que la bacteria original tiene una delección del operón minCDE.

12. El método de la reivindicación 9, en el que las bacterias madre son *Escherichia*, *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Anabaena*, *Aquifex*, *Azoarcus*, *Azotobacter*, *Bordetella*, *Bradyrhizobium*, *Brucella*, *Buchnera*, *Burkholderia*, *Candidatus*, *Chromobacterium*, *Crocospaera*, *Dechloromonas*, *Desulfitobacterium*, *Desulfotalea*, *Erwinia*, *Francisella*,
5 *Fusobacterium*, *Gloeobacter*, *Gluconobacter*, *Helicobacter*, *Legionella*, *Magnetospirillum*, *Mesorhizobium*, *Methylococcus*, *Neisseria*, *Nitrosomonas*, *Nostoc*, *Photobacterium*, *Photorhabdus*, *Polaromonas*, *Prochlorococcus*, *Pseudomonas*, *Psychrobacter*, *Ralstonia*, *Rubrivivax*, *Salmonella*, *Shewanella*, *Shigella*, *Sinorhizobium*, *Synechococcus*, *Synechocystis*, *Thermosynechococcus*, *Thermotoga*, *Thermus*, *Thiobacillus*, *Trichodesmium*,
10 *Vibrio*, *Wigglesworthia*, *Wolinella*, *Xanthomonas*, *Xylella*, *Yersinia*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Deinococcus*, *Exiguobacterium*, *Geobacillus*, *Lactobacillus*, *Lactobacillus*, *Moorella*, *Oceanobacillus*, *Symbiobacterium*, o bacterias *Thermoanaerobacter*
13. Una composición que comprende una pluralidad de sistemas activos dinámicos
15 acromosómicos (ADAS) altamente activos,
- en el que los ADAS tienen una concentración inicial de ATP de al menos 1 mM,
- en el que la composición está sustancialmente libre de células bacterianas viables,
20 en el que los ADAS se derivan de bacterias precursoras que tienen una reducción en la expresión de un polipéptido minE y al menos uno de un polipéptido minC y un polipéptido minD, y
- 25 en las que la concentración de ATP de ADAS aumenta después de la incubación a 37 °C durante 12 horas.
14. La composición de la reivindicación 13, donde los ADAS comprenden una carga que incluye al menos uno de un ácido nucleico, un plásmido, un polipéptido, una proteína, una
30 enzima, un aminoácido, una molécula pequeña, un sistema de edición de genes, una hormona, un inmunomodulador, un carbohidrato, un lípido, una partícula orgánica, una partícula inorgánica y un complejo ribonucleoproteico (RNP).
15. La composición de la reivindicación 13, en el que la carga se expresa en el ADAS.
35
16. La composición de la reivindicación 13, en la que la bacteria madre tiene una delección del operón minCDE.