



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 362 881**

51 Int. Cl.:
A61K 48/00 (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04806560 .1**
96 Fecha de presentación : **08.12.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1694361**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **30.08.2006**

54 Título: **Administración génica dirigida a células de mamífero no fagocíticas a través de minicélulas intactas obtenidas de bacterias.**

30 Prioridad: **09.12.2003 US 527764 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
14.07.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
14.07.2011

73 Titular/es:
ENGINEIC 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: **Carpintero López, Mario**

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

Administración génica dirigida a células de mamífero no fagocíticas a través de minicélulas intactas obtenidas de bacterias

Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

- 5 La presente solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la Solicitud Provisional de los Estados Unidos Nº 60/527.764, presentada el 9 de diciembre de 2003.

Antecedentes de la invención

- 10 La presente invención se refiere a procedimientos y a composiciones para dirigir vectores minicelulares bacterianos a células huésped no fagocíticas, particularmente pero no exclusivamente en el contexto de terapia génica. La invención emplea moléculas biespecíficas que se unen específicamente tanto a una estructura de superficie de minicélula como a una estructura de superficie de célula huésped, tal como un receptor. Mediando una interacción entre los vectores de minicélula y las células huésped no fagocíticas, los ligandos biespecíficos permiten la administración dirigida de oligonucleótidos y polinucleótidos a las células huésped.

- 15 El objetivo de la terapia génica es insertar uno o más genes ajenos en las células de un organismo para inactivar un gen, reemplazar un gen defectuoso o expresar un producto génico que proporciona un efecto profiláctico o terapéutico. Avances recientes en terapia génica han destacado una diversidad de métodos para introducir genes ajenos en el genoma de animales receptores. Véase, Romano y col. 1998, 1999; Balicki y Beutler, 2002; Wadhwa y col., 2002; y Thomas y col., 2003. Estos avances se refieren al uso de vectores virales, tanto humanos como no humanos y vectores no virales, tales como complejos de ADN-liposoma.

- 20 Aunque cada sistema de vector tiene sus ventajas, cada uno tiene también inconvenientes significativos que han limitado cualquier aplicación clínica. En particular, los vectores virales plantean preocupaciones de seguridad graves, incluyendo la recombinación con virus de tipo silvestre, potencial de inserción y oncogénico, toxicidad intrínseca de vectores de virus animales a células de mamífero, inmunosupresión inducida por virus, inversión a virulencia de virus atenuados y reacciones secundarias tales como una respuesta inflamatoria provocada por inmunidad existente. Los vectores virales también presentan problemas prácticos, tales como dificultades en la preparación y distribución de virus recombinantes, estabilidad baja y capacidad limitada de los vectores de portar grandes cantidades de ADN exógeno. Los vectores no virales tienen los inconvenientes de ser generalmente menos eficaces en la administración génica.

- 30 Abordando estos inconvenientes, el documento PCT/IB02/04632 ha descrito minicélulas intactas recombinantes que contienen moléculas de ácido nucleico terapéuticas. Tales minicélulas son vectores eficaces para administrar oligonucleótidos y polinucleótidos a células huésped *in vitro* e *in vivo*. El documento PCT/IB02/04632 ha demostrado, por ejemplo que minicélulas recombinantes que portan plásmidos de expresión de genes de mamífero se podrían administrar a células fagocíticas, tales como macrófagos y a células no fagocíticas, ilustradas por células de cáncer mamario humano. La solicitud también demostró que la administración intraperitoneal de las minicélulas recombinantes dio como resultado la administración de plásmidos recombinantes a células fagocíticas del sistema inmune y que se pudo provocar una respuesta de anticuerpo en suero a la proteína codificada.

- 40 Aunque la eficacia de la administración génica a células fagocíticas a través de minicélulas es elevada (40-60%), la eficacia de administración génica a células no fagocíticas hasta ahora ha sido comparativamente baja (3% al 5%). Se esperaría que esto limite gravemente las aplicaciones clínicas, debido a que muchas indicaciones potenciales para terapia génica implican células endoteliales y otras células no fagocíticas. La mayoría de los cánceres, por ejemplo, no son de células fagocíticas y no se podría esperar que los vectores que carecen de especificidad de célula o de órgano pudieran emplearse eficazmente para tratar tales cánceres.

- 45 Una carencia de especificidad similar también ha obstaculizado la aplicación de vectores de no minicélula y diversos enfoques se están desarrollando para abordar este problema. Véase, Wickham, 2003. Un enfoque aprovecha el sistema de endocitosis mediado por receptor (EMR), presente en muchos tipos celulares e implica el desarrollo de un conjunto diverso de ligandos de dirección. En este enfoque, la especificidad de célula se imparte al vector enlazando al mismo un ligando que se dirige a un receptor o marcador en la superficie celular específico. A continuación de la unión específica, el sistema de EMR de células diana se activa y el complejo vector/receptor se internaliza y se digiere, transportándose algo de la carga útil de ADN al núcleo para expresión génica. Algunos receptores celulares pueden ser capaces de facilitar la captación de vector en el citoplasma directamente a través de la membrana plasmática (Fernandez y Bailey, 1998; Phelan y col., 1998; Rojas y col., 1998), pero la vía más común para la captación mediada por receptor de restos macromoleculares es la ruta de tráfico endocítico (Conner y Schmid, 2003).

- 55 Existen varios desafíos con respecto a la administración génica dirigida a células de mamífero no fagocíticas: (i) traspasar la membrana plasmática de las células de mamífero; (ii) explotar un mecanismo de administración de internalización de vector; (iii) seleccionar y comprender la naturaleza de ligandos de dirección usados para dirigirse a receptores de superficie de células de mamífero específicos; (iv) conseguir la degradación intracelular del vector de

administración sin la degradación completa de la carga útil de ADN; y (v) obtener la liberación y el transporte de la carga útil de ADN al citoplasma o núcleo de la célula de mamífero. Estos desafíos varían en algún grado con cada vector de administración génica. A pesar de la investigación exhaustiva en el campo, el conocimiento detallado de los procedimientos biológicos implicados es aún rudimentario.

- 5 La dirección basada en ligando de células bacterianas o cualquier partícula de origen bacteriano hacia células no fagocíticas no se ha informado, probablemente debido a que (a) únicamente los patógenos intracelulares bacterianos vivos pueden entrar en células no fagocíticas, aunque esto se consiga mediante un procedimiento de invasión activo (es decir, la entrada en células no fagocíticas se cree que es un procedimiento de invasión activo que requiere un procedimiento activado por energía multicomponente realizado por patógenos bacterianos vivos) y (b) la invasión celular activa anularía un procedimiento pasivo tal como endocitosis mediada por receptor basada en ligando. Por tanto, las células bacterianas muertas no participarían en invasión celular activa y las células bacterianas vivas no se dirigirían, al contrario de su tropismo natural, hacia células no fagocíticas deseadas. Incluso si la dirección basada en ligando se empleara para posibilitar la endocitosis de células bacterianas muertas o partículas no vivas de origen bacteriano, el procedimiento no se esperaría que fuera eficaz para administración génica. En lugar de ello, se esperaría que los endosomas degradaran las células no vivas o partículas, haciéndolas ineficaces como vectores de administración génica. A este respecto, actualmente se piensa que únicamente las bacterias patógenas intracelulares facultativas vivas pueden expresar proteínas que permiten el escape de la membrana endosómica.

- 20 Hasta la fecha, no existe una metodología probada para dirigir eficazmente vectores de minicélulas bacterianas a células huésped de mamífero no fagocíticas, para administrar de ese modo una carga útil de genes. Aunque se conoce una diversidad de tecnologías de dirección de vector, el adoptar sencillamente cualquiera de ellas no da como resultado predecible una administración génica dirigida por minicélula satisfactoria. Esto se debe a la variedad de factores biológicos, únicos para cada vector de administración génica, que pueden influir en la administración génica dirigida

- 25 Por lo tanto, existe una necesidad de un procedimiento para dirigir específicamente vectores de minicélulas bacterianos a células de mamífero no fagocíticas.

Sumario de la invención

Para abordar éstas y otras necesidades, la presente invención proporciona, de acuerdo con un aspecto,

- 30 una composición que comprende (i) minicélulas obtenidas de bacterias que contienen un ácido nucleico terapéutico y (ii) ligandos biespecíficos que son capaces de unirse a un componente de superficie de las minicélulas y a un componente de superficie de una célula de mamífero no fagocítica, en la que dicho ligando biespecífico tiene especificidad por un receptor de superficie de célula de mamífero capaz de activar endocitosis mediada por receptor.

- En otro aspecto adicional, la invención proporciona el uso de la composición en la preparación de un medicamento para uso en un procedimiento para tratar una enfermedad o modificar un rasgo mediante la administración del medicamento a una célula, tejido u órgano. Tales medicamentos son útiles para tratar diversas afecciones y enfermedades aumentando la expresión o función de una proteína deseada o inhibiendo la expresión o función de una proteína diana. La enfermedad que se ha de tratar en este contexto puede ser un cáncer, por ejemplo, o una enfermedad adquirida, tal como SIDA, neumonía, enfisema o una afección engendrada por un error innato del metabolismo, tal como fibrosis quística. Como alternativa, el tratamiento puede influir en un rasgo, tal como fertilidad o una respuesta inmune asociada con un alérgeno o un agente infeccioso.

Breve descripción de los dibujos

- La **Figura 1** muestra internalización eficaz de minicélulas recombinantes dirigidas a receptor de andrógenos humano, al contrario de minicélulas no dirigidas, en células LNCaP de carcinoma de próstata humano. Los procedimientos se realizaron como se ha descrito en el Ejemplo 1 y los resultados se visualizaron mediante microscopía confocal. Se realizó tinción de inmunofluorescencia para todas las imágenes mostradas con anticuerpo monoclonal específico anti-LPS de *S. typhimurium*, seguido por anticuerpo anti-IgG de ratón (H+L) de cabra conjugado con Alexa Fluor 594. Cada figura se muestra como una superposición de imágenes de Contraste de Interferencia Diferencial (CID) y fluorescencia roja. **(A)** Células LNCaP de control no transfectadas con minicélulas. No se observó fluorescencia roja a continuación de la tinción para LPS de *S. typhimurium*. **(B)** Células LNCaP transfectadas con minicélulas no dirigidas y teñidas después de 16 h de co-incubación. Se observaron muy pocos puntos de fluorescencia roja de fondo. **(C)** Células LNCaP transfectadas con minicélulas dirigidas y teñidas después de 16 h. La mayoría de las células mostraron fluorescencia roja en el citoplasma, revelada en la imagen en blanco y negro como gris claro. **(D)** Células LNCaP transfectadas con minicélulas no dirigidas y teñidas después de 24 h de co-incubación. Se observaron muy pocos puntos de fluorescencia rojos de fondo. **(E)** Células LNCaP transfectadas con minicélulas dirigidas y teñidas después de 24 h. El resultado mostró fluorescencia roja intensa en el citoplasma de la mayoría de las células (gris claro en la imagen), **(F)** Igual que (E) pero a un aumento mayor para mostrar una célula transfectada única. Casi todo el citoplasma mostró fluorescencia roja (gris claro). Se muestran barras de escala para cada imagen.

La Figura 2 muestra internalización eficaz de minicélulas recombinantes dirigidas al receptor de EGF, frente a minicélulas no dirigidas, en células MDA-MB-468 de cáncer mamario humano. Los procedimientos se realizaron como se ha descrito en el Ejemplo 2 y los resultados se visualizaron mediante microscopía confocal. Se realizó tinción de inmunofluorescencia para todas las imágenes mostradas con anticuerpo monoclonal específico anti-LPS de *S. typhimurium*, seguido por anticuerpo anti-IgG de ratón (H+L) de cabra conjugado con Alexa Fluor 594. Cada imagen se muestra como una superposición de imágenes de CID y fluorescencia roja. **(A)** Células MDA-MB-468 de control no transfectadas con minicélulas. No se observó fluorescencia roja a continuación de la tinción para LPS de *S. typhimurium*. **(B)** Células MDA-MB-468 transfectadas con minicélulas no dirigidas y teñidas después de 24 h de co-incubación. Se observaron muy pocos puntos de fluorescencia roja de fondo. **(C)** Células MDA-MB-468 transfectadas con minicélulas dirigidas y teñidas después de 24 h. La mayoría de las células mostraron fluorescencia roja en la superficie y algunas en el citoplasma (zona gris claro en la imagen en blanco y negro). **(D)** Igual que (C) pero a un aumento mayor para mostrar una célula única. El resultado fue el mismo que para (C). **(E)** Igual que (D) excepto que las células se teñieron después de 36 h. El resultado mostró fluorescencia roja intensa en el citoplasma de la mayoría de las células (gris claro en la imagen). Se muestran barras de escala para cada imagen.

La Figura 3 muestra internalización eficaz de minicélulas recombinantes dirigidas a receptor de Her2/neu, frente a minicélulas no dirigidas, en células SKOV-3 de cáncer ovárico humano. Los procedimientos se realizaron como se ha descrito en el Ejemplo 3 y los resultados se visualizaron mediante microscopía confocal. Se realizó tinción de inmunofluorescencia para todas las imágenes mostradas con anticuerpo monoclonal específico anti-LPS de *S. typhimurium*, seguido por anticuerpo anti-IgG de ratón (H+L) de cabra conjugado con Alexa Fluor 594. Cada imagen se muestra como una superposición de tinción de CID y fluorescencia roja. **(A)** Células SKOV-3 de control no transfectadas con minicélulas. No se observó fluorescencia roja a continuación de tinción para LPS de *S. typhimurium*. **(B)** Células SKOV-3 transfectadas con minicélulas no dirigidas y teñidas después de 36 h de co-incubación. Se observaron muy pocos puntos de fluorescencia roja de fondo. **(C)** Células SKOV-3 transfectadas con minicélulas dirigidas y teñidas después de 36 h. La mayoría de las células mostraron fluorescencia roja en el citoplasma (zona gris claro en la imagen en blanco y negro). **(D)** Igual que (C) pero a un aumento mayor. El resultado fue igual que para (C). **(E)** Igual que (C) pero a un aumento mayor para mostrar unas pocas células. El resultado mostró fluorescencia roja intensa en el citoplasma de la mayoría de las células (gris claro en la imagen). Se muestran barras de escala para cada imagen.

La Figura 4 muestra la eficacia de la administración génica a células de cáncer mamario humano (MDA-MB-468) usando minicélulas dirigidas a EGFR que portan un plásmido que codifica el antígeno de superficie de la Hepatitis B viral. **(A)** Resultados de Citometría de Flujo que muestran intensidad de fluorescencia de células tratadas con (i) MAb anti-HBsAg seguido por anticuerpo secundario conjugado con Ficoeritrina (PE) (anti-IgG de ratón), (ii) minicélulas no dirigidas seguido por MAb anti-HBsAg y MAb anti-IgG de ratón conjugado con PE, (iii) minicélulas dirigidas no específicamente seguido por MAb anti-HBsAg y MAb anti-IgG de ratón conjugado con PE y (iv) minicélulas dirigidas a EGFR seguido por MAb anti-HBsAg y MAb anti-IgG de ratón conjugado con PE. **(B)** Resultados de microscopía confocal que muestran administración génica eficaz y expresión de HBsAg recombinante en células MDA-MB-468 a continuación de transfección con minicélulas_{HBsAg} dirigidas a EGFR (ii y iii). La fluorescencia roja intracelular intensa (se muestra como gris claro en la imagen en blanco y negro) es la proteína HBsAg recombinante mostrada con MAb anti-HBsAg seguido por MAb anti-IgG de ratón conjugado con Alexa Fluor 594. Las células de control (i) que se transfectaron con minicélulas_{HBsAg} dirigidas no específicamente mostraron únicamente un par de puntos de fluorescencia roja de fondo.

La Figura 5 muestra el tratamiento de xenoinjertos de cáncer mamario humano en ratones desnudos a través de minicélulas recombinantes dirigidas. Los xenoinjertos de cáncer mamario se establecieron en ratones desnudos (véase el ejemplo 5) y se trataron por vía intratumoral con minicélulas recombinantes dirigidas que portaban plásmido pORF5-HSVtk::Sh ble. **(Grupo 1, control)** los tumores no recibieron ningún tratamiento; **(Grupo 2, control)** los tumores se trataron con minicélulas recombinantes no dirigidas [M-HSVtk] seguido por 2 dosis de GCV; **(Grupo 3, control)** los tumores se trataron con minicélulas recombinantes dirigidas [TM-HSVtk]; **(Grupo 4, control)** los tumores se trataron con el anticuerpo biespecífico (BsAb; especificidades para anti-LPS de *S. typhimurium*/anti-receptor de EGF humano), seguido por 2 dosis de GCV; **(Grupo 5, experimental)** los tumores se trataron con minicélulas recombinantes dirigidas [TM-HSVtk] seguido por una dosis de GCV; **(Grupo 6, experimental)** los tumores se trataron con minicélulas recombinantes dirigidas [TM-HSVtk] seguido por 2 dosis de GCV. Debajo del eje de las x se muestran los días en los que se proporcionaron diversos tratamientos a grupos específicos.

La Figura 6 muestra tratamiento de xenoinjertos de cáncer mamario humano en ratones desnudos a través de minicélulas recombinantes dirigidas a un receptor de EGF sobre-expresado. Los xenoinjertos de cáncer mamario se establecieron en ratones desnudos (véase el ejemplo 6) y se trataron por vía intravenosa con minicélulas recombinantes dirigidas que portaban plásmido pORF5-HSV1tk::Sh ble. Los xenoinjertos de tumor se trataron de la manera siguiente: **(Grupo 1, control)** sin tratamiento; **(Grupo 2, control)** minicélulas recombinantes no dirigidas [no T-M_{HSVtk}] seguido por 2 dosis de GCV; **(Grupo 3, control)** minicélulas recombinantes no dirigidas [no T-M_{HSVtk}]; **(Grupo 4, control)** anticuerpo biespecífico (BsAb; especificidades de anti-LPS de *S. typhimurium*/anti-receptor de EGF humano), seguido por 2 dosis de GCV; **(Grupo 5, control)** minicélulas recombinantes dirigidas [T-M_{HSVtk}], **(Grupo 6, experimental)** 10⁸ minicélulas recombinantes dirigidas [T-M_{HSVtk}] seguido por 2 dosis de GCV y **(Grupo 7, experimental)** 10⁹ minicélulas recombinantes dirigidas [T-M_{HSVtk}] seguido por 2 dosis de GCV. Debajo del eje de las x se muestran los días en los que se proporcionaron diversos tratamientos a grupos específicos. Los triángulos

cerrados indican tratamientos de minicélula o anticuerpo y los triángulos abiertos indican tratamientos de GCV.

La Figura 7 muestra el tratamiento de xenoinjertos de cáncer mamario humano en ratones desnudos a través de minicélulas recombinantes dirigidas a un receptor de HER2/*neu* subexpresado. Los xenoinjertos de cáncer mamario humano se establecieron en ratones desnudos (véase el ejemplo 5) y se trataron por vía intravenosa con minicélulas recombinantes dirigidas que portaban plásmido pORF5-HSVltk::Sh ble. En el grupo 8 se inyectaron los ratones por vía intratumoral con las minicélulas recombinantes. Los xenoinjertos de tumor se trataron de la manera siguiente: **Grupo 1, control**) sin tratamiento; **(Grupo 2, control)** minicélulas recombinantes no dirigidas [no T-M_{HSVtk}] seguido por 2 dosis de GCV; **(Grupo 3, control)** minicélulas recombinantes no dirigidas [no T-M_{HSVtk}]; **(Grupo 4, control)** anticuerpo biespecífico (BsAB; especificidades anti-LPS de *S. typhimurium*/anti-receptor de HER2/*neu* humano), seguido por 2 dosis de GCV; **(Grupo 5, control)** minicélulas recombinantes dirigidas [T-M_{HSVtk}]; **(Grupo 6, experimental)** 10⁸ minicélulas recombinantes dirigidas [T-M_{HSVtk}]; seguido por 2 dosis de GCV, **(Grupo 7, experimental)** 10⁹ minicélulas recombinantes dirigidas [T-M_{HSVtk}] seguido por 2 dosis de GCV y **(Grupo 8, experimental)** inyección intratumoral de 10⁹ minicélulas recombinantes dirigidas [T-M_{HSVtk}] seguido por 2 dosis de GCV. Debajo del eje de las x se muestran los días en los que se proporcionaron diversos tratamientos a grupos específicos. Los triángulos cerrados indican tratamientos con minicélulas o anticuerpo y los triángulos abiertos indican tratamientos con GCV.

Descripción detallada de realizaciones preferidas

Los presentes inventores han descubierto que se pueden emplear ligandos biespecíficos para dirigir vectores de minicélulas bacterianas a células huésped de mamífero no fagocíticas. Tales células huésped normalmente son resistentes a la adhesión y endocitosis de minicélulas *in vivo*, aunque se pueden hacer receptivas a la unión de vector de administración de minicélulas e internalización con la ayuda de un ligando biespecífico.

Adicionalmente, los inventores han descubierto que las minicélulas internalizadas se degradan suficientemente para liberar ADN de plásmido recombinante. Esto es sorprendente debido a que las células de mamífero no fagocíticas no portan de manera intrínseca compartimentos intracelulares agresivos como los fagolisosomas, que existen de forma predominante en células del sistema inmune tales como macrófagos fagocíticos.

Como una sorpresa adicional, los inventores también descubrieron que las minicélulas bacterianas pueden lograr que el plásmido recombinante escape del endosoma tardío de células no fagocíticas. Esto es inesperado debido a que las minicélulas son no vivas y están desprovistas del cromosoma bacteriano parental que codifica proteínas de lisis de membranas endosómicas tardías y fagosómicas. De hecho, se ha aceptado comúnmente que únicamente los patógenos bacterianos intracelulares facultativos vivos diseñados para lisar la membrana lisosomal y liberar el ADN intracelularmente pueden administrar genes a fagocitos no profesionales (revisado recientemente por Grillot-Courvalin y col., 2002). Por ejemplo, *Listeria monocytogenes* expresa una citolisina formadora de poro, Listeriolisina O (codificada cromosómicamente por el gen *hly*), que se piensa que juega un papel importante en la lisis de la membrana endosómica y fagosómica, permitiendo de ese modo que el ADN recombinante entre a un citoplasma celular infectado. De forma similar, *Shigella flexneri* también se piensa que escapa de la vacuola fagocítica lisando la membrana fagosómica.

Los inventores han establecido además que la administración génica recombinante mediada por minicélulas eficaz al núcleo de células no fagocíticas está relacionada con el número de copias de plásmidos portadas por una minicélula. Por tanto, las minicélulas que portan plásmidos de alto número de copias (más de 60 copias de plásmido por minicélula) logran la administración génica eficaz a células no fagocíticas, mientras que las minicélulas que portan plásmidos de número medio (11 a 60 por minicélula) o de número bajo de copias (1 a 10 por minicélula) son menos eficaces.

Adicionalmente, los inventores han establecido que la eficacia de la administración génica se relaciona con el número de minicélulas que se someten a endocitosis dentro de los endosomas. Por consiguiente, las células diana no fagocíticas que portan receptores altamente expresados en la superficie celular, tales como receptor EGF en la superficie de algunas células de cáncer mamario humano y al que se ha dirigido el ligando biespecífico, muestran más minicélulas engullidas dentro de cada endosoma, con frecuencia más de 10, lo que da como resultado una administración génica recombinante altamente eficaz al núcleo de la célula. Estos resultados sugieren que las probabilidades de escape del ADN recombinante de los endosomas tardíos aumentan cuando la carga de ADN recombinante dentro de un endosoma es lo suficientemente elevada para compensar las pérdidas a través de la degradación dentro del endosoma. Los resultados también muestran que la administración génica eficaz se puede conseguir aprovechando los receptores de superficie de células de mamífero que están sobreexpresados en la superficie celular, posibilitando de ese modo la endocitosis de múltiples minicélulas dentro de endosomas individuales.

De acuerdo con los descubrimientos anteriores, la invención amplía el espectro de enfermedades susceptibles a terapia génica usando vectores de minicélulas, potenciando la eficacia de transfección de minicélulas a células o tejidos diana que normalmente son refractarios a la adhesión de minicélulas, endocitosis y administración génica. La capacidad de dirigir minicélulas también proporciona un sistema más seguro y más flexible para terapia génica.

En un aspecto, por lo tanto, la invención se refiere a un procedimiento de administración génica dirigido que comprende poner en contacto ligandos biespecíficos con (a) minicélulas obtenidas de bacterias que contienen una secuencia de ácido nucleico terapéutica y (b) células de mamífero no fagocíticas. Los ligandos biespecíficos, que tienen especificidad tanto por minicélulas como por componentes de células de mamífero, provocan que las minicélulas se unan a las células de mamífero, de forma que las minicélulas son envueltas por las células de mamífero, que después producen un producto de expresión de la secuencia de ácido nucleico terapéutica.

Los inventores han observado que este procedimiento es ampliamente aplicable a una diversidad de células de mamífero no fagocíticas que normalmente son refractarias a adhesión específica y endocitosis de minicélulas. Por ejemplo, ligandos de anticuerpo biespecíficos con especificidad anti-polisacárido O en un brazo y especificidad anti-receptor HER2, anti-receptor de EGF o anti-receptor de andrógenos en el otro brazo unen eficazmente las minicélulas a los receptores específicos en una diversidad de células no fagocíticas. Estas células incluían células de cáncer de pulmón, de ovario, de cerebro, mamario, de próstata y de piel. Además, la unión eficaz precedía a la endocitosis rápida de las minicélulas por cada una de las células no fagocíticas.

El descubrimiento de los inventores es sorprendente debido a que previamente se pensaba que únicamente los fagocitos "profesionales", tales como macrófagos y neutrófilos, podían endocitar partículas macromoleculares grandes como células bacterianas, que tienen 600 nm y mayores. Por el contrario, se ha pensado que las células de mamífero no fagocíticas pueden endocitar únicamente partículas macromoleculares no vivas pequeñas, tales como liposomas, que tienen 150-400 nm y virus, que están en el orden de 65-80 nm de tamaño. Véase Vondoc y Fitzpatrick, 1998. Las minicélulas intactas obtenidas de bacterias usadas en los estudios de los inventores tenían aproximadamente 400 nm de diámetro.

Los inventores también han encontrado que el ADN recombinante portado por minicélulas se puede expresar por células huésped de mamífero no fagocíticas. Las minicélulas, una vez se han sometido a endocitosis, posteriormente se degradan en endosomas tardíos. Sin embargo, algún ADN recombinante portado por las minicélulas se escapa de las membranas endosómicas y se transporta al núcleo de las células de mamífero, permitiendo la expresión génica. Este descubrimiento es sorprendente debido a que previamente se pensaba que únicamente los patógenos intracelulares facultativos vivos portaban proteínas de virulencia con capacidad de escape de la membrana endosómica y administración génica. Véase, Grillo-Courvalin y col., 2002. Las minicélulas obtenidas de bacterias no vivas u obtenidas de bacterias, no se esperaba que expresaran estas proteínas de virulencia inducida *in vivo* y, por lo tanto, se esperaba que se degradaran completamente dentro de los endosomas, sin posibilidad de escape endosómico por cualquier ADN recombinante.

Por lo tanto, la invención se refiere a procedimientos novedosos que amplían el intervalo de células de mamífero susceptibles de terapia génica a través de minicélulas obtenidas de bacterias. Estos procedimientos se pueden realizar tanto *in vitro* como *in vivo*.

Los ligandos útiles en la invención incluyen cualquier agente que se une a un componente de superficie en una célula diana y a un componente de superficie en una minicélula. Preferentemente, el componente de superficie en una célula diana es un receptor, especialmente un receptor capaz de mediar la endocitosis. Los ligandos pueden comprender un componente polipeptídico y/o de carbohidrato. Los anticuerpos son ligandos preferidos. Por ejemplo, un anticuerpo biespecífico que porta especificidades dobles para un componente de superficie en minicélulas intactas obtenidas de bacterias y para un componente de superficie en células de mamífero diana, se puede usar para dirigir eficazmente las minicélulas a las células de mamífero diana *in vitro* e *in vivo*. Los ligandos útiles también incluyen receptores, enzimas, péptidos de unión, proteínas de fusión/quiméricas y moléculas pequeñas.

La selección de un ligando particular se realiza en dos bases principales: (i) unión específica a uno o más dominios en la superficie de minicélulas intactas y (ii) unión específica a uno o más dominios en la superficie de las células diana. Por tanto, los ligandos preferentemente tienen un primer brazo que porta especificidad por una estructura de superficie de minicélula intacta obtenida de bacteria y un segundo brazo que porta especificidad por una estructura de superficie de célula de mamífero no fagocítica. Cada uno del primer y segundo brazos pueden ser multivalentes. Preferentemente, cada brazo es monoespecífico, incluso aunque sea multivalente.

Para la unión a minicélulas obtenidas de bacterias, es deseable que un brazo del ligando sea específico por el componente de polisacárido O de un lipopolisacárido encontrado en la célula bacteriana parental. Otras estructuras de superficie de minicélula que se pueden aprovechar para la unión del ligando incluyen polipéptidos expuestos en la superficie celular y carbohidratos en membranas exteriores, pili, fimbrias y flagelos.

Para la unión a células diana, un brazo del ligando es específico de un componente de superficie de una célula de mamífero no fagocítica. Tales componentes incluyen proteínas de superficie celular, péptidos y carbohidratos, bien sean caracterizados o no caracterizados. Los receptores de superficie celular, específicamente aquellos capaces de activar la endocitosis mediada por receptor son componentes de superficie celular deseables para la dirección.

A modo de ejemplo, se pueden dirigir células tumorales, células metastásicas, células de la vasculatura, tales como células endoteliales y células de músculo liso, células de pulmón, células de riñón, células sanguíneas, células de médula ósea, células cerebrales, células de hígado y así sucesivamente, o precursores de cualquier célula

seleccionada seleccionando un ligando que se una específicamente a un motivo de receptor de superficie celular en las células deseadas. Los ejemplos de receptores de superficie celular incluyen antígeno carcinoembrionario (CAE), que se encuentra sobreexpresado en la mayoría de carcinomas de colon, recto, mamario, de pulmón, de páncreas y gastrointestinal (Marshall, 2003); receptores de hereulina (HER-2, *neu* o *c-erbB-2*), que se encuentran sobreexpresados frecuentemente en cánceres mamario, de ovario, de colon, de pulmón, de próstata y cervical (Hung y col., 2000); receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), que está expresado de manera elevada en una diversidad de tumores sólidos incluyendo aquellos del seno, cabeza y cuello, de células no pequeñas de pulmón y de próstata (Salomon y col., 1995); receptor de asialoglicoproteína (Stockert, 1995); receptor de transferrina (Singh, 1999); receptor del complejo serpina enzima, que se expresa en hepatocitos (Ziady, y col., 1997); receptor del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR), que está sobreexpresado en las células de adenocarcinoma ductal pancreático (Kleeff y col., 2002); receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR), para terapia génica anti-angiogénesis (Becker y col., 2002 y Hoshida y col., 2002); receptor de folato, que está sobreexpresado de forma selectiva en el 90% de carcinomas ováricos no mucinosos (Gosselin y Lee, 2002); glicocalix de superficie celular (Batra y col., 1994); receptores de carbohidratos (Thurnher y col., 1994); y receptor de inmunoglobulina polimérica, que es útil para administración génica a células epiteliales respiratorias y atractivo para el tratamiento de enfermedades pulmonares tales como Fibrosis Quística (Kaetzel y col., 1997).

Los ligandos preferidos comprenden anticuerpos y/o derivados de anticuerpos. Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" abarca una molécula de inmunoglobulina obtenida mediante generación *in vitro* o *in vivo* de una respuesta inmunogénica. El término "anticuerpo" incluye anticuerpos policlonales, monoespecíficos y monoclonales, así como derivados de anticuerpo, tales como fragmentos de anticuerpo de cadena única (scFv). Los anticuerpos y derivados de anticuerpos útiles en la presente invención también se pueden obtener mediante técnicas de ADN recombinante.

Los anticuerpos de tipo silvestre tienen cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras idénticas. Ambos tipos de cadenas polipeptídicas tienen regiones constantes, que no varían o varían mínimamente entre anticuerpos de la misma clase y regiones variables. Las regiones variables son únicas para un anticuerpo particular y comprenden un dominio de unión a antígeno que reconoce un epítipo específico. Las regiones del dominio de unión a antígeno que están implicadas más directamente en la unión a anticuerpo son las "regiones determinantes de complementariedad" (CDR).

El término "anticuerpo" también abarca derivados de anticuerpos, tales como fragmentos de anticuerpo que conservan la capacidad de unirse específicamente a antígenos. Tales fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab (un fragmento que contiene el dominio de unión a antígeno y comprende una cadena ligera y parte de una cadena pesada unidas por un puente de disulfuro), Fab' (un fragmento de anticuerpo que contiene un dominio de unión a antígeno único que comprende un Fab y una parte adicional de la cadena pesada a través de la región de bisagra, F(ab')₂ (dos moléculas de Fab' unidas por puentes de disulfuro intercadena en la regiones de bisagra de las cadenas pesadas), un Fab específico (una molécula de Fab que tiene dos dominios de unión a antígeno, cada uno de los cuales se puede dirigir a un epítipo diferente) y un scFv (la región variable determinante de unión a antígeno de una cadena ligera y pesada única de un anticuerpo enlazadas entre sí mediante una cadena de aminoácidos).

Cuando los anticuerpos, incluyendo fragmentos de anticuerpos, constituyen parte o todos los ligandos, los mismos preferentemente son de origen humano o se modifican para ser adecuados para el uso en seres humanos. Los denominados "anticuerpos humanizados" se conocen bien en la técnica. Véase, por ejemplo, Osbourn y col., 2003. Los mismos se han modificado mediante manipulación genética y/o tratamiento *in vitro* para reducir su antigenicidad en un ser humano. Los procedimientos para humanizar anticuerpos se describen en, por ejemplo, las patentes de los Estados Unidos N° 6.639.055, N° 5.585.089 y N° 5.530.101. En el caso más sencillo, los anticuerpos humanizados se forman injertando bucles de unión a antígeno, conocidos como regiones determinantes de complementariedad (CDR), a partir de un mAb de ratón en una IgG humana. Véase, Jones y col., 1986; Riechmann y col., 1988; y Verhoeven y col., 1988. La generación de anticuerpos humanizados de afinidad elevada, sin embargo, generalmente requiere la transferencia de uno o más restos adicionales desde las denominadas regiones flanqueantes (RF) del mAb parental de ratón. También se han desarrollado varias variantes de la tecnología de humanización. Véase, Vaughan y col., 1998.

Los anticuerpos humanos, en lugar de "anticuerpos humanizados", también se pueden emplear en la invención. Los mismos tienen afinidad elevada por sus antígenos respectivos y se obtienen de forma rutinaria a partir de fragmentos variables de cadena única muy grandes (scFv) o bibliotecas de presentación en fago de Fab. Véase, Griffiths y col., 1994; Vaughan y col., 1996; Sheets y col., 1998; de Haard y col., 1999; y Knappik y col., 2000.

Los ligandos útiles también incluyen anticuerpos de cadena única biespecíficos, que típicamente son polipéptidos recombinantes que consisten en una parte de cadena ligera variable unida covalentemente a través de una molécula de engarce a una parte de cadena pesada variable correspondiente. Véanse, las patentes de los Estados Unidos 5.455.030; 5.260.203 y 4.496.778. Los anticuerpos biespecíficos también se pueden preparar por otros procedimientos. Por ejemplo, se pueden crear heteroconjugados químicos enlazando químicamente anticuerpos intactos o fragmentos de anticuerpo de especificidades diferentes. Véase, Karpovsky y col., 1984. Sin embargo, tales heteroconjugados son difíciles de preparar de una manera reproducible y son al menos dos veces más grandes que los anticuerpos monoclonales normales. Los anticuerpos biespecíficos también se pueden crear mediante

intercambio de disulfuro, que implica escisión enzimática y reasociación de los fragmentos de anticuerpo. Véase Glennie y col., 1987.

Debido a que los fragmentos Fab y scFv son monovalentes los mismos con frecuencia tienen afinidad baja por estructuras diana. Por lo tanto, los ligandos preferidos preparados a partir de estos componentes se modifican por ingeniería genética en conjugados diméricos, triméricos o tetraméricos para aumentar la afinidad funcional. Véase, Tomlinson y Holliger, 2000; Carter, 2001; Hudson y Souriau, 2001; y Todorovska y col., 2001. Tales estructuras de conjugados se pueden crear mediante entrecruzamientos químicos y/o genéticos.

Los ligandos biespecíficos de la invención preferentemente son monoespecíficos en cada extremo, es decir, específicos para un componente único en minicélulas en un extremo y específicos para un componente único en células diana en el otro extremo. Los ligandos pueden ser multivalentes en uno o ambos extremos, por ejemplo, en la forma de los denominados diacuerpos, triacuerpos y tetracuerpos. Véase, Hudson y Souriau, 2003. Un diacuerpo es un dímero bivalente formado por una asociación no covalente de dos scFv, que produce dos sitios de unión Fv. De forma similar, un triacuerpo se produce como resultado de la formación de un trímero trivalente de tres scFv, que produce tres sitios de unión y un tetracuerpo se produce como resultado de la formación de un tetrámero tetravalente de cuatro scFv, produciendo cuatro sitios de unión.

Varios anticuerpos monoclonales humanizados, humanos y de ratón y fragmentos de los mismos que tienen especificidad por receptores en células de mamífero se han aprobado para uso terapéutico humano y la lista está creciendo rápidamente. Véase Hudson y Souriau, 2003. Un ejemplo de un anticuerpo de este tipo que se puede usar para formar un brazo de un ligando biespecífico tiene especificidad por HER2: Herceptin™; Trastuzumab.

Las regiones variables de anticuerpo también se pueden fusionar a una amplia variedad de dominios de proteína. La fusión a dominios de inmunoglobulina humana tales como CH3 de IgG1 tanto añade masa como promueve la dimerización. Véase Hu y col., 1996. La fusión a regiones Fc de bisagra de Ig humana pueden añadir funciones efectoras. También, la fusión a dominios de proteína heterólogos de proteínas multiméricas promueve la multimerización. Por ejemplo, la fusión de un scFv corto a hélices anfipáticas cortas se ha usado para producir mini anticuerpos. Véase Pack y Pluckthun, 1992. Los dominios de las proteínas que forman heterodímeros, tales como fos/jun, se pueden usar para producir moléculas biespecíficas (Kostelny y col., 1992) y, como alternativa, los dominios de homodimerización se pueden someter a ingeniería genética para formar heterodímeros mediante estrategias de ingeniería genética tales como "bultos en huecos" (Ridgway y col., 1996). Finalmente, se pueden seleccionar compañeros de proteínas de fusión que proporcionan tanto multimerización como también una función adicional, por ejemplo, estreptavidina. Véase, Dubel y col. 1995.

Las minicélulas de la invención son formas anucleadas de *E. coli* u otras células bacterianas, engendradas por una alteración en la coordinación, durante la fisión binaria, de la división celular con segregación del ADN. La replicación cromosómica procariota está unida a la fisión binaria normal, que implica formación de tabique celular intermedio. En *E. coli*, por ejemplo, la mutación de los genes *min*, tales como *minCD*, puede eliminar la inhibición de la formación de tabique en los polos celulares durante la división celular, dando como resultado la producción de una célula hija normal y una minicélula anucleada. Véase, de Boer y col., 1992; Raskin y de Boer, 1999; Hu y Lutkenhaus, 1999; Harry, 2001. Las minicélulas son diferentes de otras vesículas pequeñas que se generan y liberan de forma espontánea en determinadas situaciones y, al contrario de las minicélulas, no se deben a reordenamientos genéticos específicos o a la expresión de genes episomales. Para practicar la presente invención, es deseable que las minicélulas tengan paredes celulares intactas ("minicélulas intactas").

Adicionalmente a las mutaciones del operón *min*, las minicélulas anucleadas también se generan a continuación de una diversidad de otros rearreglos o mutaciones genéticas que afectan la formación de tabiques, por ejemplo, en el *divIVB1* en *B. subtilis*. Véase Reeve y Cornett, 1975; Levin y col., 1992. Las minicélulas también se pueden formar a continuación de alteración en los niveles de expresión génica de proteínas implicadas en la división celular/segregación cromosómica. Por ejemplo, la sobreexpresión de *minE* conduce a división polar y producción de minicélulas. De forma similar, las minicélulas sin cromosomas se pueden producir como resultado de defectos en la segregación cromosómica por ejemplo, la mutación de *smc* en *Bacillus subtilis* (Britton y col., 1998), supresión de *spoOJ* en *B. subtilis* (Ireton y col., 1994), mutación de *mukB* en *E. coli* (Hiraga y col., 1989) y mutación de *parC* en *E. coli* (Stewart y D'Ari, 1992). Los productos génicos se pueden administrar *in trans*. Por ejemplo, cuando CafA está sobreexpresado a partir de un plásmido de alto número de copias, puede potenciar el índice de división celular y/o inhibir la repartición cromosómica después de la replicación (Okada y col., 1993), dando como resultado la formación de células encadenadas y minicélulas anucleadas (Wachi y col., 1989; Okada y col., 1993). Se pueden preparar minicélulas a partir de cualquier célula bacteriana de origen Gram-positivo o Gram-negativo.

Las minicélulas de la invención contienen una molécula de ácido nucleico que se puede transcribir y/o traducir para producir un producto deseado. Con los fines de la presente descripción, tales moléculas de ácido nucleico se categorizan como "moléculas de ácido nucleico terapéuticas". En determinadas realizaciones, el producto de transcripción y/o traducción funciona para aliviar, o de otra manera tratar una enfermedad o modificar un rasgo en una célula, tejido u órgano. Normalmente, el ácido nucleico terapéutico se encuentra en un plásmido dentro de las minicélulas.

La molécula de ácido nucleico terapéutica codifica un producto, tal como ARN funcional (por ejemplo, antisentido, ribozima, ARNsi o ARNsh) o un péptido, polipéptido o proteína, cuya producción se desea. Por ejemplo, el material genético de interés puede codificar una hormona, receptor, enzima o (poli)péptido de valor terapéutico. Tales procedimientos pueden dar como resultado la expresión transitoria de ADN transferido no integrado, replicación extracromosómica y expresión de replicones transferidos tales como episomas o la integración de material genético transferido en el ADN genómico de las células huésped.

La transcripción o traducción de una molécula de ácido nucleico terapéutica puede ser útil para tratar cáncer o una enfermedad adquirida, tal como SIDA, neumonía, enfisema o para corregir errores innatos del metabolismo, tales como fibrosis quística. La transcripción o traducción de un ácido nucleico terapéutico también puede lograr la esterilización anticonceptiva, incluyendo esterilización anticonceptiva de animales salvajes. Los trastornos mediados por alérgenos e inflamatorios mediados por agente también se pueden contrarrestar mediante la administración, a través de la presente invención, de una molécula de ácido nucleico terapéutica que, tras la expresión en un paciente, influye sobre la respuesta o respuestas inmunes asociadas con el alérgeno y el agente infeccioso, respectivamente. Una molécula de ácido nucleico terapéutica también puede tener un producto de expresión o puede haber un producto de modificación post transduccional del producto de expresión aguas abajo, que reduce las secuelas inmunológicas relacionadas con trasplantes o que ayuda a facilitar el crecimiento y regeneración de tejido.

Una molécula de ácido nucleico terapéutica puede ser el equivalente normal de un gen que expresa una proteína que funciona de forma anormal o que está presente en niveles anormales en una patología, como es el caso, por ejemplo, con el regulador de conductancia transmembrana de fibrosis quística en la fibrosis quística (Kerem y col., 1989; Riordan y col., 1989; Rommens y col., 1989), con β -globina en anemia de células falciformes y con cualquier α -globina, β -globina y γ -globina en talasemia. La molécula de ácido nucleico terapéutica puede tener un transcrito de ARN antisentido o ARN de interferencia pequeño, como se ha mencionado anteriormente. Por lo tanto, una producción excesiva de α -globina sobre β -globina que caracteriza la β -talasemia se puede aliviar mediante terapia génica, de acuerdo con la presente invención, usando una minicélula intacta modificada por ingeniería genética para contener un plásmido que incorpora una secuencia que tiene un transcrito de ARN antisentido con respecto a una secuencia diana del ARNm de α -globina.

En el tratamiento del cáncer, una molécula de ácido nucleico terapéutica adecuada para uso de acuerdo con la presente invención podría tener una secuencia que corresponde o que se obtiene a partir de un gen que está asociado con la supresión tumoral, tal como el gen *p53*, el gen de retinoblastoma y el gen que codifica el factor de necrosis tumoral. Una amplia diversidad de tumores sólidos - cáncer, papilomas y verrugas - deberían ser tratables mediante este enfoque, de conformidad con la invención. Los cánceres representativos con respecto a esto incluyen carcinoma de colon, cáncer prostático, cáncer mamario, cáncer de pulmón, cáncer de piel, cáncer de hígado, cáncer de hueso, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de cerebro, cáncer de cabeza y cuello y linfoma. Los papilomas ilustrativos son papiloma de células escamosas, papiloma del plexo coroideo y papiloma laríngeo. Los ejemplos de afecciones de verrugas son verrugas genitales, verrugas plantares, epidermodisplasia verruciforme y verrugas malignas.

Una molécula de ácido nucleico terapéutica para la presente invención también puede comprender un segmento de ADN que codifica una enzima que convierte un profármaco inactivo en uno o más metabolitos citotóxicos de forma que, tras la introducción *in vivo* del profármaco, la célula diana en efecto se ve obligada, tal vez con las células vecinas también, a cometer suicidio. Las aplicaciones preclínicas y clínicas de un "gen suicida" de este tipo, que puede ser de origen no humano o de origen humano, se revisan por Spencer (2000), Shangara y col. (2000) y Yazawa y col. (2002). Los genes ilustrativos de genes suicidas de origen no humano son aquellos que codifican HSV-timidina quinasa (*tk*), citosina desaminasa (CDA) + uracil fosforibosiltransferasa, xantina-guanina fosforibosiltransferasa (GPT), nitrorreductasa (NTR), purina nucleósido fosforilasa (PNP, DeoD), citocromo P450 (CYP4B1), carboxipeptidasa G2 (CPG2) y D-aminoácido oxidasa (DAAO), respectivamente. Los genes suicidas de origen humano se ilustran mediante genes que codifican carboxipeptidasa A1 (CPA), desoxicitidina quinasa (dCK), citocromo P450 (CYP2B1,6), LNGFR/FKBP/Fas, FKBP/Caspasas y ER/p53, respectivamente.

Una terapia de gen suicida se podría aplicar al tratamiento del SIDA. Esta estrategia se ha ensayado con vectores suicidas que expresan un producto génico tóxico tan pronto como las células de mamífero tratadas se infectan por VIH-1. Estos vectores usan los elementos reguladores de VIH-1, Tat y/o Rev, para inducir la expresión de un gen tóxico tal como toxina α -difteria, citosina desaminasa o interferón- α 2 después de la infección por VIH-1. Véase Curiel y col., 1993; Dinges y col., 1995; Harrison y col., 1992a; Harrison y col., 1992b; Ragheb y col., 1999.

El ácido nucleico terapéutico para la invención típicamente está contenido en un plásmido dentro de la minicélula. El plásmido también puede contener un segmento de ácido nucleico adicional que funciona como un elemento regulador, tal como un promotor, un terminador, un potenciador o una secuencia señal y que está unido operativamente al segmento terapéutico del ácido nucleico. Un promotor adecuado puede ser específico de tejido o incluso específico de tumor, como lo dicta el contexto terapéutico.

Un promotor es "específico de tejido" cuando el mismo se activa preferentemente en un tejido dado y, por lo tanto, es eficaz para activar la expresión, en el tejido diana, de una secuencia estructural unida operativamente. La categoría de promotores específicos de tejido incluye, por ejemplo: el promotor específico de hepatocitos para albúmina y α_1 -

antitripsina, respectivamente; la región de control del gen de elastasa I, que es activa en células acinares pancreáticas; la región de control del gen de insulina, activa en células beta pancreáticas; la región de control del virus del tumor mamario de ratón, que es activa en células testiculares, mamas, linfoides y mastocitos; la región de control del gen de proteína básica de mielina, activa en células oligodendrocíticas en el cerebro y la región de control del gen de la hormona de liberación gonadotrópica, que es activa en células del hipotálamo. Véanse Frain y col. (1990), Ciliberto y col. (1985), Pinkert y col., (1987), Kelsey y col. (1987), Swift y col. (1984), MacDonald (1987), Hanahan, (1985), Leder y col. (1986), Readhead y col. (1987) y Mason y col. (1986).

También existen promotores que se expresan preferentemente en determinadas células tumorales o en células tumorales *per se* y que son útiles para tratar diferentes cánceres de acuerdo con la presente invención. La clase de promotores que son específicos para células cancerosas se ilustra por: el promotor de tirosinasa, para dirigirse a melanomas; el promotor MUC1/Df3, para dirigirse a carcinoma mamario; el potenciador de *myoD*/promotor de SV40 híbrido, que dirige la expresión a rhabdomyosarcoma (RMS); el promotor de antígeno carcinoembrionario (CEA) que es específico de células que expresan CEA tales como células de cáncer de colon y el promotor del gen de hexoquinasa de tipo II, para dirigirse a carcinomas pulmonares de células no pequeñas. Véase Hart (1996), Morton y Potter (1998), Kurane y col. (1998) y Katabi y col. (1999).

Se puede usar una secuencia señal, de acuerdo con la presente invención, para lograr la secreción de un producto de expresión o la localización de un producto de expresión en un compartimento celular particular. Por lo tanto, una molécula polinucleotídica terapéutica que se administra a través de minicélulas intactas puede incluir una secuencia señal, en fase de lectura apropiada, de forma que el producto de expresión de interés se secrete por una célula envolvente o su progenie, para influir de ese modo a las células circundantes, de acuerdo con el paradigma de tratamiento elegido. Las secuencias señal ilustrativas incluyen la secuencia de secreción de hemolisina C-terminal, descrita en la Patente de los Estados Unidos Nº 5.143.830, la secuencia de secreción de BAR1, divulgada en la Patente de los Estados Unidos Nº 5.037.743 y la parte de secuencia señal del polipéptido zsig32, descrita en la Patente de los Estados Unidos Nº 6.025.197.

Un plásmido dentro de una minicélula para la invención también puede contener un elemento informador. Un elemento informador confiere a su huésped recombinante un fenotipo o característica fácilmente detectable, típicamente codificando un polipéptido, no producido de otra manera por el huésped que se puede detectar, tras la expresión, mediante análisis histológico o *in situ*, tal como mediante técnicas de formación de imágenes *in vivo*. Por ejemplo, un elemento informador administrado por una minicélula intacta, de acuerdo con la presente invención, podría codificar una proteína que produce, en la célula huésped envolvente, un cambio colorimétrico o fluorométrico que es detectable mediante análisis *in situ* y que es una función cuantitativa o semicuantitativa de la activación transcripcional. Ilustrativas de estas proteínas son las esterasas, fosfatasas, proteasas y otras enzimas, cuya actividad genera un cromóforo o fluoróforo detectable.

Los ejemplos preferidos son β -galactosidasa de *E. coli*, que logra un cambio de color a través de la escisión de un sustrato indigénico, indolil- β -D-galactósido y una luciferasa, que oxida un aldehído de cadena larga (luciferasa bacteriana) o un ácido carboxílico heterocíclico (luciferina) con la liberación concomitante de luz. También es útil en este contexto un elemento informador que codifica la proteína fluorescente verde (GFP) de la medusa, *Aequorea victoria*, descrita por Prasher y col. (1995). El campo de tecnología relacionado con GFP se ilustra por dos solicitudes PCT publicadas, WO 095/21191, (divulga una secuencia polinucleotídica que codifica una apoproteína GFP de 238 aminoácidos, que contiene un cromóforo formado a partir de los aminoácidos 65 a 67) y WO 095/21191 (divulga una modificación del ADNc del apopéptido de GFP de *A. victoria*, proporcionando un péptido que tiene propiedades fluorescentes alteradas) y por un informe de Heim y col. (1994) de una GFP mutante, caracterizada por una mejora de 4 a 6 veces en la amplitud de excitación.

Otro tipo de un elemento informador está asociado con un producto de expresión que vuelve a la minicélula recombinante resistente a una toxina. Por ejemplo, el gen *neo* protege a un huésped frente a niveles tóxicos del antibiótico G418, mientras que un gen que codifica dihidrofolato reductasa confiere resistencia a metotrexato y el gen de cloranfenicol acetiltransferasa (CAT) confiere resistencia al cloranfenicol.

Otros genes para su uso como un elemento informador incluyen aquellos que pueden transformar una minicélula huésped para expresar antígenos de superficie celular distintivos, por ejemplo, proteínas de envuelta viral tales como gp 120 de VIH o gD de herpes, que se pueden detectar fácilmente mediante inmunoensayos.

Las células diana para la invención incluyen cualquier célula en la que se tiene que introducir una molécula de ácido nucleico exógena. ("Introducir" cuando se usa con referencia una molécula de ácido nucleico exógena, significa que la molécula de ácido nucleico portada dentro de una minicélula se administra a la célula diana). Las células diana deseables se caracterizan por expresión de un receptor de superficie celular que, tras la unión de un ligando, facilita la endocitosis. Las células diana preferidas son no fagocíticas, lo que significa que las células normalmente no ingieren partículas bacterianas y son de mamífero.

Los usos y composiciones de la invención se pueden usar para administrar una diversidad de moléculas de ácido nucleico, que pueden ser ADNc así como ADN o ARN genómico y pueden estar en orientación con sentido o anti sentido. La molécula de ácido nucleico presente en una minicélula, de conformidad con la presente invención, puede

tomar la forma de un plásmido, vector de expresión u otra construcción genética, pero no es ADN genómico que se origina a partir de la célula bacteriana que dio origen a la minicélula. Cualquier secuencia de ADN o ARN deseada a partir de una fuente eucariota, procariota o sintética que se puede colocar bajo el control traduccional y transcripcional de un promotor de expresión de gen eucariota o que se puede expresar en la célula de mamífero usando factores de transactivación de la célula huésped es adecuada para su uso en la presente invención.

Los procedimientos que se refieren a la invención se pueden realizar *in vivo* o *ex vivo*. En un procedimiento *ex vivo*, por ejemplo, las células diana se pueden eliminar de un sujeto, tal como mediante biopsia. Un ligando apropiado se puede seleccionar en base al conocimiento de un receptor de superficie celular que se expresa por las células diana. El gen o los genes que se tienen que administrar a las células diana se clonan en un ADN portador episomal apropiado, por ejemplo, un plásmido y se transfieren a las células bacterianas parentales a partir de las cuales se tienen que obtener las minicélulas intactas. Los procedimientos para obtener minicélulas se conocen bien en la técnica, como se describe en el documento PCT/IB02/04632. Las minicélulas que portan el ADN recombinante después se purifican mediante procedimientos conocidos en la técnica y descritos en el documento PCT/IB02/04632. Después el ligando biespecífico se une a las minicélulas purificadas recombinantes, por ejemplo mediante incubación *in vitro* en medio adecuado y el exceso de ligando se retira mediante lavado de las minicélulas cargadas con ligando. La composición que comprende minicélulas intactas purificadas y el ligando biespecífico, unido a las minicélulas a través de un brazo que tiene especificidad por un componente de superficie de minicélula, después se ponen en contacto con células diana *in vitro*, por ejemplo, en cultivo de tejido (como se describe en el Ejemplo 1, 2 y 3) o *in vivo* (como se describe en el ejemplo 4).

Por tanto, la invención se refiere a un procedimiento para realizar terapia génica *ex vivo* en células de mamífero no fagocíticas deseadas que normalmente son refractarias a terapia génica mediada por minicélulas. Dependiendo de las células diana y del ácido nucleico terapéutico, la presente invención se puede usar en el tratamiento de diversas afecciones y enfermedades, para aumentar la expresión de una proteína deseada, para inhibir la expresión o función de un producto génico y así sucesivamente. Por ejemplo, la transcripción o traducción de una molécula de ácido nucleico terapéutica determinada puede ser útil para tratar cáncer o una enfermedad adquirida, tal como SIDA, neumonía, enfisema o para corregir errores innatos del metabolismo, tales como fibrosis quística. La transcripción o traducción de un ácido nucleico terapéutico también puede lograr esterilización anticonceptiva, incluyendo esterilización anticonceptiva de animales salvajes. Los trastornos mediados por alérgeno e inflamatorios mediados por agente infeccioso también se pueden contrarrestar mediante la administración, a través de la presente invención, de una molécula de ácido nucleico terapéutica que, tras la expresión en un paciente, influye sobre la respuesta o respuestas inmunes asociadas con el alérgeno y el agente infeccioso, respectivamente. Una molécula de ácido nucleico terapéutica también puede tener un producto de expresión o puede ser un producto aguas abajo de la modificación postraduccional del producto de expresión, que reduce las secuelas inmunológicas relacionadas con un trasplante o que ayuda a facilitar el crecimiento y regeneración de tejido.

La invención también se refiere a la transferencia de ácidos nucleicos a tipos celulares seleccionados *in vitro*. Tales transferencias son útiles para una diversidad de propósitos, tal como para crear una célula que pueda producir grandes cantidades de una proteína seleccionada, que después se puede recoger.

En un aspecto relacionado, la invención proporciona una composición de materia útil para introducir moléculas de ácido nucleico exógenas en células de mamífero no fagocíticas diana con alta eficacia. La composición comprende (i) una minicélula obtenida de bacterias y (ii) un ligando biespecífico. La minicélula y el ligando pueden ser cualquiera de los descritos en el presente documento. Por tanto, la minicélula contiene una molécula de ácido nucleico terapéutica y el ligando biespecífico preferentemente es capaz de unirse a un componente de superficie de la minicélula y a un componente de superficie de una célula de mamífero diana.

Una composición que consiste básicamente en minicélulas recombinantes y ligandos biespecíficos de la presente invención (es decir, una composición que incluye tales minicélulas y ligandos con otros constituyentes que no interfieren indebidamente con la calidad de administración de ADN de la composición) se puede formular de manera convencional, usando uno o más vehículos o excipientes fisiológicamente aceptables. Las formulaciones para inyección se pueden presentar en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas o viales o en recipientes multidosis, con o sin un conservante añadido. La formulación puede ser una solución, una suspensión o una emulsión en vehículos oleosos o acuosos y puede contener agentes de formulación, tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o de dispersión. Una solución adecuada es isotónica con la sangre del receptor y se ilustra mediante solución salina, solución de Ringer y solución de dextrosa. Como alternativa, las composiciones pueden estar en forma de polvo liofilizado, para reconstitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua libre de pirógeno o solución salina fisiológica. Las composiciones también se pueden formular como una preparación de liberación prolongada. Tales formulaciones de acción prolongada se pueden administrar mediante implante (por ejemplo, por vía subcutánea o por vía intramuscular) o mediante inyección intramuscular.

Una composición de la presente invención se puede administrar a través de diversas vías y a diversos sitios en un organismo mamífero, para conseguir el efecto o los efectos terapéuticos deseados, bien sea por vía local o por vía sistémica. La administración se puede conseguir, por ejemplo, mediante administración oral, mediante aplicación de la formulación a una cavidad corporal, mediante inhalación o insuflación o mediante administración parenteral, intramuscular, intravenosa, intraportal, intrahepática, peritoneal, subcutánea, intratumoral o intradérmica. El modo y

el sitio de administración dependen del emplazamiento de las células diana. Por ejemplo, las células de fibrosis quística se pueden dirigir eficazmente mediante administración inhalada de las minicélulas recombinantes dirigidas. De forma similar, la metástasis tumoral se puede tratar más eficazmente a través de administración intravenosa de minicélulas recombinantes dirigidas. El cáncer ovárico primario se puede tratar a través de administración intraperitoneal de minicélulas recombinantes dirigidas.

Los siguientes ejemplos tienen por objeto ilustrar y proporcionar una comprensión más completa de la invención sin limitar la invención a los ejemplos proporcionados.

Ejemplo 1. Unión e internalización mediada por receptor altamente eficaz de minicélulas dirigidas a anticuerpo biespecífico en células de carcinoma prostático humano no fagocíticas.

Este experimento demuestra que un anticuerpo biespecífico con fragmentos Fab que porta especificidades de unión a anti-LPS de *S. typhimurium* y anti-receptor de andrógenos puede posibilitar la unión y la internalización mediada por receptor de minicélulas obtenidas de *S. typhimurium* en células de carcinoma prostático que se conoce que sobreexpresan el receptor de andrógenos en la superficie celular.

La cepa mutante *minCDE* de *S. typhimurium* generada previamente (solicitud de patente, PCT/IB02/04632) se transformó con plásmido recombinante pORF5-HSV1tk::Sh ble (Invivogen, San Diego, CA, EE.UU.). El plásmido es un vector de expresión génica de mamífero que expresa el gen de fusión HSV1tk::Sh bajo el control del promotor híbrido EF-1 α /eIF4g. El HSV1tk es un gen suicida del virus de Herpes simple de serotipo 1 (HSV1) y codifica una enzima, timidina quinasa, que puede convertir el profármaco de ganciclovir análogo de guanósina (GCV) en monofosfato de ganciclovir (GCV-MP). El último después se convierte en las formas difosfato y trifosfato mediante quinasas endógenas. GCV-trifosfato carece del OH 3' en la desoxirribosa así como del enlace entre los carbonos 2' y 3' que son necesarios para la elongación de cadena de ADN. Como un resultado, la integración de GCV-trifosfato provoca la terminación de cadena ADN prematura y conduce a apoptosis. Por lo tanto, la expresión de HSV1tk sensibiliza las células de mamífero transfectadas hacia ganciclovir y es una de las estrategias suicidas únicas más ampliamente usadas para terapia génica de cáncer (Singhal y Kaiser, 1998). Como un control, se construyó un plásmido en el que la fusión del gen HSV1tk::Sh ble se suprimió escindiendo el plásmido pORF5-HSV1tk::Sh ble con enzimas de restricción *Nco*I y *Nhe*I, haciendo los extremos romos de los sitios con T4 ADN polimerasa y volviendo a ligar el plásmido. Los sitios *Nco*I y *Nhe*I son únicos en el plásmido pORF5-HSV1tk::Sh ble y flanquean la fusión génica de HSV1tk::Sh ble. El plásmido resultante denominado pORF5-HSV1tk- también se transformó en la cepa mutante *minCDE* de *S. typhimurium*.

Las minicélulas recombinantes que portan los plásmidos se purificaron usando el procedimiento de eliminación por gradiente de centrifugación/filamentación/filtración/eliminación de endotoxina descrito en la solicitud de patente internacional PCT/IB02/04632.

El anticuerpo biespecífico se construyó enlazando anticuerpos monoclonales anti-lipopolisacárido de *S. typhimurium* (Bioscience Resource Project, Saco, Maine, EE.UU.) y anti-receptor de andrógenos de ratón (IgG; Abcam, Cambridge, RU) a proteína recombinante purificada A/G a través de los fragmentos Fc de cada anticuerpo monoclonal y en resumen el procedimiento fue el siguiente.

La proteína recombinante purificada A/G (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, EE.UU.) se diluyó hasta una concentración final de 100 μ g/ml en tampón de unión Immunopure (Pierce Biotechnology) y 0,5 ml de la solución se incubaron durante una noche a 4°C con una solución premezclada que contenía 20 μ g/ml de cada uno de anticuerpos monoclonales anti-LPS de *S. typhimurium* (ResearchDiagnostics Inc., Flanders, NJ, EE.UU.) y anti-receptor de andrógenos humano (Abcam, Cambridge, RU). El exceso de anticuerpo no unido a proteína A/G después se eliminó de la manera siguiente. Solución Dynabeads® Protein G (Dynabeads® [2.8 μ m] revestidas con Proteína G recombinante unida covalentemente a la superficie de las partículas magnéticas; Dynal Biotech, Oslo, Noruega) se mezcló suavemente y 100 μ l de la solución se transfirieron a un tubo de centrifuga eppendorf. El tubo se colocó en el Dynal MPC-S (Concentrador de Partículas Magnéticas de tipo S) para inmovilizar las perlas y el sobrenadante se descartó. Las perlas se resuspendieron en 0,5 ml de solución de lavado que contenía tampón de Na-fosfato 0,1 M (pH 5,0). Las etapas de inmovilización y lavado de las perlas se repitieron tres veces. La solución que contiene el complejo proteína A/G-anticuerpo biespecífico se añadió a las perlas y se incubó con mezcla suave a temperatura ambiente durante 40 min. El tubo se colocó en el soporte de MPC-S para inmovilizar las perlas y el complejo de proteína A/G-anticuerpo biespecífico se eliminó con una pipeta. Esta etapa eliminó el exceso de anticuerpos monoclonales no unidos de la solución y proporcionó una solución que portaba el anticuerpo biespecífico enlazado a proteína A/G a través de sus fragmentos Fc.

10¹⁰ minicélulas recombinantes se incubaron con la proteína A/G-anticuerpo biespecífico durante 1 h a temperatura ambiente para revestir las minicélulas con el anticuerpo de su región Fab anti-LPS.

Células de carcinoma de próstata, LNCaP (ATCC, Rockville, MD, EE.UU.) se cultivaron hasta confluencia total en matraces T-75 en medio RPMI 1640 complementado con FCS al 10% y antibióticos. Se realizaron pases de las células en matraces T-25 a confluencia del 50%. Después de fijación durante una noche, el medio de cultivo se

renovó y a un matraz se añadieron 10^7 minicélulas recombinantes que portaban plásmido pORF5-HSVtk::Sh ble (minicélulas recombinantes no dirigidas) y a otro matraz se añadieron 10^7 de las mismas minicélulas pero que portaban anticuerpo biespecífico unido a la superficie celular (minicélulas recombinantes dirigidas). La proporción de minicélulas a células de carcinoma de próstata fue 100:1. Las células transfectadas se incubaron en una incubadora en CO₂ al 5% y 37°C durante 16, 24 y 36 h seguido por cuatro lavados (5 ml por lavado) con medio de Dulbecco 1x nuevo con agitación suave. Todas las células se trataron con tripsina y después se pasaron en cubreobjetos de 13 mm en placas de 24 pocillos (cada punto de tiempo por triplicado), con los números de células en sub-confluencia.

Las células en los cubreobjetos se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 30 min y se bloquearon con suero de cabra normal al 5% durante una noche seguido por tinción con anticuerpo monoclonal anti-LPS de *S. typhimurium* (1:200; Biodesign, Saco, Maine, EE.UU.). La unión de anticuerpo se reveló con anti-IgG de ratón de cabra conjugado con Alexa Fluor 594 (1:1000, fluorescencia roja; excitación 590 nm y emisión 617 nm; Molecular Probes, Eugene, OR, EE.UU.) y se visualizó mediante microscopía confocal de fluorescencia (Fluoview, Olympus America, Melville, NY, EE.UU.). Las imágenes de fluorescencia y de Contraste de Imagen Diferencial (CID) se recogieron y superpusieron como se muestra en la Figura 1.

Los resultados mostraron que las minicélulas recombinantes no dirigidas no se adhirieron específicamente o se internalizaron en las células de carcinoma de próstata LNCaP en ninguno de los puntos de tiempo analizados (Fig. 1B y 1D) y las células se observaban iguales a las células no transfectadas de control. Todos los campos analizados revelaron fluorescencia roja de fondo menor. Por el contrario, se observó que las minicélulas recombinantes dirigidas se adherían de forma marcada a las células LNCaP presumiblemente a través de la unión del anticuerpo biespecífico de dirección al receptor de andrógenos de superficie celular. Adicionalmente, en los puntos de tiempo 16 h y 24 h de incubación, la mayoría de las células LNCaP mostraron fluorescencia roja intensa dentro del citoplasma de las células (Fig. 1C, 1E y 1F) indicando que las minicélulas se habían internalizado a través de endocitosis mediada por receptor.

Este resultado sugirió que las minicélulas que portan anticuerpo biespecífico unido a superficie mediaban la unión altamente eficaz de las minicélulas al receptor de superficie celular encontrado en una célula de mamífero (receptor de andrógenos en el ejemplo anterior) y que las minicélulas adherentes se internalizaban rápidamente por las células de mamífero no fagocíticas (célula de carcinoma de próstata en el ejemplo anterior).

Ejemplo 2. Unión e internalización mediada por receptor altamente eficaz de minicélulas dirigidas a anticuerpo biespecífico en células de adenocarcinoma mamario humano no fagocíticas

El Ejemplo 1 demostró que un anticuerpo biespecífico con una especificidad de unión anti-LPS (especificidad de minicélula) y anti-receptor de andrógenos puede posibilitar eficazmente la unión marcada al receptor de andrógenos en una célula de mamífero no fagocítica, la célula de carcinoma de próstata. Adicionalmente, los resultados demostraron que la unión del receptor desencadenó endocitosis mediada por receptor de las minicélulas recombinantes a una eficacia elevada. Este ejemplo demuestra que el fenómeno observado anteriormente es generalizado y que la invención y el descubrimiento son aplicables a una diversidad de receptores con capacidad de endocitosis diferentes en células de mamífero no fagocíticas diferentes.

Más específicamente, este experimento muestra que las células de adenocarcinoma mamario humano (MDA-MB-468, ATCC; células epiteliales mamarias humanas; no fagocíticas) se pueden dirigir a través de un anticuerpo biespecífico que porta fragmentos Fab con especificidad de unión anti-LPS de *S. typhimurium* (especificidad de unión a la superficie de la minicélula) y anti-receptor del factor del crecimiento epidérmico (EGFR). Las células de la línea celular MDA-MB-468 se cultivaron en cultivo de tejido como se ha descrito para las células de carcinoma de próstata en el Ejemplo 1. El anticuerpo biespecífico se construyó como se ha descrito en el Ejemplo 1, con la excepción de que el anticuerpo monoclonal anti-receptor de andrógenos se reemplazó con anticuerpo monoclonal anti-EGFR (Oncogene Research Products, Cambridge, MA, EE.UU.) Las minicélulas recombinantes dirigidas y no dirigidas se generaron y usaron para transfectar las células MDA-MB-468 y las células se tiñeron para LPS de *S. typhimurium* (minicélulas) en intervalos de tiempo de 16 horas, 24 horas y 36 horas como se ha descrito anteriormente para las células de carcinoma de próstata.

Los resultados revelaron (Fig. 2) que las células de control y las células tratadas con minicélulas no dirigidas mostraban únicamente fluorescencia roja de fondo menor en todos los puntos de tiempo (Figs. 2A y 2B), sugiriendo que las minicélulas eran incapaces de adherirse y de transfectarse a las células de mamífero no fagocíticas. Por el contrario, las células tratadas con minicélulas dirigidas mostraron fluorescencia roja marcada en el citoplasma después de 24 h de incubación y la fluorescencia aumentó para cubrir más del citoplasma después de 36 h (Figs. 2C-E). Esto sugirió que el anticuerpo biespecífico posibilita la unión marcada de las minicélulas al receptor EGF en la superficie de células MDA-MB-468 y que la unión desencadenaba endocitosis mediada por receptor de las minicélulas.

Ejemplo 3. Unión e internalización mediada por receptor altamente eficaz de minicélulas dirigidas a anticuerpo biespecífico en células de carcinoma ovárico humano no fagocíticas

5 Los Ejemplos 1 y 2 demostraron que un anticuerpo biespecífico con especificidad de unión anti-LPS (especificidad de minicélula) y anti-receptor de andrógenos o especificidad anti-EGFR puede posibilitar eficazmente la unión marcada al receptor de andrógenos o EGFR en células de carcinoma de próstata no fagocíticas y células de carcinoma mamario respectivamente. Adicionalmente, los resultados demostraron que la unión a receptor desencadenaba endocitosis mediada por receptor de las minicélulas recombinantes a una eficacia elevada. Este ejemplo demuestra además la aplicabilidad general de la invención y el descubrimiento.

10 Por consiguiente, este experimento demuestra que las células de carcinoma ovárico humano (SKOV-3, ATCC; células epiteliales; no fagocíticas) se puede dirigir a través de un anticuerpo biespecífico que porta fragmentos Fab con especificidad de unión anti-LPS de *S. typhimurium* (especificidad de unión de superficie de minicélula) y anti-receptor Her2/neu humano de ratón (Serotec Inc., Raleigh, NC, EE.UU.). Se conoce que las células SKOV-3 sobreexpresan el receptor Her2 (Salomon y col. 1995). Este experimento se realizó como se ha descrito en los
15 Ejemplos 1 y 2 y las muestras se tiñeron para anti-LPS (fluorescencia roja) como anteriormente.

Los resultados (Fig. 3) fueron similares a aquellos obtenidos en los ejemplos 1 y 2. Las células SKOV-3 de control y aquellas tratadas con minicélulas no dirigidas, mostraron únicamente fluorescencia roja de fondo menor.

Ejemplo 4. Administración de genes altamente eficaz a células de mamífero no fagocíticas a través de dirección mediada por anticuerpo biespecífico de minicélulas recombinantes

20 Los experimentos anteriores demostraron unión altamente eficaz de minicélulas a células de mamífero no fagocíticas, por ejemplo células de cáncer epitelial humano. Este ejemplo demuestra que las células de mamífero no fagocíticas tienen un mecanismo intracelular eficaz para degradar las partículas que se han sometido a endocitosis que son tan grandes como las minicélulas (400 nm de diámetro). Este ejemplo también demuestra que el ADN de plásmido envuelto en minicélulas puede escapar de los procedimientos de degradación intracelulares, escapar de
25 las membranas endosómicas, entrar al citoplasma, entrar al núcleo de la célula y expresarse de forma recombinante. De hecho, las minicélulas pueden administrar eficazmente genes a células no fagocíticas, lo que indica que las aplicaciones de la invención son herramientas de transfección *in vitro* útiles.

Células de cáncer mamario humano (MDA-MB-468) se incubaron con minicélulas no dirigidas de control, no dirigidas específicamente y dirigidas a EGFR experimentales que portaban un plásmido que codifica el antígeno de Superficie de la Hepatitis B viral (HbsAg; Aldevron, EE.UU.). Se construyó BsAb no dirigido específicamente usando anticuerpo monoclonal anti-citomegalovirus (CMV) y Mab anti-LPS de *S. typhimurium*. En los intervalos de tiempo de 4 horas, 8 horas, 16 horas, 24 horas y 36 horas, las células se lavaron y se fijaron con paraformaldehído al 4% y se bloquearon con suero de cabra normal al 5%/BSA al 2%. La permeabilidad de membrana se aumentó con Tritón X-100 al 1% en PBS y las células se trataron con MAb anti-HbsAg (Aldevron, diluido en 1:100) seguido por anti-IgG de ratón de
35 cabra conjugado con Alexa Fluor 594 (Molecular probes, diluido en 1:1000). Las células que expresan proteína HbsAg se analizaron mediante Microscopía Confocal. Para determinar la eficacia de administración génica, las células se analizaron mediante Citometría de Flujo. Para análisis FACS, las células se trataron con MAb anti-HBsAg seguido por anti-IgG de ratón de cabra conjugado con Ficoeritrina (PE) en lugar de Alexa Fluor 594 porque el análisis FACS es más sensible a PE en comparación con Alexa Fluor 594.

40 Los resultados relevaron que únicamente las minicélulas dirigidas a EGFR produjeron una eficacia de administración génica de más del 95% (Fig. 4Aiv). La expresión de proteína recombinante (células que fluorescen rojo brillante; Fig. 4Bii - iii) se observó 16 horas después de la transfección (Fig. 4Aiv) y en puntos de tiempo posteriores, sugiriendo niveles significativos de proteína recombinante por célula. Todas las células de control mostraron únicamente puntos de fluorescencia roja de fondo (Fig. 4Bi).

45 Estos resultados fueron sorprendentes debido a que no se sabía que las células no fagocíticas podrían portar un mecanismo intracelular tan eficaz para degradar partículas sometidas a endocitosis que son tan grandes como minicélulas (400 nm de diámetro) y que portan una membrana biológica rígida. Adicionalmente, se observó un nivel inesperadamente elevado de eficacia (mayor del 95%) de administración génica a células de mamífero no fagocíticas. Estos resultados indican que las aplicaciones de la invención son herramientas de transfección *in vitro*
50 útiles. Ninguna de las herramientas disponibles actualmente consigue un grado tan elevado de administración génica específica a células de mamífero no fagocíticas.

Ejemplo 5. Dirección mediada por anticuerpo biespecífico de minicélulas a xenoinjertos de cáncer mamario humano en ratones desnudos atímicos hembra.

Este ejemplo demuestra que las minicélulas recombinantes dirigidas que portan un plásmido que codifica el gen HSVtk pueden lograr la regresión de xenoinjertos de tumor de células de cáncer mamario humano establecidos en ratones desnudos atímicos hembra de 6 semanas de edad.

El anticuerpo biespecífico se construyó como se ha descrito en el Ejemplo 1, con la excepción de que en lugar del anticuerpo monoclonal anti-receptor de andrógenos, se usó el anticuerpo monoclonal anti-receptor del factor de crecimiento epidérmico (anti-EGFR) (Oncogene Research Products, Cambridge, MA, EE.UU.). Esto se debió a que las células xenoinjertadas eran células de cáncer mamario humano MDA-MB-468 que se conoce que sobreexpresan el receptor EGF en la superficie celular. Los ratones se adquirieron en Animal Resources Centre, Perth, WA, y todos los experimentos animales se realizaron de conformidad con la guía para el 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). Las células de cáncer mamario humano MDA-MB-468 se cultivaron como se ha descrito en el ejemplo 2 y $1,5 \times 10^6$ células en 50 μ l de medio sin suero junto con 50 μ l de factor de crecimiento reducido matrigel (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, EE.UU.) se inyectaron por vía subcutánea entre los omóplatos de cada ratón usando una aguja de calibre 23. Los tumores se midieron dos veces a la semana usando un calibrador digital electrónico (Mitutoyo, Japón, precisión a 0,001) y el volumen del tumor se calculó usando la fórmula, longitud (mm) x anchura² (mm) X 0,5 = volumen (mm³). 21 días después del implante los tumores alcanzaron volúmenes entre 50 mm³ y 80 mm³ y los ratones se aleatorizaron en seis grupos diferentes de 12 por grupo.

El experimento se diseñó de la manera siguiente. El Grupo 1 (control) no recibió tratamiento. El Grupo 2 (control) recibió minicélulas recombinantes no dirigidas que portaban el plásmido pORF5- HSVtk::Sh ble (denominado M-HSVtk) los días 21, 28 y 35. Los ratones también recibieron GCV los días 25, 26, 32, 33, 39 y 40, es decir, dos dosis de GCV en días sucesivos. Este grupo se diseñó para determinar si las minicélulas no dirigidas podían administrar el gen suicida a las células tumorales e influir sobre la regresión tumoral a continuación de tratamiento con GCV. El Grupo 3 (control) se diseñó para determinar si el tratamiento con minicélulas recombinantes dirigidas que portaban el plásmido pORF5-HSVtk::Sh ble en ausencia de GCV tenían algún efecto sobre la regresión tumoral. Por lo tanto, los ratones del Grupo 3 recibieron minicélulas recombinantes dirigidas que portaban plásmido pORF5-HSVtk::Sh ble (denominado TM-HSVtk) los mismos días que el Grupo 2 pero no recibieron tratamiento con GCV. El Grupo 4 (control) se diseñó para determinar si el anticuerpo biespecífico en ausencia de minicélulas recombinantes tenía algún efecto sobre la regresión tumoral. Por lo tanto, estos ratones recibieron el anticuerpo biespecífico los mismos días que se proporcionaron las minicélulas dirigidas o no dirigidas recombinantes, es decir, días 21, 28 y 35. El tratamiento de anticuerpo se siguió por tratamiento de GCV los mismos días que para el Grupo 2. El Grupo 5 (experimental) se diseñó para determinar si las minicélulas recombinantes dirigidas que portaban plásmido pORF5-HSVtk::Sh ble podían eficazmente administrar el plásmido a las células tumorales xenoinjertadas y si la regresión tumoral se podría observar a continuación del tratamiento de los ratones con una dosis única de GCV después de cada dosis de minicélula. Por lo tanto, el grupo 5 recibió minicélulas recombinantes dirigidas los mismos días que el Grupo 3 seguido por tratamiento con GCV los días 25, 33 y 39. El Grupo 6 (experimental) fue el mismo que el grupo 5 pero recibió dos dosis de GCV en días sucesivos, como para los grupos 2 y 4.

Los ratones que recibían las minicélulas respectivas se inyectaron por vía intratumoral con 10^8 minicélulas resuspendidas en 30 μ l de solución salina fisiológica estéril. Los experimentos de dirección génica *in vitro* en células MDA-MB-468 habían revelado que el plásmido administrado en minicélulas expresaba la enzima de HSVtk después de al menos 48 h después de la transfección con las minicélulas recombinantes dirigidas. Por lo tanto, a los grupos 2, 4, 5 y 6 se proporcionó GCV después de 3 a 4 días después de la inoculación con minicélulas para permitir que las células de xenoinjerto de tumor transfectadas expresaran suficientemente la enzima de HSVtk para ser sensibles a GCV. GCV se administró por vía intraperitoneal a una concentración de 100 mg/kg de peso de ratón.

La Figura 5 muestra la progresión en el volumen de tumor a lo largo del ciclo del experimento. Los resultados revelaron que únicamente las minicélulas recombinantes dirigidas (Grupos 5 y 6) eran capaces de administrar satisfactoriamente el gen HSVtk que codifica el plásmido a las células de tumor xenoinjertadas. Los volúmenes de tumor en estos dos grupos no aumentaron de tamaño y permanecieron estables a través de todo el ciclo del experimento. Por el contrario, los volúmenes de tumor aumentaron rápidamente en los cuatro grupos de control (Grupos 1-4). De forma interesante, los ratones del grupo 2 tampoco demostraron ninguna evidencia de regresión de tumor, sugiriendo que las minicélulas recombinantes no dirigidas no pudieron transfectar las células de cáncer mamario humano y conseguir un resultado clínicamente significativo. El análisis estadístico de los datos usando ANOVA de Una vía demostró que los grupos experimentales (5 y 6) eran altamente significativos en comparación con los grupos de control 1 a 4 ($p=0,001$). Este resultado es una primera demostración de la administración génica *in vivo* dirigida a células de mamífero no fagocíticas mediada por minicélulas recombinantes intactas obtenidas de bacterias. También demuestra un papel de la endocitosis mediada por receptores de las minicélulas para conseguir administración génica altamente significativa a estas células de mamífero no fagocíticas (comparar grupo 2 con los grupos 5 y 6).

Los resultados de este experimento demuestran la significancia de las composiciones y los procedimientos inventivos para dirigir minicélulas a células de mamífero deseadas *in vivo*. Los resultados también demuestran el potencial para la aplicación clínica de minicélulas dirigidas, particularmente en el desarrollo de agentes terapéuticos para el cáncer.

5 **Ejemplo 6. Minicélulas que portan plásmido suicida dirigidas a receptor EGF sobreexpresado en xenoinjertos de cáncer mamario humano, provocan eficazmente la regresión de tumor en ratones desnudos**

Los estudios de xenoinjerto descritos anteriormente se realizaron mediante inyección intratumoral (i.t.) de minicélulas. Para evaluar el potencial de la dirección de minicélulas a receptores en la superficie de células no fagocíticas (células de cáncer humano) a través de la administración sistémica y conseguir la
10 estabilización/regresión del tumor *in vivo*, se diseñó otro estudio de xenoinjerto en el que las minicélulas se inyectaron por vía intravenosa.

Por consiguiente, se construyeron y purificaron minicélulas recombinantes que portan plásmido pORF5-HSV1tk::Sh ble (HSV1tk). Las minicélulas se dirigieron al EGFR humano que se había demostrado que estaba sobreexpresado en células MDA-MB-468 de cáncer mamario humano. Esto se consiguió construyendo un anticuerpo biespecífico con especificidades anti-EGFR humano y anti-LPS de *S. typhimurium* y uniendo el BsAb a la superficie de las minicélulas, como se ha descrito en el Ejemplo 1. Los xenoinjertos se establecieron por vía subcutánea (s.c.) entre los omóplatos de ratones desnudos ($n = 11$ por grupo) y las minicélulas experimentales y de control se administraron i.v. en la vena de la cola los días mostrados (Fig. 6). Los grupos 2, 4, 6 y 7 también recibieron GCV (i.p.) en los días mostrados.

Los resultados revelaron una estabilización/regresión significativa de los tumores establecidos únicamente en ratones tratados con minicélulas_{HSV1tk} dirigidas a EGFR. Ambas dosis de minicélulas 10^8 ó 10^9 por dosis fueron igualmente eficaces, indicando que la metodología de dirección es altamente eficaz y potencia el índice terapéutico, lo que hace que la concentración del vector sea un factor menos que limitante. El análisis estadístico de los datos usando ANOVA de Una vía demostró que los resultados en los grupos experimentales (6 y 7) eran altamente
25 significativos en comparación con los grupos de control 1 a 5 ($p=0,0001$). Estos datos mostraron que la tecnología de dirección de minicélulas era altamente eficaz para reposicionar las minicélulas en la masa del tumor, incluso cuando se inyectaban en un sitio alejado del tumor. Los datos también mostraron que la administración sistémica de minicélulas dirigidas no provocaba signos manifiestos de toxicidad en los ratones. A través de todo el estudio, no hubo signos manifiestos de toxicidad, tales como fiebre, aletargamiento, pérdida de apetito, pérdida de peso o muerte.
30

Ejemplo 7. Las minicélulas que portan plásmido suicida dirigidas a receptor HER2/*neu* subexpresado en xenoinjertos de cáncer mamario humano, provocan la regresión eficaz de tumor en ratones desnudos

Los resultados *in vivo* descritos anteriormente, indicaron que las minicélulas podrían dirigirse eficazmente a receptores sobreexpresados en células enfermas, tales como células de cáncer. Este ejemplo muestra la eficacia de un vector de minicélula cuando se dirige a un receptor muy poco expresado en la superficie de la célula de cáncer. En enfoques convencionales la dirección de receptores muy poco expresados es un obstáculo grave para el desarrollo de agentes terapéuticos basados en anticuerpo, particularmente para el tratamiento de cáncer, debido a que muchas células de cáncer no sobreexpresan receptores dirigidos. Por ejemplo, el receptor HER2/*neu* se sobreexpresa en menos del 20% de los pacientes con cáncer mamario.

Por consiguiente, se diseñó un estudio de xenoinjerto en el que el vector de minicélula_{HSV1tk} se dirigió al receptor HER2/*neu* que se conoce que se expresa muy poco en las células de cáncer mamario MAD-MB-468. Los grupos experimental y de control (Fig. 7) fueron los mismos que en el Ejemplo 6, con la excepción de que se incluyó un grupo experimental más (G8) en el que se inyectó por vía intratumoral minicélula_{HSV1tk} dirigida a HER2/*neu*. Los resultados (Fig. 7) mostraron que, aunque el receptor HER2/*neu* se expresa muy poco, los tratamientos
40 experimentales fueron tan eficaces para conseguir la estabilización/regresión tumoral como en el caso del Ejemplo 6, en el que el vector de minicélula_{HSV1tk} se dirigió al receptor EGF sobreexpresado. El mismo número de dosis (3x) de minicélula_{HSV1tk} dirigida fue necesario para conseguir el resultado. En este experimento, una vez que los tumores residuales empezaron a crecer entre los días 53 y 81, se administró una cuarta dosis de la minicélula_{HSV1tk} dirigida a HER2/*neu*, dando como resultado una caída rápida en los volúmenes de tumor en los grupos 6 y 7. El análisis estadístico de los datos usando ANOVA de una vía, mostró que los grupos experimentales (6, 7 y 8) eran altamente
50 significativos en comparación con los grupos de control 1 a 5 ($p=0,0001$).

PUBLICACIONES CITADAS

- 55 Balicki y Beutler. Gene therapy of human disease. Medicine (Baltimore). 2002 Jan; 81(1): 69-86.
Batra RK, Wang-Johanning F, Wagner E, Garver RI Jr, Curiel DT. Receptor-mediated gene delivery employing lectin-binding specificity. Gene Ther. Julio 1994; 1(4): 255-60.
Becker CM, Farnebo FA, Iordanescu I, Behonick DJ, Shih MC, Dunning P, Christofferson R, Mulligan RC, Taylor GA, Kuo CJ, Zetter BR. Gene therapy of prostate cancer with the soluble vascular endothelial growth factor receptor Fikl. Cancer Biol Ther. Sep-Oct 2002; 1(5): 548-53.

- Bondoc, LL y Fitzpatrick S. Size distribution analysis of recombinant adenovirus using disc centrifugation. *J Indust Micro Biotechnol.* 20: 317-322 (1998).
- Britton y col., "Characterization of a prokaryotic SMC protein involved in chromosome partitioning", *Genes Dev.* 12: 1254 (1998). Carter, P. Improving the efficacy of antibody-based cancer therapies. *Nat Rev Cancer.* Nov 2001; 1(2): 118-29.
- Carter, P. Improving the efficacy of antibody-based cancer therapies. *Nat Rev Cancer.* Nov 2001; 1(2): 118-29.
- Ciliberto y col., "Cell-specific expression of a transfected human alpha 1-antitrypsin gene", *Cell.* 41: 531 (1985).
- Conner SD, Schmid SL. Regulated portals of entry into the cell. *Nature.* 6 Marzo 2003; 422(6927): 37-44.
- Curiel y col., "Long-term inhibition of clinical and laboratory human immunodeficiency virus strains in human T-cell lines containing an HIV-regulated diphtheria toxin A chain gene", *Hum. Gene Ther.* 4: 741 (1993).
- de Boer y col., "Roles of MinC and MinD in the sitespecific septation block mediated by the MinCDE system of *Escherichia coli*", *J. Bacteriol.* 174: 63 (1992).
- de Haard, H. J. y col. A large non-immunized human Fab fragment phage library that permits rapid isolation and kinetic analysis of high affinity antibodies. *J. Biol. Chem.* 274, 18218-18230(1999).
- Dinges y col., "HIV-regulated diphtheria toxin A chain gene confers long-term protection against HIV type 1 infection in the human promonocytic cell line U937", *Hum. Gene Ther.* 6: 1437 (1995).
- Dubel S, Breitling F, Kontermann R, Schmidt T, Skerra A, Little M. Bifunctional and multimeric complexes of streptavidin fused to single chain antibodies (scFv). *J. Immunol. Methods* (1995) 178, 201-209.
- Fernández T, Bayley H. 1998. Ferrying proteins to the other side. *Nat Biotechnol* 16: 418-430.
- Frain y col., "Binding of a liver-specific factor to the human albumin gene promoter and enhancer", *Mol. Cell Biol.* 10: 991 (1990).
- Glennie MJ, McBride HM, Worth AT, Stevenson GT. Preparation and performance of bispecific F(ab' gamma)2 antibody containing thioether-linked Fab' gamma fragments. *J Immunol.* 1987 Oct 1; 139(7): 2367-75.
- Gosselin MA, Lee RJ. Folate receptor-targeted liposomes as vectors for therapeutic agents. *Biotechnol Annu Rev.* 2002; 8: 103-31.
- Griffiths, A. D. y col. Isolation of high affinity human antibodies directly from large synthetic repertoires. *EMBO J.* 13, 3245-3260 (1994).
- Grillot-Courvalin C, Goussard S, Courvalin P. Wildtype intracellular bacteria deliver DNA into mammalian cells. *Cell Microbiol.* Marzo 2002; 4(3): 177-86.
- Hanahan, Heritable formation of pancreatic beta-cell tumours in transgenic mice expressing recombinant insulin/simian virus 40 oncogenes. 1985 Mayo 9-15; 315(6015): 115-122.
- Harrison y col., "Inhibition of human immunodeficiency virus-1 production resulting from transduction with a retrovirus containing an HIV-regulated diphtheria toxin A chain gene" *Hum. Gene Ther.* 3: 461 (1992a).
- Harrison y col., "Inhibition of HIV production in cells containing an integrated, HIV-regulated diphtheria toxin A chain gene", *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 8: 39 (1992b).
- Harry, "Bacterial cell division: Regulating Z-ring formation", *Mol. Microbiol.* 40: 795 (2001).
- Hart, "Tissue specific promoters in targeting systematically delivered gene therapy", *Semin. Oncol.* 23: 154 (1996).
- Heim y col., "Wavelength mutations and posttranslational autooxidation of green fluorescent protein", *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 91: 12501 (1994).
- Hiraga y col., "Chromosome partitioning in *Escherichia coli*: novel mutants producing anucleate cells", *J. Bacteriol.* 171: 1496 (1989).
- Hoshida T, Sunamura M, Duda DG, Egawa S, Miyazaki S, Shineha R, Hamada H, Ohtani H, Satomi S, Matsuno S. Gene therapy for pancreatic cancer using an adenovirus vector encoding soluble flt-1 vascular endothelial growth factor receptor. *Pancreas.* Agosto 2002; 25(2): 111-21.
- Hu, S, L Shively, A Raubitschek, M Sherman, LE Williams, JY Wong, JE Shively, and AM Wu. Minibody: A novel engineered anti-carcinoembryonic antigen antibody fragment (single-chain Fv-CH3) which exhibits rapid, high-level targeting of xenografts *Cancer Res.* 1996 56: 3055-3061.
- 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).
- Hudson, P.J. y Souriau, C. Recombinant antibodies for cancer diagnosis and therapy. *Expert Opin. Biol. Ther.* 1, 845-855 (2001).
- Hudson PJ, Souriau C. Engineered antibodies. *Nat Med.* Enero 2003; 9 (1): 129-34.
- Hung MC, Hortobagyi GN, Ueno NT. Development of clinical trial of E1A gene therapy targeting HER-2/neu-overexpressing breast and ovarian cancer. *Adv Exp Med Biol.* 2000; 465: 171-80.
- Ireton y col., "spo0J is required for normal chromosome segregation as well as the initiation of sporulation in *Bacillus Subtilis*", *J. Bacteriol.* 176: 5320 (1994).
- Jones, P. T., Dear, P. H., Foote, J., Neuberger, M. S. y Winter, G. Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature* 321, 522-525 (1986).
- Katabi y col., "Hexokinase Type II: A Novel Tumor Specific Promoter for Gene-Targeted Therapy Differentially Expressed and Regulated in Human Cancer Cells", *Human Gene Therapy* 10: 155 (1999).
- Kaetzel CS, Blanch VJ, Hempen PM, Phillips KM, Piskurich JF, Youngman KR (1997): The polymeric immunoglobulin receptor: structure and synthesis. *Biochem Soc Trans* 25: 475-480.
- Karpovsky B, Titus JA, Stephany DA, Segal DM. Production of target-specific effector cells using heterocross-

- linked aggregates containing anti-target cell and anti-Fc gamma receptor antibodies. *J Exp Med.* 1 Diciembre 1984; 160(6): 1686-701.
- Kelsey y col., "Species- and tissue-specific expression of human alpha 1-antitrypsin in transgenic mice", *Genes and Devel.* 1: 161 (1987).
- 5 Kerem y col., "Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis", *Science* 245: 1073 (1989).
- Khare, P. D. y col. Tumor growth suppression by a retroviral vector displaying scFv antibody to CEA and carrying the iNOS gene. *Anticancer Res.* 22, 2443-2446 (2002).
- Kleeff J, Fukahi K, Lopez ME, Friess H, Buchler MW, Sosnowski BA, Korc M. Targeting of suicide gene delivery in pancreatic cancer cells via FGF receptors. *Cancer Gene Ther.* Junio 2002;9(6): 522-32.
- 10 Knappik, A. y col. Fully synthetic human combinatorial antibody libraries (HuCAL) based on modular consensus frameworks and CDRs randomized with trinucleotides. *J. Mol. Biol.* 296, 57-86 (2000).
- Kostelny SA, Cole MS, Tso JY. Formation of a bispecific antibody by the use of leucine zippers. *J Immunol.* 1 Marzo 1992; 148(5): 1547-53.
- 15 Kurane y col., "Targeted Gene Transfer for Adenocarcinoma Using a Combination of Tumor specific Antibody and Tissue-specific Promoter", *Jpn. J. Cancer Res.* 89: 1212 (1998).
- Levin y col., "Identification of *Bacillus subtilis* genes for septum placement and shape determination", *J. Bacteriol.* 174: 6717 (1992).
- Leder y col., "Consequences of widespread deregulation of the c-myc gene in transgenic mice: multiple neoplasms and normal development", *Cell* 45: 485 (1986).
- 20 MacDonald y col., "Expression of the pancreatic elastase I gene in transgenic mice", *Hepatology* 7: 425 (1987).
- Marshall. Carcinoembryonic antigen-based vaccines. *Semin. Oncol.* Junio 2003; 30 (3 Suppl. 8): 30-36.
- Mason y col., "The hypogonadal mouse: reproductive functions restored by gene therapy", *Science* 234: 1372 (1986).
- 25 Morton y Potter, "Rhabdomyosarcoma-specific expression of the herpes simplex virus thymidine kinase gene confers sensitivity to ganciclovir", *J. Pharmacology & Exper. Therapeutics* 286: 1066 (1998).
- Okada y col., "Possible function of the cytoplasmic axial filaments in chromosomal segregation and cellular division of *Escherichia coli*", *Sci. Prog.* 77: 253 (1993-94).
- Okada y col., "Cytoplasmic axial filaments in *Escherichia coli* cells: possible function in the mechanism of chromosome segregation and cell division", *J. Bacteriol.* 176: 917 (1994).
- 30 Osbourn, J., Jermutus, L., Duncan, A. Current methods for the generation of human antibodies for the treatment of autoimmune diseases. *Drug Delivery Tech* 8: 845-851 (2003).
- Pack P, Pluckthun A. Miniantibodies: use of amphipathic helices to produce functional, flexibly linked dimeric Fv fragments with high avidity in *Escherichia coli*. *Biochemistry.* 1992 Feb 18; 31(6): 1579-84.
- 35 PCT IB02/04632
- Phelan A, Elliott G, O'Hare P. 1998. Intercellular delivery of functional p53 by the herpesvirus protein VP22. *Nat Biotechnol* 16: 440-443.
- Pinkert y col., "An albumin enhancer located 10 kb upstream functions along with its promoter to direct efficient, liver-specific expression in transgenic mice", *Genes and Devel.* 1: 268 (1987).
- 40 Prasher y col., "Using GFP to see the light", *Trends in Genetics* 11: 320 (1995).
- Ragheb y col., "Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 by Tat/Rev-regulated expression of cytosine deaminase, interferon alpha2, or diphtheria toxin compared with inhibition by transdominant Rev", *Hum. Gene Ther.* 10: 103 (1999).
- Raskin y de Boer, "MinDE-dependent pole-to-pole oscillation of division inhibitor MinC in *Escherichia coli*", *J. Bacteriol.* 181: 6419 (1999).
- 45 Readhead y col., "Myelin deficient mice: expression of myelin basic protein and generation of mice with varying levels of myelin", *Cell* 48: 703 (1987).
- Reeve, "Use of minicells for bacteriophage-directed polypeptide synthesis", *Methods Enzymol.* 68: 493 (1979).
- Reeve y Cornett. Bacteriophage SPO1-induced macromolecular synthesis in minicells of *Bacillus subtilis*. *J. Virol.* Junio 1975; 15(6): 1308-16.
- 50 Ridgway JB, Presta LG, Carter P. 'Knobs-into-holes' engineering of antibody CH3 domains for heavy chain heterodimerization. *Protein Eng.* Julio 1996; 9 (7): 617-21.
- Riechmann, L., Clark, M., Waldmann, H. y Winter, G. Reshaping human antibodies for therapy. *Nature* 332, 323-327 (1988).
- 55 Riordan y col., "Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA", *Science* 245: 1066 (1989).
- Rojas M, Donahue JP, Tan Z, Lin YZ. 1998. Genetic engineering of proteins with cell membrane permeability. *Nat Biotechnol* 16(4): 370-375.
- Romano y col., Gene transfer technology in therapy: current applications and future goals. *Stem Cells.* 1999; 17(4): 191-202.
- 60 Romano y col., Recent advances, prospects and problems in designing new strategies for oligonucleotide and gene delivery in therapy. *In Vivo.* Enero-Febrero 1998; 12(1): 59-67.
- Rommens y col., "Identification of the cystic fibrosis gene: Chromosome walking and jumping", *Science* 245: 1059 (1989).
- 65 Salomon DS, Brandt R, Ciardiello F, Normanno N. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol* 1995, 19, 183-232.

- Shangara y col., "Suicide genes: past, present and future perspectives", *Immunology Today* 21: 48 (2000).
- Sheets, M. D. y col. Efficient construction of a large nonimmune phage antibody library: the production of high-affinity human single-chain antibodies to protein antigens. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 95, 6157-6162 (1998).
- Singh, Transferrin as a targeting ligand for liposomes and anticancer drugs. *Curr Pharm Des.* Junio 1999; 5 (6): 443-51.
- Singhal y Kaiser, Cancer chemotherapy using suicide genes. *Surg Oncol Clin N Am.* Julio 1998; 7(3): 505-36.
- Spencer, "Developments in suicide genes for preclinical and clinical applications", *Molecular Therapeutics* 2: 433 (2000).
- Stewart y D'Ari, "Genetic and morphological characterization of an *Escherichia coli* chromosome segregation mutant", *J. Bacteriol.* 174: 4513 (1992).
- Stockert. The asialoglycoprotein receptor: relationships between structure, function, and expression. *Physiol Rev.* Julio 1995; 75(3): 591-609.
- Swift y col., "Tissue-specific expression of the rat pancreatic elastase I gene in transgenic mice", *Cell* 38: 639 (1984).
- Thomas, C. E., Edwards, P., Wickham, T. J., Castro, M. G. & Lowenstein, P. R. Adenovirus binding to the coxsackievirus and adenovirus receptor or integrins is not required to elicit brain inflammation but is necessary to transduce specific neural cell types. *J. Virol.* 76, 3452-3460 (2002).
- Thomas CE, Ehrhardt A, Kay MA. Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nat Rev Genet.* Mayo 2003; 4(5): 346-58.
- Thurnher M, Wagner E, Clausen H, Mechtler K, Rusconi S, Dinter A, Birnstiel ML, Berger EG, Cotten M. Carbohydrate receptor-mediated gene transfer to human T leukaemic cells. *Glycobiology.* Agosto 1994; 4(4): 429-35.
- Todorovska, A. y col. Design and application of diabodies, triabodies and tetrabodies for cancer targeting. *J. Immunol. Methods* 248, 47-66 (2001).
- Tomlinson, I. y Holliger, P. Methods for generating multivalent and bispecific antibody fragments. *Methods Enzymol.* 326,461-479 (2000).
- Vaughan, T. J. y col. Human antibodies with subnanomolar affinities isolated from a large non-immunized phage display library. *Nature Biotechnol.* 14, 309-314 (1996).
- Vaughan, T. J., Osbourn, J. K. & Tempest, P. R. Human antibodies by design. *Nature Biotechnol.* 16, 535-539 (1998).
- Verhoeyen, M., Milstein, C. & Winter, G. Reshaping human antibodies: grafting an antilysozyme activity. *Science* 239, 1534-1536 (1988).
- Wachi y col., "New mre genes mreC and mreD, responsible for formation of the rod shape of *Escherichia coli* cells", *J. Bacteriol.* 171: 6511 (1989).
- Wadhwa. Cancer gene therapy: scientific basis. *Annu. Rev. Med.* 2002; 53: 437-52.
- Wickham. Ligand-directed targeting of genes to the site of disease. *Nat Med.* Enero 2003; 9(1): 135-9.
- Yazawa y col., "Current progress in suicide gene therapy for cancer", *World J. Surg.* 26: 783 (2002).
- Ziady AG, Perales JC, Ferkol T, Gerken T, Beegen H, Perlmutter DH, Davis PB. Gene transfer into hepatoma cell lines via the serpin enzyme complex receptor. *Am J Physiol.* Agosto 1997; 273(2 Pt 1): G545-52.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende (i) una minicélula derivada de bacterias que contiene una molécula de ácido nucleico terapéutica y (ii) un ligando biespecífico que es capaz de unirse a un componente de superficie de dicha minicélula y a un componente de superficie de una célula de mamífero no fagocítica, en la que dicho ligando biespecífico tiene especificidad por un receptor de superficie de célula de mamífero capaz de activar endocitosis mediada por receptor.
2. La composición de la reivindicación 1, en la que dicho ligando biespecífico comprende polipéptido o carbohidrato.
3. La composición de la reivindicación 1, en la que dicho ligando biespecífico comprende un primer brazo que porta especificidad por una estructura de superficie de minicélula obtenida de bacterias y un segundo brazo que porta especificidad por un receptor de superficie de célula de mamífero no fagocítica.
4. La composición de la reivindicación 3, en la que dicho primer brazo y dicho segundo brazo son monoespecíficos.
5. La composición de la reivindicación 3, en la que dicho primer brazo y dicho segundo brazo son multivalentes.
6. La composición de la reivindicación 3, en la que dicha estructura de superficie de minicélula es un componente de polisacárido O de un lipopolisacárido en dicha superficie de minicélula.
7. La composición de la reivindicación 3, en la que dicha estructura de superficie de minicélula es un miembro del grupo que consiste en proteínas de membrana exterior, pili, fimbrias, flagelos y carbohidratos expuestos en la superficie celular.
8. La composición de la reivindicación 3, en la que dicho receptor de superficie de célula de mamífero es capaz de activar endocitosis mediada por receptor de dicha minicélula.
9. La composición de la reivindicación 1, en la que dicho ligando biespecífico comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo.
10. La composición de la reivindicación 1, en la que dicho ligando biespecífico comprende un anticuerpo humanizado.
11. La composición de la reivindicación 1, en la que dicha minicélula comprende una pared celular intacta.
12. La composición de la reivindicación 1, en la que dicha secuencia de ácido nucleico terapéutica codifica un gen suicida.
13. La composición de la reivindicación 1, en la que dicho ácido nucleico terapéutico codifica un equivalente normal de un gen que expresa una proteína que funciona anormalmente o está presente en niveles anormales en dicha célula de mamífero.
14. La composición de la reivindicación 1, en la que dicho ácido nucleico terapéutico está contenido en un plásmido comprendido de múltiples secuencias de ácido nucleico.
15. La composición de la reivindicación 14, en la que plásmido comprende un elemento regulador.
16. La composición de la reivindicación 14, en la que dicho plásmido comprende un elemento informador.
17. Uso de una composición como se define en la reivindicación 1 en la preparación de medicamento para su uso en un procedimiento para tratar una enfermedad o modificar un rasgo mediante la administración de dicho medicamento a una célula, tejido u órgano.
18. El uso de acuerdo con la reivindicación 17, en el que dicho ligando biespecífico comprende polipéptido o carbohidrato.
19. El uso de acuerdo con la reivindicación 17, en el que dicho ligando biespecífico comprende un primer brazo que porta especificidad por una estructura de superficie de minicélula obtenida de bacterias y un segundo brazo que porta especificidad por un receptor de superficie de célula de mamífero no fagocítica.
20. El uso de acuerdo con la reivindicación 19, en el que dicho primer brazo y dicho segundo brazo son monoespecíficos.
21. El uso de acuerdo con la reivindicación 19, en el que dicho primer brazo y dicho segundo brazo son multivalentes.
22. El uso de acuerdo con la reivindicación 19, en el que dicha estructura de superficie de minicélula es un componente de polisacárido O de un lipopolisacárido en dicha superficie de minicélula.

23. El uso de acuerdo con la reivindicación 19, en el que dicha estructura de superficie de minicélula es un miembro del grupo que consiste en proteínas de membrana exterior, pili, fimbrias, flagelos y carbohidratos expuestos en la superficie celular.
- 5 24. El uso de acuerdo con la reivindicación 19, en el que dicho receptor de superficie de célula de mamífero es capaz de activar endocitosis mediada por receptor de dicha minicélula.
25. El uso de acuerdo con la reivindicación 19, en el que dicho ligando biespecífico comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo.
26. El uso de acuerdo con la reivindicación 19, en el que dicho ligando biespecífico comprende un anticuerpo humanizado.
- 10 27. El uso de acuerdo con la reivindicación 19, en el que dicha minicélula comprende una pared celular intacta.
28. El uso de acuerdo con la reivindicación 19, en el que dicha secuencia de ácido nucleico terapéutica codifica un gen suicida.
29. El uso de acuerdo con la reivindicación 19, en el que dicho ácido nucleico terapéutico codifica un equivalente normal de un gen que expresa una proteína que funciona anormalmente o que está presente en niveles anormales en dichas células de mamífero.
- 15 30. El uso de acuerdo con la reivindicación 19, en el que dichas células de mamífero están *in vitro*.
31. El uso de acuerdo con la reivindicación 19, en el que dichas células de mamífero están *in vivo*.
32. El uso de acuerdo con la reivindicación 19, en el que dicho ácido nucleico terapéutico está contenido en un plásmido que comprende múltiples secuencias de ácido nucleico.
- 20 33. El uso de acuerdo con la reivindicación 32, en el que dicho plásmido comprende un elemento regulador.
34. El uso de acuerdo con la reivindicación 32, en el que dicho plásmido comprende un elemento informador.
35. El uso de acuerdo con la reivindicación 17, en el que dicho receptor de superficie de célula de mamífero se expresa de manera elevada en la superficie de dichas células de mamífero no fagocíticas.
- 25 36. La composición de la reivindicación 1, en la que dichas moléculas de ácido nucleico son plásmidos y cada una de dichas minicélulas contiene más de 60 copias de dicho plásmido.
37. La composición de la reivindicación 1, en la que dichas moléculas de ácido nucleico son plásmidos y cada una de dichas minicélulas contiene entre 11 y 60 copias de dicho plásmido.
38. La composición de la reivindicación 1, en la que dicho receptor de superficie de célula de mamífero está expresado de manera elevada en la superficie de dichas células de mamífero no fagocíticas.
- 30

Figura 1

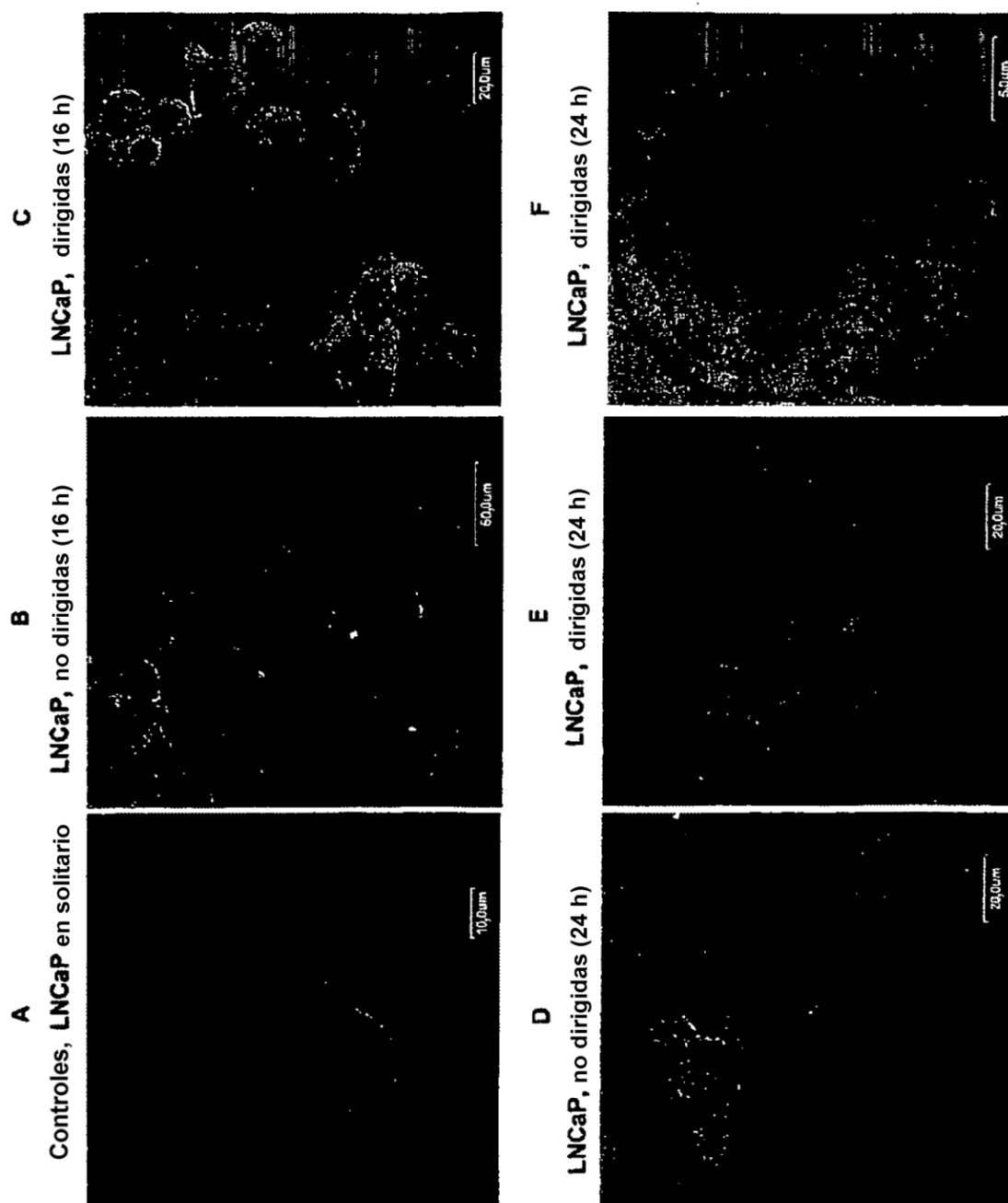


Figura 2

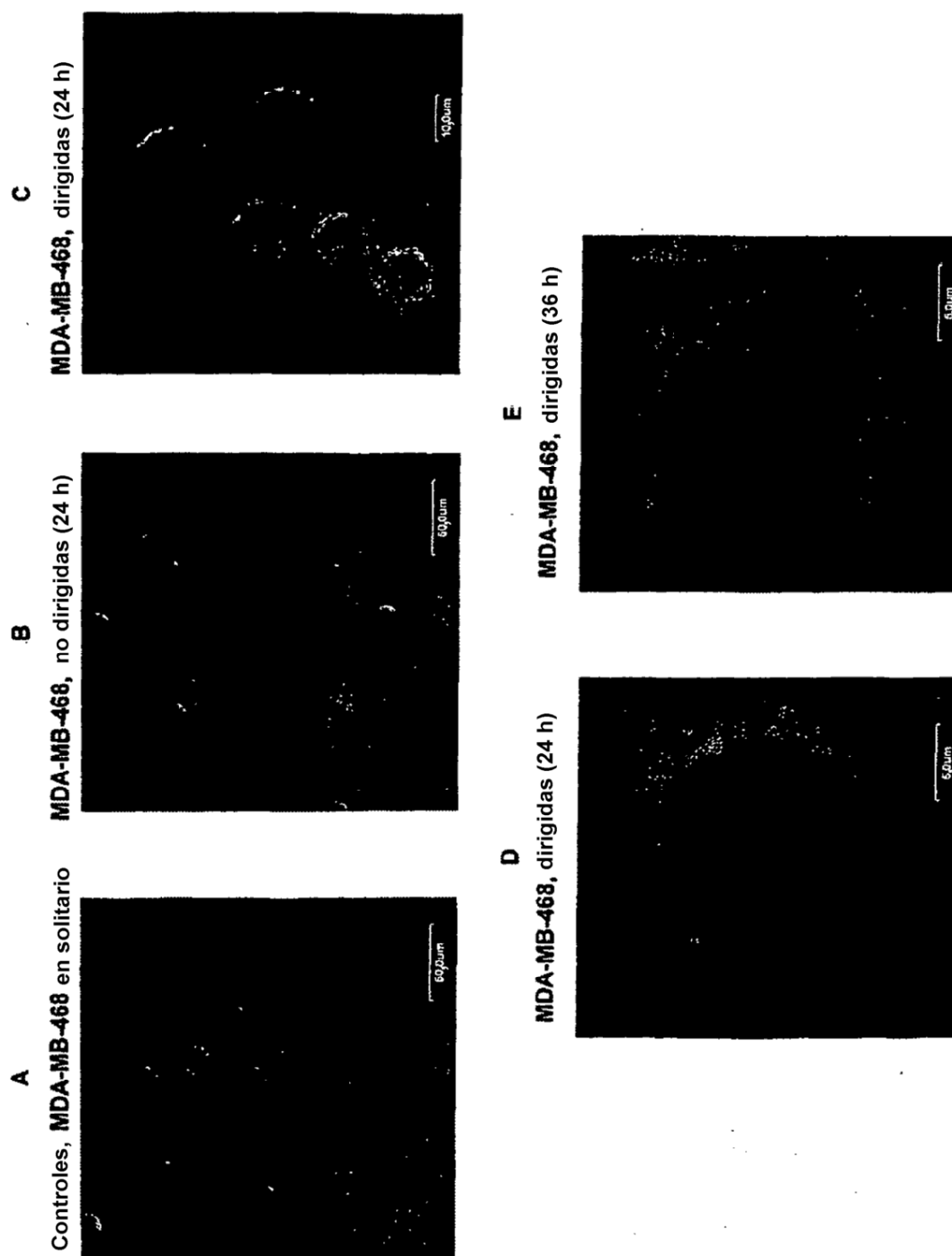


Figura 3

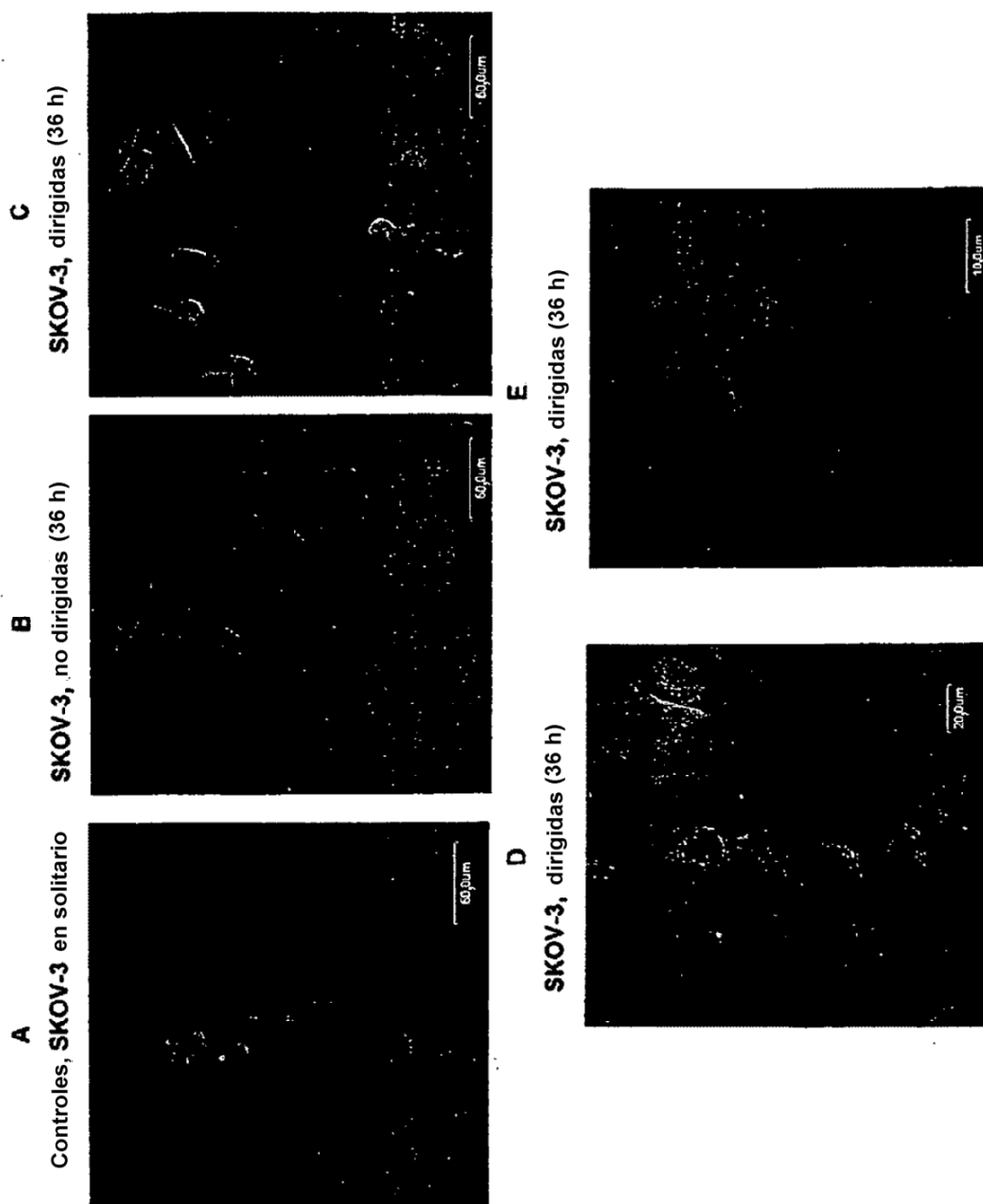
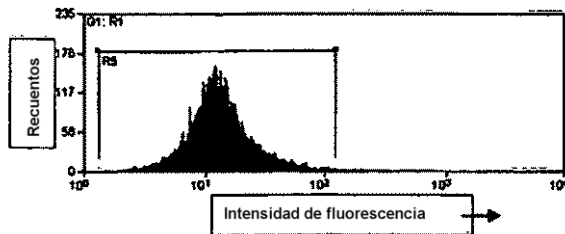


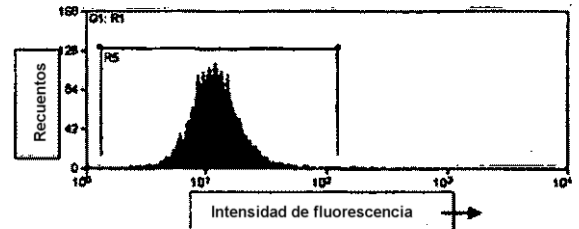
Figura 4

A

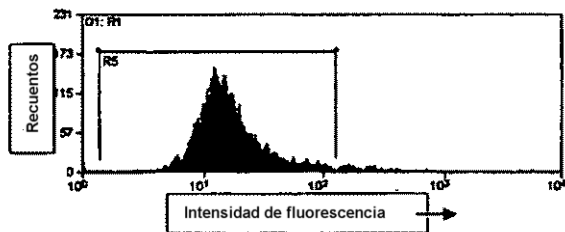
i. Células + MAb anti-HBsAg + MAb anti-IgG de ratón conjugado con PE



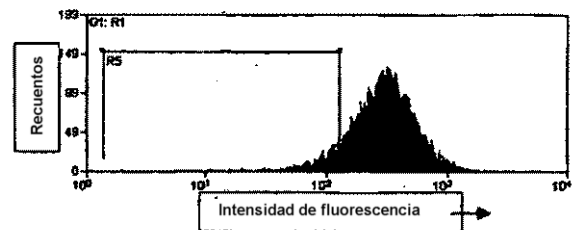
ii. Células + minicélulas_{HBsAg} no dirigidas (16 h) + Mab anti-HBsAg + Mab anti-IgG de ratón conjugado con PE



iii. Células + minicélulas_{HBsAg} dirigidas a BsAb no específicas (16 h) + Mab anti-HBsAg + Mab anti-IgG de ratón conjugado con PE

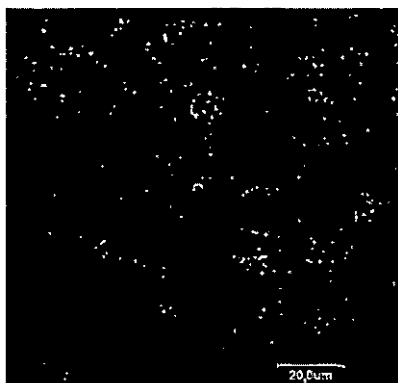


iv. Células + minicélulas_{HBsAg} dirigidas a EGFR (16 h) + Mab anti-HBsAg + Mab anti-IgG de ratón conjugado con PE

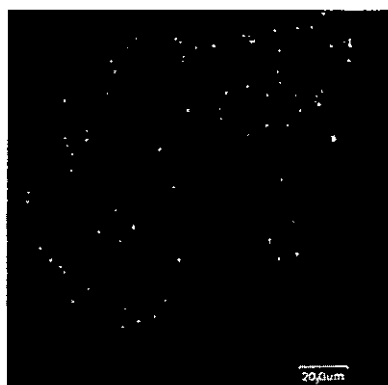


B

i. Células + minicélulas_{HBsAg} dirigidas no específicamente (16 h) + Mab anti-HBsAg + Mab anti-IgG de ratón conjugado con Alexa Flúor 594



ii. Células + minicélulas_{HBsAg} dirigidas a EGFR + Mab anti-HBsAg + Mab anti-IgG de ratón conjugado con Alexa Flúor 594



iii. Igual que (iii) (aumentado)



Figura 5

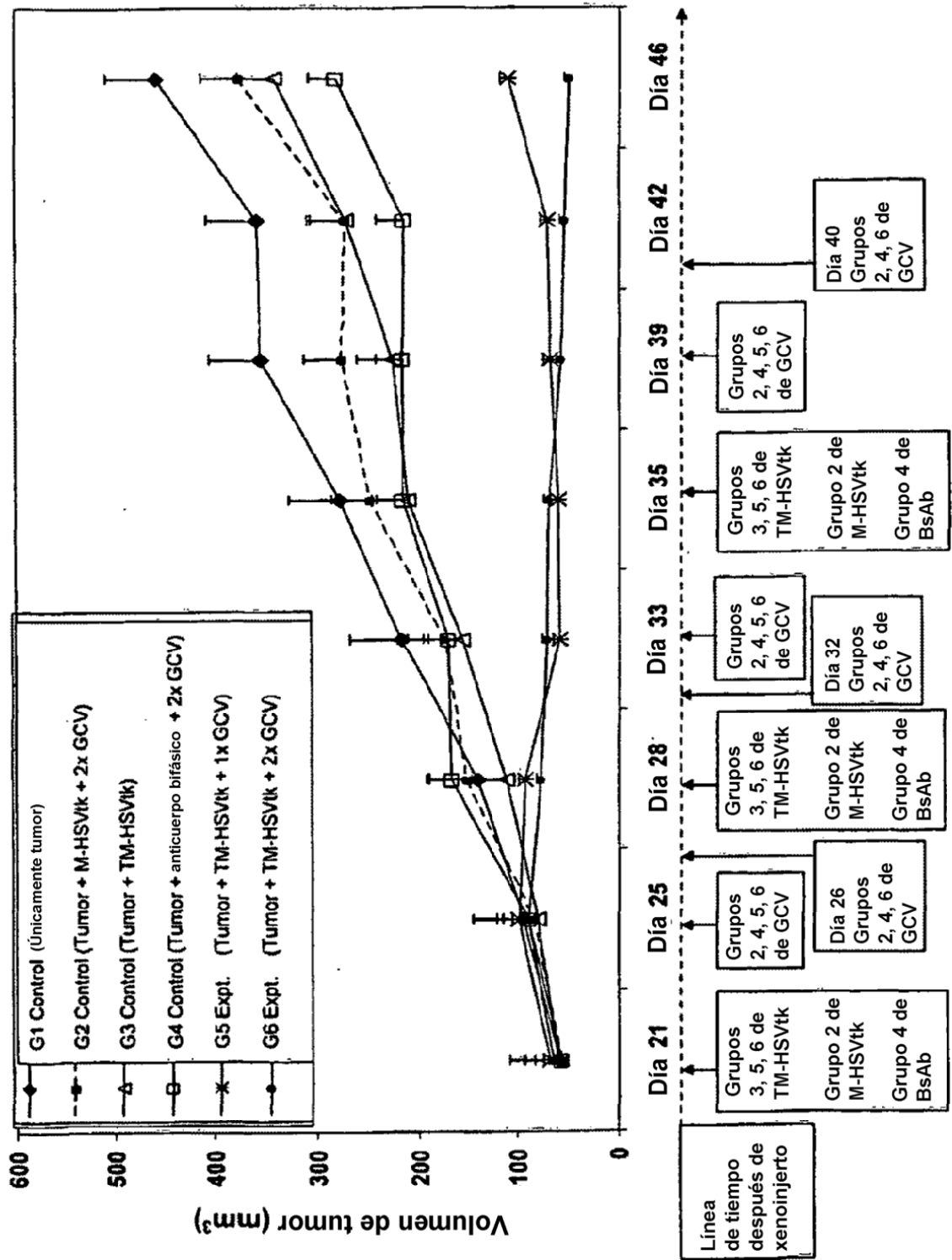


Figura 6

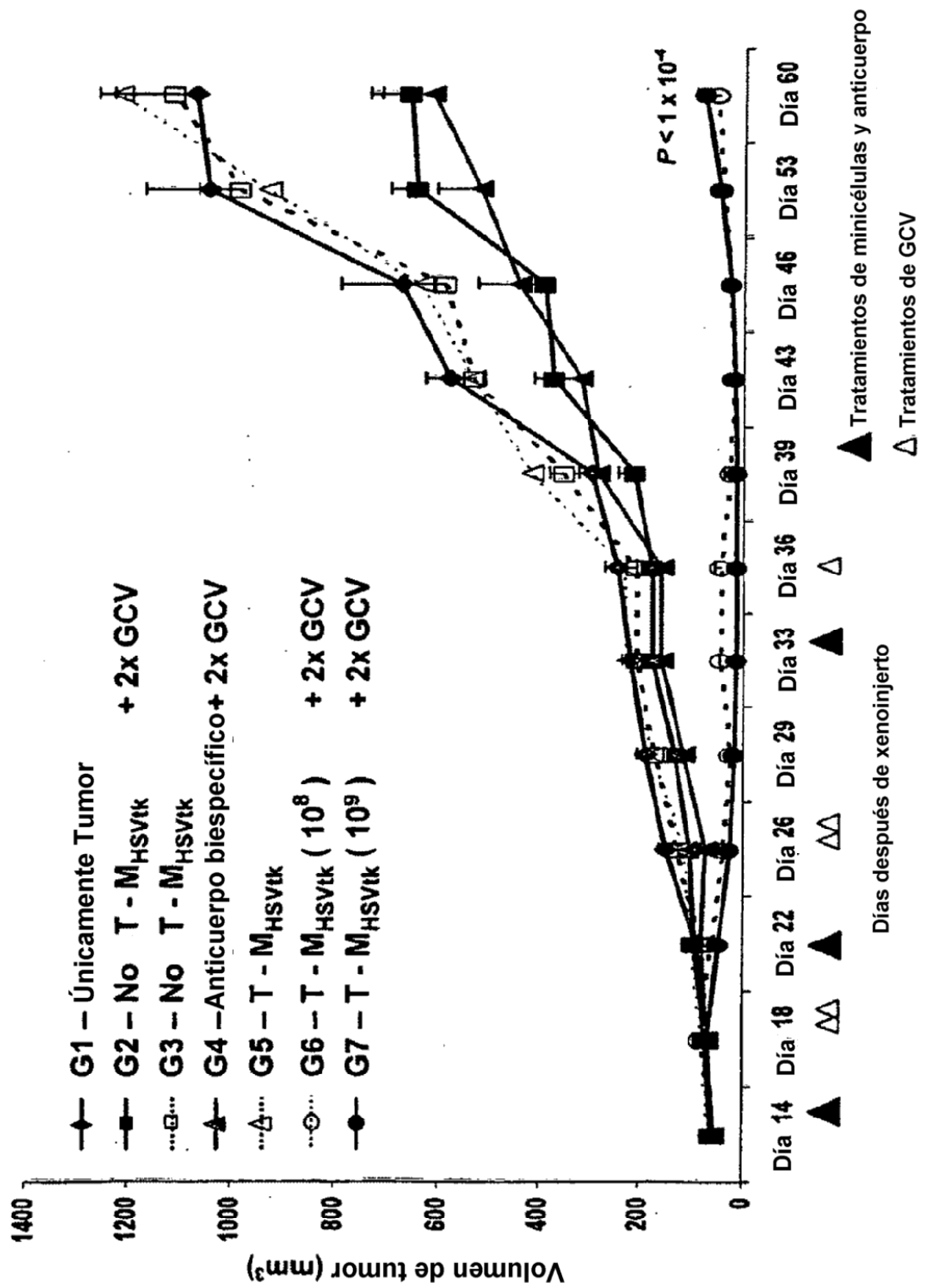


Figura 7

