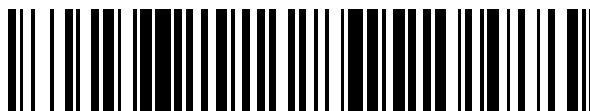


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 431 090**

51 Int. Cl.:

A61K 35/74 (2006.01)

A61K 38/05 (2006.01)

A61K 31/40 (2006.01)

A61K 31/675 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

C12R 1/145 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.11.2002 E 02786766 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.07.2013 EP 1446012**

54 Título: **Terapia bacteriolítica de combinación para el tratamiento de tumores**

30 Prioridad:

21.11.2001 US 331786 P

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

25.11.2013

73 Titular/es:

**THE JOHNS HOPKINS UNIVERSITY (100.0%)
School of Medicine, 111 Market Place, Suite 906
Baltimore, MD 21202, US**

72 Inventor/es:

**DANG, LONG;
KINZLER, KENNETH W. y
VOGELSTEIN, BERT**

74 Agente/Representante:

SUGRAÑES MOLINÉ, Pedro

ES 2 431 090 T3

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

DESCRIPCIÓN

Terapia bacteriolítica de combinación para el tratamiento de tumores

5 **CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCION**

Esta invención se refiere al campo de la oncología. En particular se refiere a tratamientos biológicos y químicos combinados de tumores.

10 **ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

A pesar el enorme progreso en la comprensión de la fisiopatología de la neoplasia, formas avanzadas de cáncer siguen siendo resistentes al tratamiento.

15 Aunque la base de este fallo es compleja, un motivo es que la mayoría de los tumores contienen zonas grandes, escasamente vascularizadas, que limitan la eficacia de la radiación y fármacos quimioterápicos (Jain, 1994) (Jain, 2001). Las regiones escasamente vascularizadas son menos sensibles a la radiación ionizante porque sus efectos destructores de células dependen del oxígeno; son menos sensibles a los fármacos quimioterápicos porque la entrega de fármacos a estas regiones es obviamente inferior a la óptima. Como el agente terapéutico contra el
20 cáncer no debe dejar agrupaciones significativas de células viables dentro de cada lesión para conseguir un efecto clínicamente significativo, las regiones escasamente vascularizadas de los tumores representan un obstáculo importante para un tratamiento eficaz.

25 Uno de los desarrollos recientes más importantes en la biología de los tumores es el reconocimiento de que la neoangiogénesis es esencial para el crecimiento de tumores hasta tamaños clínicamente significativos. Lo que se ha reconocido menos ampliamente es que esta neoangiogénesis a menudo no es proporcional al crecimiento de las células neoplásicas, dando como resultado zonas necróticas grandes compuestas de células muertas o que se están muriendo. Por ejemplo, se ha encontrado que una de cada 20 metástasis de hígado seleccionadas aleatoriamente con un tamaño $> 1 \text{ cm}^3$ contenían regiones relativamente grandes de necrosis/apoptosis, que
30 constituían en general del 25% al 75% de la masa tumoral (figura 1). Las células adyacentes a estas zonas necróticas están escasamente vascularizadas y es probable que sean difíciles de tratar con agentes convencionales.

Se ha reconocido durante medio siglo que las bacterias anaerobias pueden proliferar de manera selectiva en las regiones hipóxicas de los tumores (Parker, 1947) (Malmgren, 1955) (Mose, 1963) (Gericke, 1963) (Thiele, 1963) (Carey, 1967) (Kohwi, 1978) (Brown, 1998) (Fox, 1996) (Lemmon, 1997) (Sznol, 2000) (Low, 1999) (Clairmont, 2000) (Yazawa, 2000) (Kimura, 2001) (Kimura, 1980). Se han ideado estrategias ingeniosas para aprovechar
35 potencialmente tales bacterias con fines de diagnóstico y terapéuticos, aunque recientemente se ha hecho relativamente poco trabajo en esta área.

40 **SUMARIO DE LA INVENCION**

Una realización de la invención proporciona el uso de esporas de una bacteria *Clostridium novyi* bacteriológicamente pura, aislada y defectuosa para toxinas o una bacteria *Clostridium sordellii* bacteriológicamente pura, aislada y defectuosa para toxinas en la fabricación de un medicamento para tratar tumores en un mamífero, mediante el cual
45 el tumor experimenta una remisión o su crecimiento se ralentiza o se detiene. Opcionalmente, también se incluye un agente antitumoral en dicho medicamento. El tumor experimenta una remisión o su crecimiento se ralentiza o se detiene como resultado de estas administraciones.

Otra realización de la invención proporciona un kit para tratar tumores. Los componentes del kit están en un recipiente dividido o no dividido. Los componentes incluyen esporas de una bacteria *Clostridium novyi* defectuosa para toxinas o una bacteria *Clostridium sordellii* defectuosa para toxinas y un agente que colapsa la vasculatura tumoral.

55 **BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

Figura 1. Metástasis colorrectales típicas en seres humanos. Zonas extensas de necrosis, indicadas con flechas, están entremezcladas con zonas de células tumorales viables. Se observaron zonas grandes de necrosis similares en cada una de las lesiones metastásicas de 20 pacientes diferentes elegidos al azar de los archivos patológicos.

60 Figuras 2A-2D. Distribución de bacterias anaerobias dentro de los tumores. A ratones que presentaban tumores B16 subcutáneos se les inyectaron por vía intravenosa a través de la vena de la cola 5×10^7 bacterias *B. longum* vivas o esporas de *C. novyi* de tipo natural. A los ratones con *B. longum* se les proporcionó una inyección intraperitoneal con lactulosa diariamente durante cinco días para aumentar el crecimiento bacteriano (Yazawa, 2000) y entonces se sacrificaron para analizar la colonización tumoral. Los ratones con *C. novyi* se sacrificaron el día tras la inyección
65 para su análisis. Las tinciones de Gram revelaron que un gran número de bacterias *B. longum* se habían

concentrado dentro de unas pocas colonias, mientras que *C. novyi* se había dispersado por todas las partes escasamente vascularizadas de los tumores. (Figura 2A, figura 2B) Vista de alto y bajo aumento de un experimento con *B. longum* representativo, que muestra las bacterias (teñidas de azul intenso) agrupadas dentro de una colonia. (Figura 2C) Experimento con *C. novyi*, que muestra la dispersión de las bacterias por toda la región necrótica del tumor. (Figura 2D) Vista de alto aumento, que muestra la invasión de bacterias *C. novyi* al interior de células tumorales viables circundantes (teñidas de morado) a la izquierda.

Figura 3. Eliminación del gen de toxina letal de *C. novyi*. Tras un choque térmico, se realizó una PCR en ADN de colonias para identificar aquéllas que habían perdido el gen de toxina letal en el episoma de fago. La electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR con dos conjuntos de cebadores independientes (ToxA y ToxB) muestra un clon de *C. novyi* (*C. novyi-NT*) que había perdido el gen y un clon (*C. novyi*) que lo conservaba. Se proporcionaron controles mediante conjuntos de cebadores (PlcA y PlcB) específicos para el gen de fosfolipasa C de *C. novyi* que demuestran la integridad de los moldes de ADN en todas las reacciones.

Figura 4A-4D. Distribución de bacterias *C. novyi-NT* tras la inyección intravenosa de esporas. (Figura 4A) Tinción con H y E de un xenoinjerto de tumor HCT116 típico de un ratón al que no se le habían inyectado las bacterias, que muestra algo de necrosis. (Figura 4B) Tinción con H y E de un tumor 24 horas tras la inyección intravenosa de 5×10^7 esporas de *C. novyi-NT*. (Figura 4C) Tinción de Gram, que revela bacterias distribuidas por toda la región necrótica. (Figura 4D) Vista de alto aumento, que muestra un lecho de bacterias en la superficie de contacto entre las regiones viables y necróticas del tumor en la parte superior e inferior de la imagen, respectivamente.

Figuras 5A-5B. Necrosis hemorrágica tras COBALT. (Fig 5A) Ratón que presenta tumor HCT116 24 horas tras la inyección i.v. con 5×10^7 esporas de *C. novyi-NT*. Se observa una ligera hinchazón asociada con edema en el sitio tumoral. Entonces se administró por vía intravenosa D10 (0,3 mg/kg) (momento=0), y seguido 24 horas después por MMC (4 mg/kg). Resulta evidente un punto negro que indica necrosis hemorrágica cerca del centro del tumor a los 0,3 días. La zona de necrosis hemorrágica se expandió gradualmente a lo largo del día siguiente. Entonces bajó la hinchazón en el sitio tumoral y la masa tumoral necrótica y la piel que la rodeaba se contrajo y se disolvió gradualmente (días 6 a 30). (Figura 5B) Ratones típicos cinco semanas tras el tratamiento con una dosis única de D10 más MMC (parte superior) o con una dosis única de COBALT (parte inferior). De los ocho ratones tratados con COBALT en este experimento, cuatro se habían curado aparentemente de su tumor, ya que no se observó recidiva tras tres meses de observación.

Figuras 6A-6C. Cuantificación de los efectos de COBALT. (Figura 6A) Se hicieron crecer células de cáncer colorrectal HCT116 como xenoinjertos en ratones desnudos. Cuando los tumores tenían un tamaño de $\sim 700 \text{ mm}^3$, se les inyectaron a los animales por vía intravenosa 5×10^7 esporas de *C. novyi-NT* (momento 0), seguido por la inyección i.v. de D10 (0,3 mg/kg) a las 24 horas y la inyección i.p. de MMC (4 mg/kg) a las 48 horas. A los grupos control no se les administró tratamiento o se les trató con D10 más MMC sin esporas. Cada grupo consistía en de seis a diez ratones. Se sacrificaron los animales cuando sus tumores superaban el 15% de su peso corporal. En el experimento mostrado, siete de ocho ratones tratados con una dosis única de COBALT desarrollaron una necrosis hemorrágica notable de sus tumores en el plazo de 24 horas tras la administración de D10. Cuatro de estos siete ratones se curaron, mientras que tres de los ratones murieron tres días tras el tratamiento, quizás por el síndrome de lisis tumoral (véase la Discusión). Un ratón desarrolló una necrosis menos extensa y se tumor volvió finalmente a crecer. Sólo se usaron los ratones que sobrevivieron al tratamiento para obtener los datos representados en el gráfico. (Figura 6B) Se trataron los ratones como en la figura 6A, excepto que no se usó MMC y se administraron los tratamientos una vez cada dos semanas. (Figura 6C) Se hicieron crecer células de melanoma B16 como tumores singénicos subcutáneos en ratones C57BL/6. Cuando los tumores tenían un tamaño de aproximadamente 700 mm^3 , se les inyectaron a los animales por vía intravenosa 5×10^7 esporas de *C. novyi-NT* (momento 0), seguido por la inyección i.p. de CTX (100 mg/kg) a las 6 horas y la inyección i.v. de D10 (0,3 mg/kg) a las 24 horas. A otros grupos no se les administró tratamiento, CTX más D10 o esporas más D10. Cada grupo consistía en al menos diez ratones y se repitieron los tratamientos en intervalos semanales. Cuatro ratones murieron tras la primera dosis de COBALT y sólo se usaron aquellos ratones que sobrevivieron al tratamiento para obtener los datos representados en el gráfico. Se sacrificaron los animales cuando sus tumores superaban el 15% de peso corporal.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Es un descubrimiento de los presentes inventores que la terapia bacteriolítica de combinación (COBALT) puede dar como resultado remisiones rápidas y drásticas de tumores experimentales en ratones. Incluso tumores relativamente grandes pudieron tratarse satisfactoriamente con COBALT, incluso aunque tales tumores generalmente no responden bien a los agentes quimioterápicos.

Las bacterias útiles en la puesta en práctica de la presente invención son *Clostridium novyi* y *Clostridium sordellii*.

Esporas de una bacteria *Clostridium novyi* defectuosa para toxinas o una bacteria *Clostridium sordellii* defectuosa para toxinas según la invención son aquéllas que no están contaminadas con otras esporas bacterianas.

Las esporas pueden administrarse a un mamífero que presenta un tumor mediante cualquier medio que permita el acceso al tumor. Las esporas pueden inyectarse por vía intravenosa, por vía intradérmica, por vía subcutánea, por vía intramuscular, por vía intraperitoneal, por vía intratumoral, por vía intratecal, quirúrgicamente, etc. Técnicas preferidas son las inyecciones intravenosas e intratumorales. Los mamíferos que presentan un tumor pueden ser seres humanos, animales domésticos, tales como perros y gatos, ganado tales como vacas, ovejas, cabras y cerdos, y animales de laboratorio, tales como ratas, hámsters, monos, ratones y conejos. Los tumores que van a tratarse son de manera preferible suficientemente grandes de manera que han crecido más allá de su suministro sanguíneo y contienen regiones necróticas. Este factor no debe ser limitante por la mayoría de las situaciones tumorales en seres humanos, ya que la gran mayoría de los tumores clínicamente evidentes en seres humanos tienen grandes regiones necróticas dentro de los mismos (figura 1). Sin embargo, la enfermedad micrometastásica puede no ser susceptible a COBALT.

El tratamiento de combinación implica administrar esporas anaerobias así como un segundo agente antitumoral. Juntos, estos agentes tiene un efecto sinérgico para producir una mayor disminución en el crecimiento del tumor. Los segundos agentes antitumorales que pueden usarse incluyen cualquiera que se conozca en la técnica. Tales agentes antitumorales incluyen, pero no se limitan a, agentes que dañan el ADN, agentes que colapsan la vasculatura tumoral, radiación y anticuerpos antiantígenos tumorales. Estos agentes antitumorales se administran según los medios convencionales usados en la técnica de la oncología médica y por radiación. Los agentes pueden administrarse en cualquier orden o simultáneamente. Sin embargo, puede ser deseable administrar las esporas antes de administrar el segundo agente antitumoral. Si los agentes deben administrarse en serie, se administran preferiblemente dentro de un periodo de un mes, más preferiblemente dentro de un periodo de una quincena e incluso más preferiblemente dentro de un periodo de una semana.

La optimización del periodo de tiempo se encuentra perfectamente dentro del conocimiento de la técnica. Además, pueden administrarse múltiples agentes antitumorales junto con las esporas. Por tanto, puede ser deseable, con el fin de conseguir una reducción incluso mayor en el crecimiento tumoral, que se usen una pluralidad de agentes antitumorales. Agentes antitumorales de diferentes categorías o mecanismos pueden conseguir resultados superiores. Por tanto, una combinación preferida incluye esporas, un agente que colapsa la vasculatura tumoral y un agente que daña el ADN.

Agentes antitumorales adecuados que actúan colapsando los vasos tumorales son colchicina, dolastatina-10 y ácido 5,6-dimetilxantenon-4-acético. Pueden usarse otros de los que se sepa o se haya descubierto que tienen la misma función. Los fármacos quimioterápicos que dañan el ADN adecuados que pueden usarse incluyen, pero no se limitan a, mitomicina C y citoxano.

Con el fin de mitigar los efectos secundarios de la terapia antitumoral pueden utilizarse diversos fármacos o terapias adicionales. Éstos incluyen alopurinol, hidratación, urato oxidasa, esteroides tales como prednisona, y factores hematopoyéticos tales como factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF).

Los kits que comprenden componentes útiles para poner en práctica los métodos antitumorales de la presente invención pueden envasarse en un recipiente dividido o no dividido, tal como un envase de cartón, una botella, una ampolla, un tubo, etc. Las esporas y los agentes antitumorales pueden envasarse en forma seca, liofilizada o líquida. Los componentes adicionales proporcionados pueden incluir vehículos para la reconstitución de componentes secados. Preferiblemente todos de tales vehículos son estériles y apirógenos de modo que sean adecuados para la inyección en un mamífero sin provocar reacciones adversas. Los agentes antitumorales distintos de las esporas también son preferiblemente estériles. Las esporas son de manera preferible microbiológicamente puras, es decir, no contienen bacterias distintas de las anaerobias formadoras de esporas deseadas.

El tratamiento de ratones con tumores grandes era en ocasiones tóxico. Aproximadamente el 20% de los ratones con tumores de 350 mm³ y ~50% de los ratones con tumores de 700 mm³ murieron en el plazo de 24 - 72 horas tras la administración de esporas más D10. No se observaron muertes tras el tratamiento con esporas de *C. novyi-NT* solas o con D10 sola. Aunque la base de esta toxicidad no se conoce aún, puede haberse debido a la salida de productos bacterianos tóxicos desde los tumores o debido al "síndrome de lisis tumoral". Se ha indicado anteriormente que la lisis rápida de cargas tumorales muy grandes va asociada con una toxicidad sistémica en seres humanos tratados con quimioterapia, quizás debido a la salida repentina de metabolitos de células tumorales a la circulación (Altman, 2001). Aunque el síndrome de lisis tumoral puede controlarse en seres humanos, es difícil de controlar en ratones. Cualquier terapia que contraiga dramáticamente los tumores puede ser susceptible de este efecto secundario. Los tratamientos para el síndrome de lisis tumoral que pueden usarse en seres humanos incluyen alopurinol, urato oxidasa y saturación del volumen (hidratación). También pueden ser deseables tratamientos para mitigar los efectos secundarios de agentes antitumorales tales como toxicidad sobre la médula ósea y neutropenia. Tales tratamientos se conocen ampliamente en la técnica y pueden emplearse en el presente documento de la manera conocida.

La descripción anterior describe de manera general la presente invención. Puede obtenerse una comprensión más completa haciendo referencia a los siguientes ejemplos específicos, que se proporcionan en el presente documento

sólo con fines de ilustración, y no se pretende que limiten el alcance de la invención.

EJEMPLO 1

En el trabajo descrito a continuación se intentó aprovechar el hecho de que las regiones necróticas existen sólo dentro de los tumores y en tejidos no normales. Se pretendía desarrollar un agente tóxico que pudiera entregarse específicamente a estas zonas y, en teoría, pudiera destruir las células tumorales viables circundantes. Se eligió investigar bacterias anaerobias para este propósito. Se esperaba que un examen sistemático para determinar bacterias anaerobias apropiadas que pudieran destruir células tumorales adyacentes a las regiones escasamente vascularizadas, en vez de sólo localizar tales regiones, renovara el interés por este enfoque. Además, se esperaba que los agentes quimioterápicos que destruían las regiones ampliamente vascularizadas de tumores, cuando se administraron junto con bacterias apropiadas, darían como resultado la destrucción de una proporción importante de células neoplásicas dentro de los tumores.

Se usaron los siguientes materiales y métodos en estos estudios.

Cepas bacterianas y crecimiento. Las cepas bacterianas sometidas a prueba en este estudio se adquirieron de la Colección Americana de Cultivos Tipo y se enumeran en la tabla 1. Se hicieron crecer en condiciones anaeróbicas en cultivos líquidos a 37°C en medio para clostridios reforzado (*Reinforced Clostridial Medium*) o caldo MRS para lactobacilos (Difco, Detroit, MI).

Fármacos. El Dr. George R. Pettit (Cancer Research Institute, Arizona State University, AZ), Dr. Gregory P. Kalemkerian (Departamento de Medicina Interna, Wayne State University, MI) y Dr. Robert J. Schultz (División de Química y Síntesis de Fármacos, NCI, Bethesda, MD) proporcionaron amablemente la D10 (D10). El Dr. Robert J. Schultz proporcionó amablemente la combretastatina A-4. Citoxano (CTX), mitomicina C (MMC), vincristina, colchicina y vinblastina son agentes quimioterápicos disponibles comercialmente (Sigma, St. Louis, MO).

Líneas celulares y animales. Se adquirieron ratones desnudos atímicos hembra y C57BL/6 de 6 a 8 semanas de edad de Harlan. Se hicieron crecer células de cáncer de colon HCT116 y células de melanoma B16 como monocapas en medio McCoy 5A (Life Technologies, Rockville, MD) complementado con un 5% de suero bovino fetal y un 1% de penicilina/estreptomicina (n.º de cat. 15140-122).

Esporulación y generación de una cepa no toxigénica de *C. novyi*. Se generaron esporas de cepas de *C. novyi* tanto de tipo natural como no toxigénicas haciendo crecer los organismos en condiciones anaeróbicas a 37°C, pH 7,4 en un medio que contenía 5 g de Na₂HPO₄, 30 g de peptona, 0,5 de L-cisteína, 10 g de maltosa y un 5% p/v de partículas de carne cocida secada (Difco, Detroit, MI) por 1 litro. Tras una semana en este medio, las esporas se establecieron en la capa de partículas de carne cocida (Bagadi, 1973). Se purificaron adicionalmente las esporas de las formas vegetativas contaminantes en un gradiente Percoll discontinuo. Para eliminar el gen de toxina letal de la cepa de *C. novyi* de tipo natural, se calentaron esporas de *C. novyi* a 70°C durante 15 minutos para inactivar el fago que portaba la toxina (Eklund, 1974) (Eklund, 1976). Entonces se sembraron en placa las esporas en RCM-agar y se incubaron en condiciones anaeróbicas a 37°C durante 48 horas. Las colonias aisladas se cultivaron en RCM líquido durante otras de 24 a 48 horas y entonces se sometieron a prueba para determinar la presencia del gen de toxina letal mediante PCR. En general, se encontró que el 1% de las colonias bacterianas perdían el fago que portaba este gen.

Estudios *in vivo*. A ratones desnudos atímicos Balb/c o C57BL/B de seis a ocho semanas de edad se les implantaron los tumores subcutáneos a través de la inyección de 2,5 X10⁶ células HCT116 o B16, respectivamente. Tras de 8 a 12 días de establecimiento del tumor, se inició el tratamiento con esporas o fármacos. Se realizó un examen de cepas bacterianas para determinar su capacidad para poblar los injertos tumorales mediante cualquier inyección intratumoral (volumen de 100 ul, 1 x 10⁷ bacterias o esporas) de la vena de la cola. Se diluyeron las esporas de *C. novyi*-NT y la D10 hasta la concentración apropiada en 1x solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco, pH 7,4 (PBS) (Life Technologies, Rockville, MD) y entonces se administraron mediante inyección intravenosa en un volumen de 500 ul. Se diluyeron CTX y MMC en PBS y entonces se administraron mediante inyección intraperitoneal en un volumen de 500 ul. Se evaluó el crecimiento tumoral midiendo el tamaño de los ejes mayor y menor de los tumores subcutáneos cada dos y cada cuatro días para los tumores B16 y HCT116, respectivamente, usando calibradores. Entonces se calculó el volumen tumoral usando la ecuación longitud x anchura² x 0,5.

EJEMPLO 2

Elección de especies bacterianas. A partir de estudios anteriores, resultaba evidente que especies de bacterias anaerobias podían crecer dentro de las regiones hipóxicas de tumores. Se proporciona un ejemplo mediante *B. longum*, que, cuando se inyectaba por vía intravenosa a ratones con tumores subcutáneos, crecía de manera específica y vigorosa dentro de los tumores, pero no dentro de tejidos normales (Yazawa, 2000) (Yazawa, 2001). Sin embargo, tinciones de Gram de secciones de los tumores revelaron que la mayoría de las bacterias estaban agrupadas estrechamente dentro de colonias en vez de distribuidas por todas las regiones necróticas (figura 2A,

figura 2B). Dado que la dispersión de las bacterias se consideraba esencial para conseguir los efectos deseados, se sometieron a prueba numerosas especies anaerobias de tres géneros diferentes en un intento por encontrar la(s) que presentaba(n) este fenotipo (tabla 1). Para este propósito, se inyectaron por vía intravenosa cepas de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* (como ejemplos de referencia), mientras que las cepas de *Clostridium*, que generalmente son sumamente tóxicas cuando se inyectan por vía intravenosa, se inyectaron directamente en los tumores. De entre las 26 cepas enumeradas en la tabla 1, sólo dos (*C. novyi* y *C. sordellii*) presentaban una propagación extensa por todas las partes escasamente vascularizadas de los tumores (no mostrado). Aunque esta propagación se veía facilitada indudablemente por la naturaleza móvil de estas dos especies, otras bacterias anaerobias móviles, incluyendo otras cepas de *Clostridium*, no presentaban esta propiedad cuando se sometían a prueba en condiciones idénticas.

Tabla 1 Cepas bacterianas sometidas a prueba
Bifidobacterias (ejemplos de referencia)

<i>B. adolescentis</i>	ATCC 15703
<i>B. animalis</i>	ATCC 25527
<i>B. bifidum</i>	ATCC 11863, 15696
<i>B. boum</i>	ATCC 27917
<i>B. breve</i>	ATCC 15700
<i>B. coryneforme</i>	ATCC 25911
<i>B. dentium</i>	ATCC 15423, 27534
<i>B. indicum</i>	ATCC 25912
<i>B. infantis</i>	ATCC 15702, 25962
<i>B. longum</i>	ATCC 15707
<i>B. magnum</i>	ATCC 27540
<i>B. pseudolongum</i>	ATCC 25526

Lactobacilos (ejemplos de referencia)

<i>L. bifidus</i>	ATCC 11146
<i>L. delbruecki</i>	ATCC 21815

Clostridios (ejemplos de referencia, excepto para *C. novyi* y *C. sordellii*)

<i>C. absonum</i>	ATCC 27555
<i>C. acetobutylcum</i>	ATCC 824
<i>C. bifermentans</i>	ATCC 17836
<i>C. difficile</i>	ATCC 700057
<i>C. histolyticum</i>	ATCC 19401
<i>C. novyi</i>	ATCC 19402
<i>C. perfringens</i>	ATCC 3624, 13124
<i>C. sordellii</i>	ATCC 9714

EJEMPLO 3

Infiltración de la masa tumoral tras la inyección intravenosa de esporas de *C. novyi*. Para que una terapia experimental represente una herramienta potencialmente viable para el tratamiento de cánceres diseminados, debe tener la capacidad de administrarse de manera sistémica en vez de a través de una inyección intratumoral local. Aunque las bacterias vivas son a menudo tóxicas cuando se inyectan por vía intravenosa, se ha mostrado que las esporas bacterianas no son tóxicas para los animales normales. Por consiguiente, se encontró que podían inyectarse por vía intravenosa grandes números (hasta 10^8 en un volumen de 500 μ l) de esporas de *C. novyi* y *C. sordellii* en ratones normales sin provocar ningún efecto secundario perceptible. Sin embargo, cuando se inyectaban por vía intravenosa en ratones con tumores B16 subcutáneos, las bacterias *C. novyi* germinaron de manera abundante dentro de los tumores en el plazo de 16 horas (figura 2C). Por el contrario, no se observaron bacterias germinadas en el hígado, bazo, riñón, pulmón o cerebro de estos ratones (no mostrado). Se observaron resultados similares tras la inyección i.v. de esporas de *C. sordellii* (no mostrado).

EJEMPLO 4

Modificación genética de *C. novyi*. Aunque las esporas tanto de *C. novyi* como de *C. sordellii* tenían la capacidad de crecer dentro de tumores y destruir algunas células tumorales circundantes, se encontró al menos un pequeño problema con este tratamiento experimental: de 16 a 18 horas tras el inicio del tratamiento todos los ratones murieron. Se sospechó que la causa de la muerte fue la liberación de las potentes toxinas letales de las bacterias que germinaron dentro de los tumores. De hecho, otras esporas de bacterias anaerobias han demostrado ser sumamente tóxicas para animales y seres humanos tras la germinación dentro de los entornos anaeróbicos.

presentes en tumores o heridas, y se mostró que la mortalidad resultante se debía a toxinas secretadas específicas (Boyd, 1972) (Boyd, 1972) (Bette, 1991) (Rood, 1991) (Bryant, 2000).

Para mitigar la toxicidad sistémica, se intentó eliminar el gen de toxina letal de *C. novyi*. Se eligió *C. novyi* en vez de *C. sordellii* para este propósito porque esta última tiene dos genes de toxina homólogos (Martínez, 1992) en vez de uno y porque el único gen de toxina de *C. novyi* está ubicado dentro de un episoma de fago (Eklund, 1974) (Eklund, 1976) (Hofmann, 1995). Se trataron térmicamente las bacterias para inducir la pérdida del fago y se inocularon sobre placas con agar. De 400 colonias bacterianas examinadas, se observó que tres habían perdido el gen de toxina cuando se evaluaron mediante PCR usando cebadores específicos para el gen de toxina (ejemplos en la figura 3). La fosfolipasa C, un gen de *C. novyi* contenido en el genoma bacteriano en vez de en el genoma fágico (Tsutsui, 1995), sirvió como control para este experimento de PCR. Un clon, denominado *C. novyi-NT*, que había perdido el gen de toxina, se seleccionó para un análisis adicional.

EJEMPLO 5

Destrucción de células tumorales tras la inyección de esporas de *C. novyi-NT*. Se inyectaron por vía intravenosa esporas de *C. novyi-NT* que carecían de la toxina letal en ratones con tumores. Estas esporas conservaban su capacidad de germinar dentro de tumores y dieron como resultado zonas enormemente expandidas de necrosis (figura 4A frente a figura 4B). Sin embargo, estas esporas, a diferencia de las de sus progenitores, no eran tóxicas cuando se inyectaban solas, no observándose generalmente efectos patológicos tras la inyección de hasta 10^8 esporas en ratones con tumores. Por el contrario, todos los ratones murieron tras la inyección de 5×10^7 esporas de *C. novyi* parentales en ratones con tumores. Pudieron observarse bacterias en crecimiento por todas las regiones necróticas muy aumentadas de tumores tras la inyección de esporas (figura 4C, figura 4D). El aumento de las regiones necróticas se debía aparentemente a la destrucción de células tumorales viables adyacentes a las regiones necróticas originales por parte de las bacterias. De hecho, se observó rutinariamente una "película" bacteriana (McManus, 1982) en la superficie de contacto entre la zona necrótica y el reborde viable restante del tumor, como si las bacterias estuvieran destruyendo las células tumorales viables y usando sus productos de degradación como nutrientes (figura 4D). Este efecto de infiltración tumoral era similar al observado con bacterias *C. novyi* de tipo natural (figura 2D).

EJEMPLO 6

Terapia de combinación. Se esperaba combinar un agente bacteriano con más agentes quimioterápicos convencionales en un intento por atacar los tumores tanto desde dentro como desde fuera, respectivamente. Tras investigaciones preliminares con varios de tales agentes, se centró la atención en dos clases: (i) agentes que dañan el ADN, tales como MMC y CTX, que destruyen de manera selectiva células tumorales, y (ii) agentes que parecen colapsar parcialmente la vasculatura tumoral, tal como los derivados del ácido flavonoacético y agentes de unión a microtúbulos (Chaplin, 1996) (Sweeney, 2001). Se ha mostrado que esta última clase de agentes puede interferir con una circulación apropiada a través de los tumores y de este modo atrapar moléculas grandes, tales como anticuerpos o bacterias, que han logrado acceso al tejido tumoral (Theys, 2001) (Pedley, 1999) (Pedley, 2001). Entre el ácido flavonoacético y los agentes de unión a microtúbulos sometidos a prueba (incluyendo vinblastina, vincristina, colchicina, combretastatina A-4 y D10), D10 parecía tener los efectos más pronunciados y se eligió para una experimentación adicional.

Se usaron xenoinjertos de la línea celular de cáncer colorrectal HCT116 para someter a prueba los efectos de esta terapia de combinación en ratones desnudos, ya que los tumores podían visualizarse fácilmente bajo la piel sin pelo. Tal como se muestra en la figura 5, el tratamiento secuencial con esporas de *C. novyi-NT*, D10 y MMC dio como resultado efectos dramáticos sobre tumores subcutáneos grandes (volumen tumoral de partida $\sim 700 \text{ mm}^3$), fácilmente observables a través de la piel. Veinticuatro horas tras la inyección de esporas de *C. novyi-NT*, la masa tumoral se hinchó y pasó a tener edemas (figura 5A). Seis horas tras recibir D10, se desarrolló un punto negro cerca del centro del tumor, lo que representa una zona de necrosis hemorrágica. Este punto expandió su tamaño y en el plazo de 24 horas a menudo envolvía completamente el tumor (figura 5A, punto de tiempo día 1). La tinción con H y E de secciones de estos tumores revelaron una destrucción extensa de los tumores, a menudo acompañada mediante infiltración de células inflamatorias. Entonces estas masas necróticas se contrajeron a lo largo de un periodo de dos a cuatro semanas (figura 5A, puntos de tiempo días 14-30). En muchos ratones, estas masas necróticas finalmente se disolvieron y desaparecieron, dejando a los animales libres de tumores (figura 5B). Se observaron resultados similares, aunque menos drásticos, tras el tratamiento secuencial con *C. novyi-NT* y D10 (sin MMC), pero nunca con D10 y MMC en ausencia de *C. novyi-NT* y casi nunca con *C. novyi-NT* solo.

Los efectos antineoplásicos de esta terapia bacteriolítica de combinación (COBALT) se cuantificaron adicionalmente en los experimentos mostrados en la figura 6. Se trataron animales con tumores HCT116 subcutáneos relativamente grandes (volumen tumoral de partida $\sim 700 \text{ mm}^3$) con fármacos solos (D10 más MMC) o esporas de *C. novyi-NT* más los fármacos. Tal como puede observarse en la figura 6A, los fármacos solos ralentizaron el crecimiento de los tumores, aunque los tumores continuaron creciendo y hubo que sacrificar los animales tras de diez a catorce días, cuando los pesos de los tumores superaban el 10% de peso corporal. La adición de esporas de *C. novyi-NT*

potenció drásticamente los efectos del tratamiento, con tumores que realmente se contraían en vez de simplemente ralentizar su crecimiento. En el experimento mostrado en la figura 6A, cuatro de ocho animales tenían remisiones tumorales completas tras sólo una administración de COBALT. También se observó una contracción tumoral significativa cuando se les administró a los ratones un tratamiento secuencial con esporas de *C. novyi-NT* más D10 (figura 6B). Sin embargo, no hubo supervivencia libre de tumor a largo plazo y tuvo que repetirse el tratamiento una vez cada dos semanas a menos que se incluye la combinación completa, con MMC. El tratamiento sistémico con esporas de *C. novyi-NT* solas ralentizó el crecimiento tumoral, mientras que la D10 sola no tenía ningún efecto, lo que ilustra claramente el valor de la combinación (figura 6B).

Para determinar si COBALT afectaría a otros tipos de tumor, se trataron ratones C57BL/6 con tumores B16 singénicos grandes. En este caso, se sustituyó CTX por MMC, ya que las células tumorales B16 eran más sensibles a CTX que a MMC. Tal como se muestra en la figura 6C, los fármacos solos tenían algún efecto antitumoral, tal como era de esperar, aunque el tumor continuó creciendo en tamaño y hubo que sacrificar los animales en el plazo de una semana tras el inicio de la terapia. Las esporas de *C. novyi-NT* potenciaron considerablemente esos efectos, y los tumores siguieron siendo pequeños a lo largo del ciclo de cuatro semanas de este experimento. Como con los tumores HCT116 de seres humanos, se encontró que D10 más esporas de *C. novyi-NT* tenían efectos antineoplásicos significativos sobre tumores B16, pero que la adición de un agente citotóxico para los tumores (CTX) potenciaba adicionalmente la eficacia de COBALT (figura 6C). En el modelo de tumor B16, se requería el mantenimiento de COBALT (una vez a la semana) para evitar que los tumores volvieran a crecer, mientras que con células HCT116, un único tratamiento curó aproximadamente a la mitad de los ratones.

Los resultados registrados anteriormente muestran que COBALT puede dar como resultado remisiones rápidas y drásticas de tumores experimentales en ratones. Incluso tumores relativamente grandes pudieron tratarse satisfactoriamente con COBALT, aunque los tumores del tamaño usado en estos experimentos generalmente no responden bien a los agentes quimioterápicos (figura 6A-6C).

También resulta evidente que sigue habiendo muchas preguntas. Por ejemplo, no se entiende la base de la potente destrucción de células tumorales en la proximidad de las bacterias en germinación. Se encontró que muchas otras cepas bacterianas podían germinar dentro de las regiones necróticas de tumores, pero no presentaban esta potente actividad citotóxica. Esta destrucción claramente no se debe al gen de toxina letal de *C. novyi*, ya que se deletó este gen en la cepa de *C. novyi-NT* usada en COBALT. En el futuro será interesante determinar cuáles de los genes de *C. novyi-NT* son responsables de estos efectos citolíticos sobre los tumores.

Otro punto de interés era que un agente que actúa sobre la vasculatura (D10) presentaba un efecto sinérgico con las esporas de *C. novyi NT* a la hora de provocar una contracción tumoral significativa. Se supone que el colapso vascular reducía adicionalmente la tensión de oxígeno cerca de las bacterias atrapadas y aumentaba de ese modo el potencial de crecimiento bacteriano. Se administró D10 después de las esporas bacterianas en vez de antes, porque se creía que un colapso vascular parcial antes de la administración de esporas podría tener un efecto perjudicial sobre la entrega de esporas. Esta creencia se basaba en el hecho de que otros agentes de colapso vascular, tales como DMXAA y combretastatina A-4, han mostrado que ejercen sus efectos en combinación con anticuerpos marcados radiactivamente sólo cuando se administran después de, y no antes que, los anticuerpos (Theys, 2001) (Pedley, 1999) (Pedley, 2001).

Bibliografía

1. Altman, A. (2001) Semin. Oncol. 28, 3-8
2. Bagadi, H.O. y Sewell, M.M. (1973) Res. Vet. Sci, 15, 53-61
3. Bette, P., Okshe, A., Mauler, F., von Eichel-Streiber, C., Popoff, M.R. y Habermann, E. (1991) Toxicon 29, 877-887
4. Boyd, N.A., Walker, P.D. y Thomson, R.O. (1972) J. Med. Microbiol. 5, 459-465
5. Boyd, N.A., Thomson, R.O. y Walker, P.D. (1972) J. Med. Microbiol. 5, 467-472
6. Brown, J. M. y Giaccia, A. J. (1998) Cancer Res. 58, 1408-1416
7. Bryant, A.E., Chen, R.Y., Nagata, Y., Wang, Y., Lee, C.H., Finegold, S., Guth, P.H. y Stevens, D.L. (2000) J. Infect. Dis. 182, 799-807
8. Carey, R.W., Holland, J.F., Whang, H. Y., Neter, E. y Bryant, B. (1967) Eur. J. Cancer 3, 37-46
9. Chaplin, D.J., Pettit, G.R., Parkins, C.S. y Hill, S.A. (1996) Br. J. Cancer 27, Supl., S86-S8
10. Clairmont, C., Lee, K.C., Picke, J., Ittensohn, M., Low, K.B., Pawelek, J., Bermudes, D., Brecher, S.M., Margitich, D., Turner, J., *et al.* (2000) J. Infect. Dis. 181, 1996-2002
11. Eklund, M.W., Poysky, F.T., Meyers, J.A. y Pelroy, G.A. (1974) Science 186, 456-458
12. Eklund, M.W., Poysky, F.T., Peterson, M.E. y Meyers, J.A. (1976) Infect. Immun. 14, 793-803
13. Folkman, J. (2000) en Cancer Medicine, ed. Frei, J. F. H. a. E. (B.C. Decker, Hamilton, ON, Canadá), págs. 132-152
14. Fox, M.E., Lemmon, M.J., Mauchline, M.L., Davis, T.O., Giaccia, A.J., Minton, N.P. y Brown, J.M. (1996) Gene Ther. 3, 173-178
15. Gericke, D. y Engelbart, K. (1963) Cancer Res. 217-221

16. Hofmann, F., Herrmann, A., Habermann, E. y von Eichel-Streiber, C. (1995) *Mol. Gen. Genet.* 247, 670-679
17. Jain, R.K. (2002) *Adv. Drug Delivery Ref* 46, 149-168
18. Kimura, N.T., Taniguchi, S., Aoki, K. y Baba, T. (1980) *Cancer Res.* 40, 2061-2068
19. Kohwi, Y., Imai, K., Tamura, Z. y Hashimoto, Y. (1978) *Gann* 69, 613-618
- 5 20. Lemmon, M.J., van Zijl, P., Fox, M.E., Mauchline, M.L., Giaccia, A.J., Minton, N.P. y Brown, J.M. (1997) *Gene Ther.* 4, 791-796
21. Low, K.B., Ittensohn, M., Le, T., Platt, J., Sodi, S., Amoss, M., Ash, O., Carmichael, E., Chakroborty, A., *et al.* (1999) *Nat. Biotechnol.* 17, 37-41
22. Malmgren, R.A. y Flanigan, C.C. (1955) *Cancer Res.* 125, 473-478
- 10 23. Martinez, R.D. y Wilkins, T.D. (1992) *J. Med. Microbiol.* 36, 30-36
24. McManus, A.T., McLeod, C.G., Jr. y Mason, A.D., Jr. (1982) *Arch. Surg. (Chicago)* 117, 187-191
25. Mose, J.R. y Mose, G. (1963) *Cancer Res.* 24, 212-216
26. Parker, R.C., Plummer, H. C., Siebenmann, C.O. y Chapman, M.G. (1947) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 66, 461
27. Pedley, R.B., Sharman, S.K., Boxer, G.M., Boden, R., Stribbling, S.M., Davies, L., Springer, C.J. y Begent, R.H. (1999) *Cancer Res.* 59, 3998-4003
- 15 28. Pedley, R.B., Hill, S.A., Boxer, G.M., Flynn, A.A., Boden, R., Watson, R., Dearling J., Chaplin, D.J. y Begent, R.H. (2001) *Cancer Res.* 61, 4716-4722
29. Rood, J.E. y Cole, S.T. (1991) *Microbiol. Rev.* 55, 621-648
30. Sweeney, C.J., Miller, K.D., Sissons, S.E., Nozaki, S., Heilman, D.K., Shen, J. y Sledge, G.W., Jr. (2001) *Cancer Res.* 61, 3369-3372
- 20 31. Sznol, M., Lin, S.L., Bermudes, D., Zheng, L.M. y King, I. (2000) *J. Clin. Invest.* 106, 1027-1030
32. Thiele, E.H., Arison, R.N. y Boxer, G.E. (1963) *Cancer Res.* 24, 222-231
33. Tsutsui, K., Minami, J., Matsushita, O., Katayama, S., Taniguchi, Y., Nakamura, S., Nishioka, M. y Okabe, A. (1995) *J. Bacteriol.* 177, 7164-7170
- 25 34. Theys, J., Landuyt, W., Nuyts, S., Van Mellaert, L., Bosmans, E., Rijinders, A., Van Den Bogaert, W., van Oosterom, A., Anne, J. y Lambin, P. (2001) *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 30, 37-41
35. Yazawa, K., Fujimori, M., Amano, J., Kano, Y. y Taniguchi, S. (2000) *Cancer Gene Ther.* 7, 269-274
36. Yazawa, K., Fujimori, M., Nakamura, T., Sasaki, T., Amano, J., Kano, Y. y Taniguchi, S. (2001) *Breast Cancer Res. Treat.*, 66, 165-170

30

REIVINDICACIONES

1. Uso de esporas de una bacteria *Clostridium novyi* bacteriológicamente pura, aislada y defectuosa para toxinas o una bacteria *Clostridium sordellii* bacteriológicamente pura, aislada y defectuosa para toxinas en la fabricación de un medicamento para tratar tumores en un mamífero, mediante el cual el tumor experimenta una remisión o su crecimiento se ralentiza o se detiene.
2. Uso de esporas de una bacteria *Clostridium novyi* o una bacteria *Clostridium sordellii*, en las que está delecionado un gen de toxina de una forma de tipo natural de la bacteria, y un agente antitumoral, en la fabricación de un medicamento para tratar tumores en un mamífero, mediante el cual el tumor experimenta una remisión o su crecimiento se ralentiza o se detiene.
3. Uso según la reivindicación 2, en el que el medicamento es para administración intravenosa de las esporas.
4. Uso según la reivindicación 2, en el que el medicamento es para administración intratumoral de las esporas.
5. Uso según la reivindicación 2, en el que el agente antitumoral es radiación.
6. Uso según la reivindicación 2, en el que el agente antitumoral es un anticuerpo.
7. Uso según la reivindicación 2, en el que el agente antitumoral colapsa la vasculatura tumoral.
8. Uso según la reivindicación 7, en el que el agente antitumoral es colchicina.
9. Uso según la reivindicación 7, en el que el agente antitumoral es dolastatina-10.
10. Uso según la reivindicación 7, en el que el agente antitumoral es ácido 5,6-dimetilxantenon-4-acético.
11. Uso según la reivindicación 7, en el que el medicamento comprende además un fármaco quimioterápico que daña el ADN.
12. Uso según la reivindicación 11, en el que el fármaco quimioterápico que daña el ADN es mitomicina C.
13. Uso según la reivindicación 11, en el que el fármaco quimioterápico que daña el ADN es citoxano.
14. Uso según la reivindicación 2, en el que el medicamento es para administración en serie de las esporas y el agente antitumoral.
15. Uso según la reivindicación 11, en el que el medicamento es para administración en serie de las esporas, el agente antitumoral y el fármaco quimioterápico que daña el ADN.
16. Uso de esporas de una bacteria *Clostridium novyi* que es defectuosa para toxinas y dolastatina-10 en la fabricación de un medicamento para tratar tumores en un mamífero, en el que el medicamento es para administración intravenosa de las esporas, y mediante el cual el tumor experimenta una remisión o su crecimiento se ralentiza o se detiene.
17. Uso según la reivindicación 16, en el que el medicamento comprende además citoxano.
18. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 2, 7 y 11, en el que el medicamento comprende además: alopurinol.
19. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 2, 7 y 11, en el que el mamífero está hidratado.
20. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 2, 7 y 11, en el que el medicamento comprende: urato oxidasa.
21. Uso según la reivindicación 7 o la reivindicación 11, en el que el medicamento comprende además un agente esteroideo.
22. Uso según la reivindicación 21, en el que el agente esteroideo es prednisona.
23. Uso según la reivindicación 7 o la reivindicación 11, en el que el medicamento comprende además G-CSF.
24. Kit para su uso en el tratamiento de tumores, en el que los componentes del kit están en un recipiente dividido o no dividido, comprendiendo dichos componentes:

esporas de una bacteria *Clostridium novyi* defectuosa para toxinas o una bacteria *Clostridium sordellii* defectuosa para toxinas; y un agente que colapsa la vasculatura tumoral.

- 5 25. Kit para su uso según la reivindicación 24, en el que un gen de toxina de una forma de tipo natural de bacteria *Clostridium novyi* o *Clostridium sordellii* está delecionado en las esporas de la bacteria anaerobia.
26. Kit para su uso según la reivindicación 24, que comprende además un fármaco quimioterápico que daña el ADN.
- 10 27. Kit para su uso según la reivindicación 24, en el que el agente es colchicina.
28. Kit para su uso según la reivindicación 24, en el que el agente es dolastatina-10.
- 15 29. Kit para su uso según la reivindicación 24, en el que el agente es ácido 5,6-dimetilxantenon-4-acético.
30. Kit para su uso según la reivindicación 26, en el que el fármaco quimioterápico que daña el ADN es mitomicina C.
- 20 31. Kit para su uso según la reivindicación 26, en el que el fármaco quimioterápico que daña el ADN es citoxano.
32. Kit para su uso en el tratamiento de tumores, en el que los componentes del kit están en un recipiente dividido o no dividido, comprendiendo dichos componentes:
- 25 esporas de bacterias *Clostridium novyi* que son defectuosas para toxinas;
- dolastatina-10; y
- 30 citoxano.

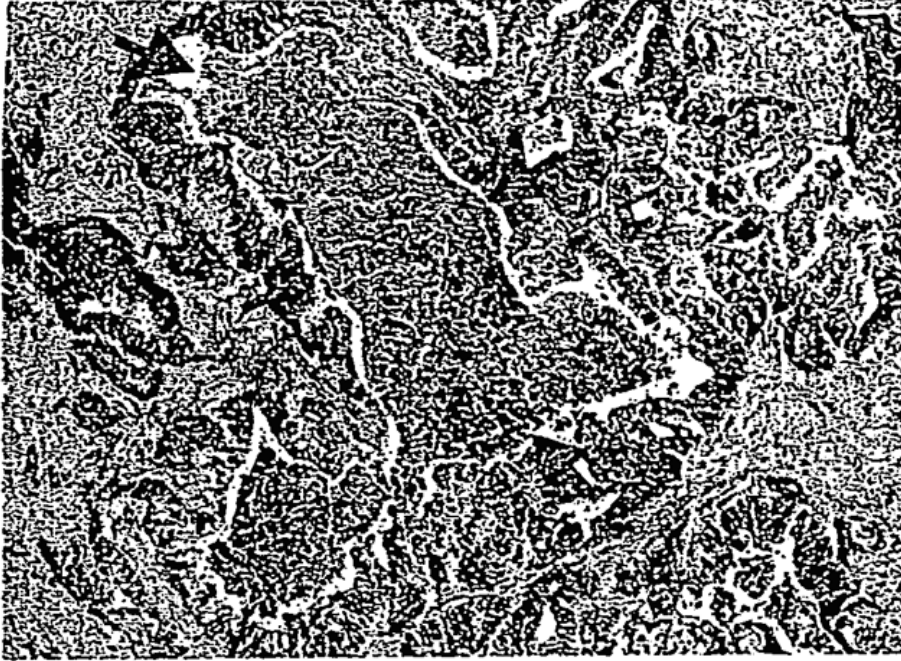


FIGURA 1

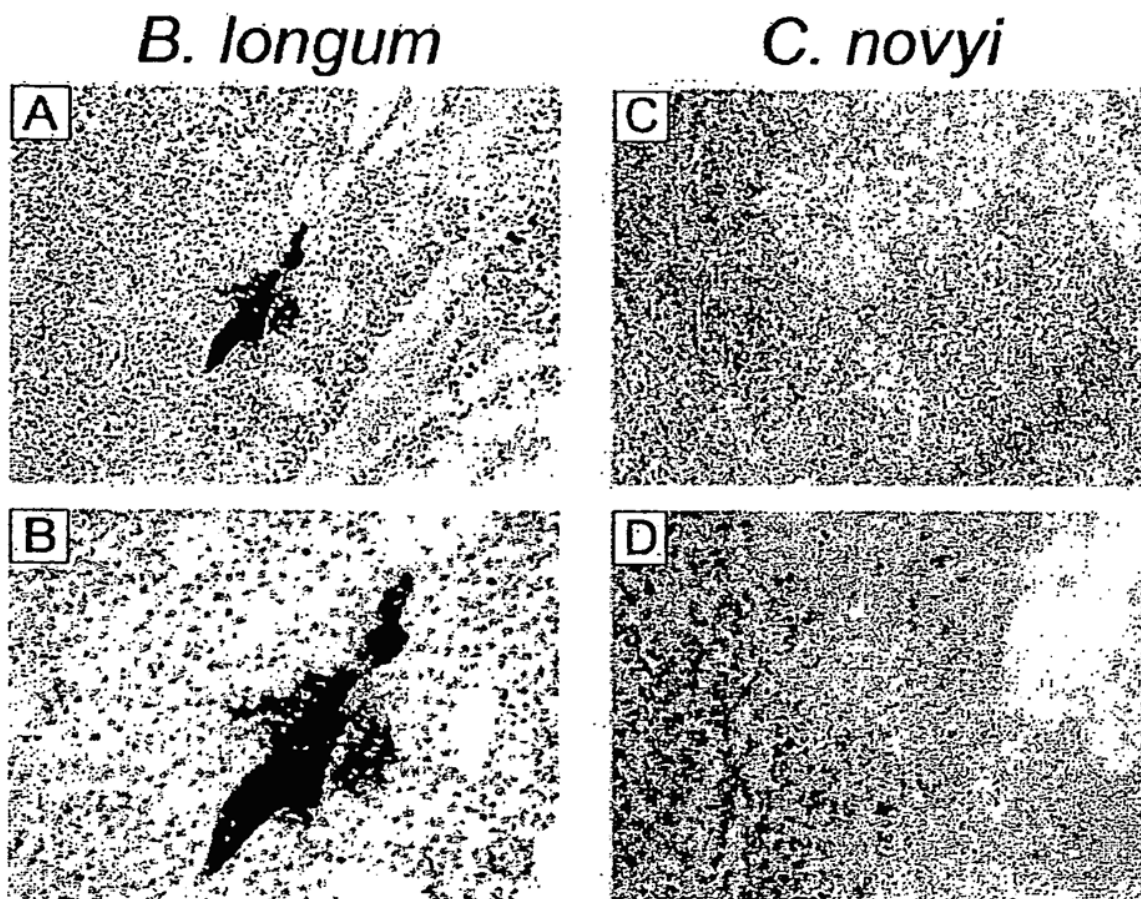


FIGURA 2

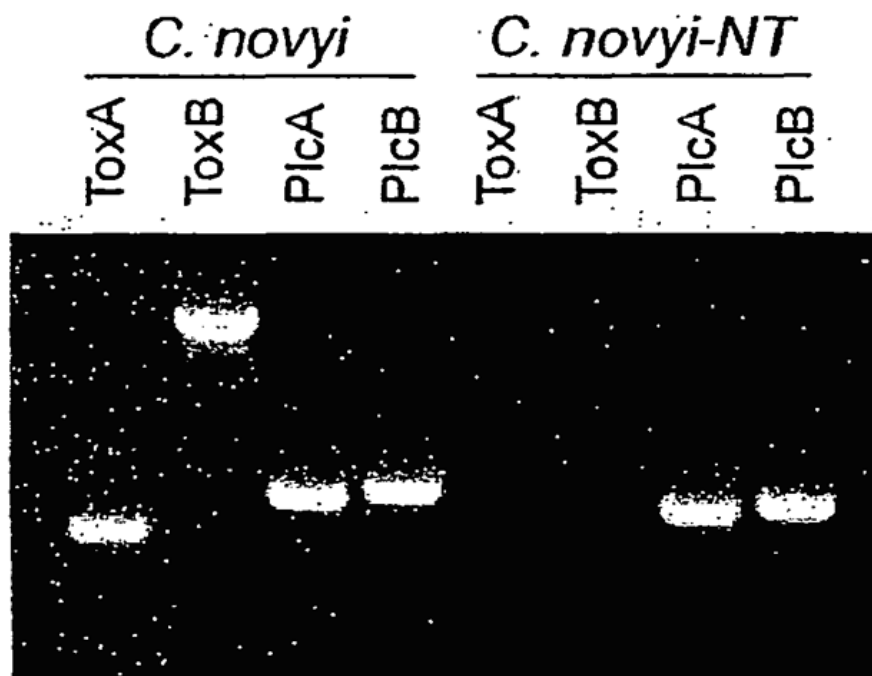


FIGURA 3

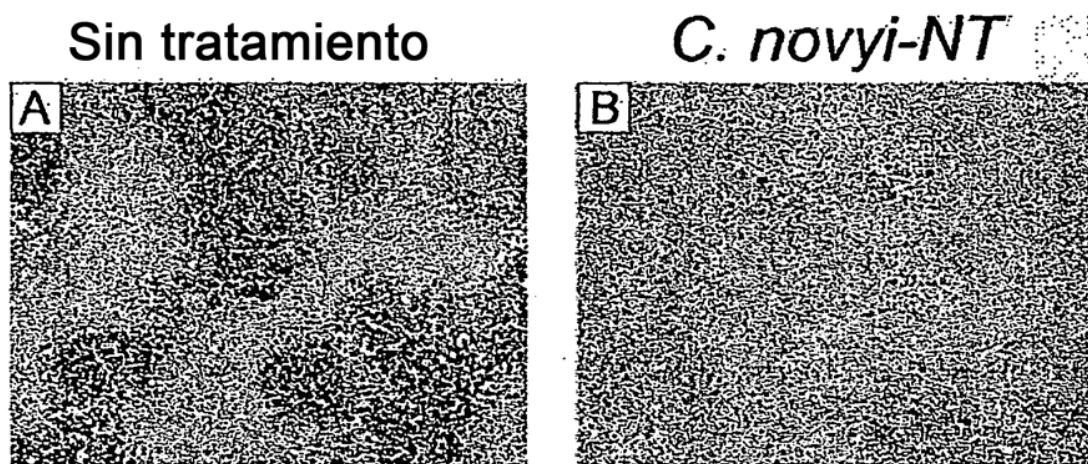


FIGURA 4

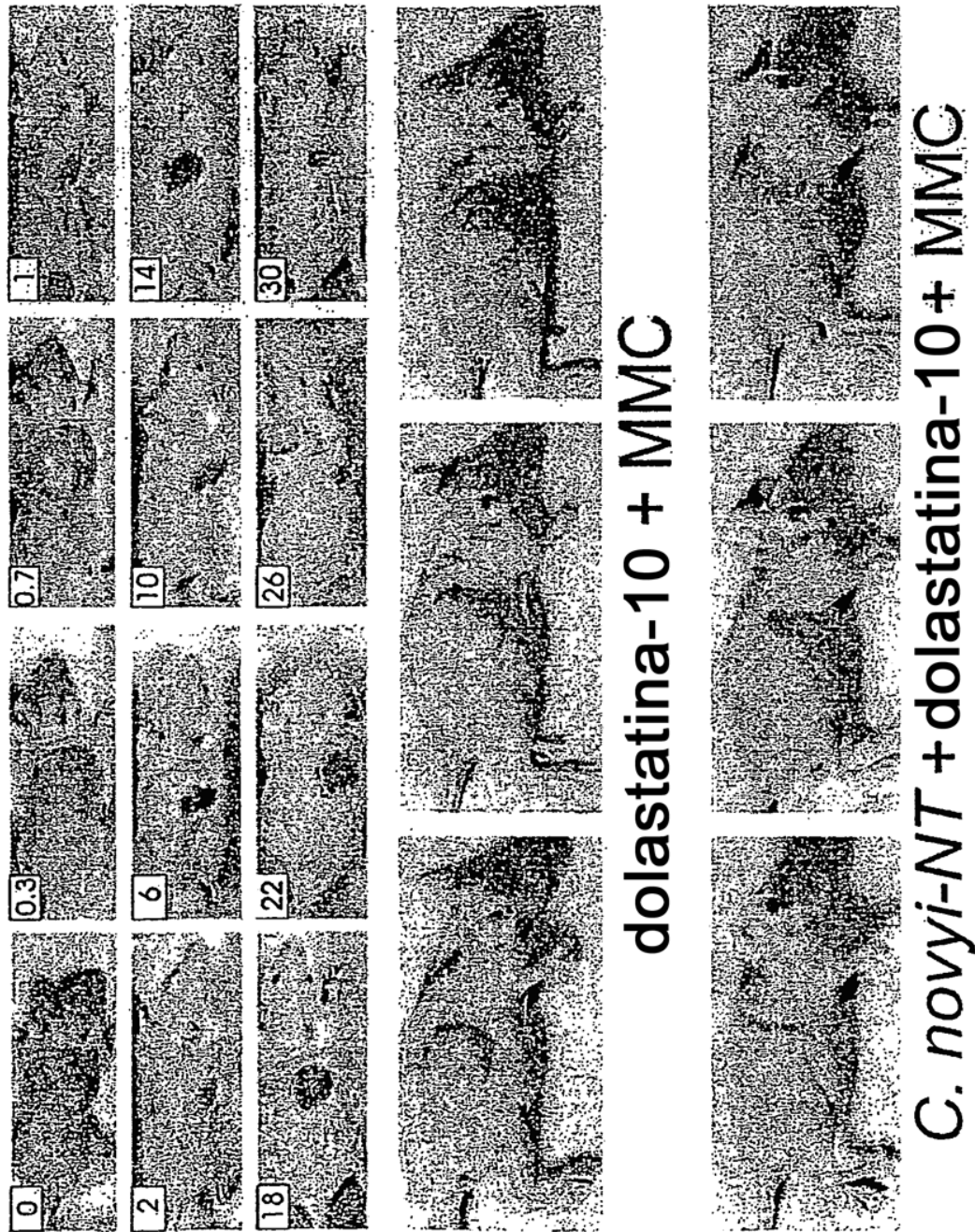


FIGURA 5

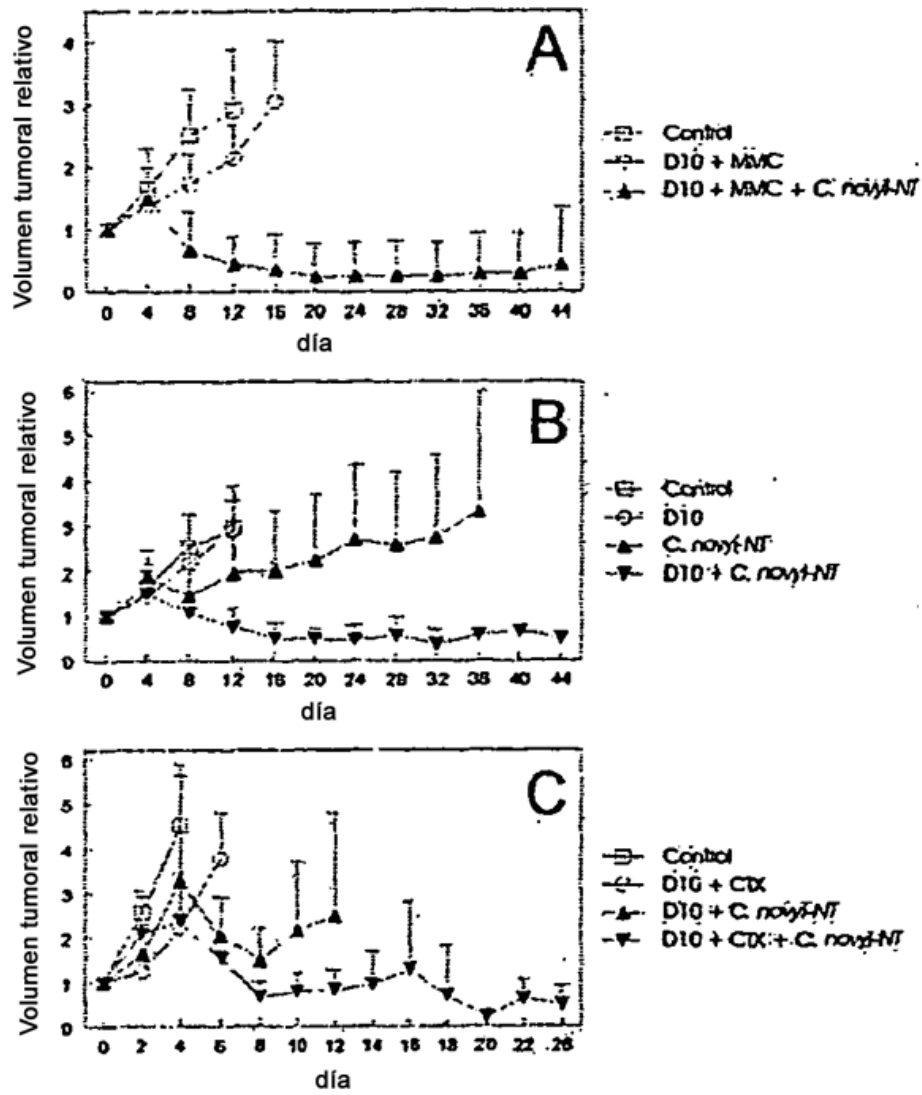


FIGURA 6