

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 458 498**

51 Int. Cl.:

**A61K 35/74** (2006.01)

**A61K 31/7105** (2006.01)

**A61K 31/713** (2006.01)

**A61K 31/7088** (2006.01)

**A61K 31/711** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.06.2007 E 07825666 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.01.2014 EP 2040725**

54 Título: **Administración dirigida de fármacos, ácidos nucleicos terapéuticos y ácidos nucleicos funcionales a célula de mamífero por medio de células bacterianas muertas intactas**

30 Prioridad:

**23.06.2006 US 815883 P**  
**30.03.2007 US 909078 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**05.05.2014**

73 Titular/es:

**GENEIC MOLECULAR DELIVERY PTY LTD.**  
**(100.0%)**  
**105 Delhi Road, Riverside Corporate Park North**  
**Ryde**  
**Sydney NSW 2113 , AU**

72 Inventor/es:

**BRAHMBHATT, HIMANSHU y**  
**MACDIARMID, JENNIFER**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 458 498 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

Administración dirigida de fármacos, ácidos nucleicos terapéuticos y ácidos nucleicos funcionales a célula de mamífero por medio de células bacterianas muertas intactas

5

**Antecedentes de la invención**

La presente invención se refiere a la administración dirigida, por medio de células bacterianas muertas intactas, de moléculas bioactivas, incluidos ácidos nucleicos terapéuticos, ácidos nucleicos funcionales, fármacos, péptidos, proteínas, hidratos de carbono y lípidos, a células huésped de mamífero.

10

Existen una serie de obstáculos que siguen suponiendo un reto para la administración dirigida de moléculas bioactivas a célula de mamífero (p. ej., células cancerosas), en particular *in vivo*. Esos obstáculos incluyen (a) la composición, las características funcionales y la estabilidad de los vehículos de administración, (b) introducir concentraciones terapéuticamente significativas de moléculas bioactivas, (c) dirigirse a células enfermas deseadas *in vivo*, (d) superar una serie de barreras intracelulares y administrar con éxito concentraciones terapéuticas de moléculas bioactivas a objetivos intracelulares, (e) evitar una serie de elementos inmunitarios del huésped tales como los anticuerpos, el complemento y los macrófagos que pueden destruir un vector antes de que alcance un objetivo, (f) atravesar la barrera endotelial de las paredes de los vasos sanguíneos, en particular en el emplazamiento de una masa tumoral, (g) migrar a través de varias capas de células para alcanzar un objetivo (p. ej., se sabe que un tumor sólido es una estructura organizada que contiene tanto células tumorales como células sanas; por tanto, un vector debe atravesar varias capas de células sanas para acceder a las células malignas), (h) migrar a través de una matriz extracelular (MEC) que comprende glucoproteínas, glucosaminoglucanos sulfatados, hialuronano, proteoglucanos y colágeno que rellena el espacio entre las células y, por lo tanto, impide el transporte de un vector, y (i) abordar la hipertensión intersticial alta (presión hidrostática elevada fuera de los vasos sanguíneos) en el microentorno del tumor, lo que puede limitar el acceso de las moléculas bioactivas.

15

20

25

Se han propuesto una serie de vectores diferentes para la administración tanto de ácidos nucleicos como de fármacos que incluyen vectores víricos, no víricos no vivos y no víricos vivos. Los vectores no víricos no vivos se han adaptado para la administración tanto de ácidos nucleicos como de fármacos. Los otros dos tipos de vectores se han adaptado para la administración de ácidos nucleicos. Los vectores no víricos vivos se están desarrollando principalmente para aplicaciones de destrucción directa de células tumorales. Aunque tienen ventajas, estos vectores también presentan inconvenientes.

30

Se han desarrollado vectores víricos, tales como retrovirus, adenovirus, virus adenoasociados, virus de la viruela, virus del herpes simple y lentivirus, para la administración de genes. Sin embargo, los vectores víricos no pueden administrar genes de forma sistemática y específica a células tumorales primarias y/o metastatizadas sin infectar tejidos sanos (Akporiaye y Hers, 1999; Biederer *et al.*, 2002; Green y Seymour, 2002). Adicionalmente, la extremadamente limitada capacidad de difusión de los viriones en los espacios extracelulares impide significativamente la propagación de los vectores víricos. Además, los virus son antigénicos y, por lo tanto, dan lugar a respuestas inmunitarias en el huésped. Estas respuestas inmunitarias incluyen tanto respuestas adaptativas como respuestas innatas inespecíficas (Chen *et al.*, 2003; Ferrari *et al.*, 2003; Wakimoto *et al.*, 2003). Estas últimas desempeñan un papel importante en la eliminación de vectores adenovíricos (Liu y Muruve, 2003) y de VHS (Wakimoto *et al.*, 2003).

35

40

45

Los vectores no víricos no vivos se ejemplifican con polímeros catiónicos (poliplexos), lípidos catiónicos (liposomas, lipoplexos) y nanopartículas sintéticas (nanoplexos). Son más versátiles que los vectores víricos y ofrecen varias ventajas distintas porque se puede controlar su composición molecular, la fabricación y el análisis de estos vectores es bastante sencilla, pueden incluir una variedad de tamaños de transgenes (Kreiss *et al.*, 1999; de Jong *et al.*, 2001) y son menos inmunógenos (Whitmore *et al.*, 1999, 2001; Dow *et al.*, 1999; Ruiz *et al.*, 2001). No obstante, la eficacia de la administración génica con vectores no víricos no vivos es significativamente menor que con vectores víricos. Se necesitan al menos  $10^6$  copias de plásmidos para transfectar una sola célula, de las que aproximadamente  $10^2$ - $10^4$  copias llegan realmente hasta el núcleo para la expresión de los transgenes (Felgner y Ringold, 1989; James y Giorgio, 2000; Tachibana *et al.*, 2002). Esta ineficacia se puede atribuir a la incapacidad de los vectores no víricos no vivos para superar los numerosos desafíos que encuentran entre el sitio de administración y la localización en el núcleo de la célula objetivo, incluidos, (a) la estabilidad física y química del ADN y su vehículo de administración en el espacio extracelular, (b) la incorporación celular por endocitosis, (c) el escape de los compartimentos endosómicos antes del tránsito hacia los liposomas y el transporte citosólico y (d) la localización del plásmido en el núcleo para la transcripción. Además de estos obstáculos físicos y químicos, existen barreras biológicas, tales como respuestas inmunógenas frente al propio vector y la estimulación inmunitaria por determinadas secuencias de ADN que contienen un motivo CpG central sin metilar (Yew *et al.*, 1999; Scheule, 2000; Ruiz *et al.*, 2001).

50

55

60

Como alternativa a los vehículos de administración de ácidos nucleicos/fármacos no vivos, también se han desarrollado vectores bacterianos vivos para el tratamiento dirigido de tumores (Pawalek *et al.*, 2003; Soghomonyan *et al.*, 2005). Estos vectores no llevan una carga útil de ácidos nucleicos o fármacos, sino que, de forma preferente,

65

se acumulan en células tumorales, se replican intracelularmente y destruyen las células infectadas (Pawelek *et al.*, 1997). Se cree que este fenómeno está facilitado por un sistema bacteriano complejo para introducir proteínas bacterianas directamente en las células de mamífero, lo que puede dar lugar en la inducción de la apoptosis (Chen *et al.*, 1996; Monack *et al.*, 1996; Zhou *et al.*, 2000). Actualmente, se están investigando como vectores bacterianos vivos selectivos de tumores las bifidobacterias (Yazawa *et al.*, 2000; 2001; Li *et al.*, 2003), las *Clostridium* (Minton *et al.*, 1995; Fox *et al.*, 1996; Lemmon *et al.*, 1997; Theys *et al.*, 2001; Dang *et al.*, 2001; Nuyts *et al.*, 2002a; 2002b; Liu *et al.*, 2002) las *Salmonella* (Pawelek *et al.*, 1997; Low *et al.*, 1999; Platt *et al.*, 2000; Luo *et al.*, 2001; Rosenberg *et al.*, 2002) y los vibrios (Yu *et al.*, 2004).

También se han explorado las bacterias vivas atenuadas como vehículos para administrar ácidos nucleicos (Paglia *et al.*, 2000; Weiss y Chakraborty 2001; Yuhua *et al.*, 2001), que pueden codificar inhibidores angiogénicos (Lee *et al.*, 2005a; 2005b; Li *et al.*, 2003), enzimas convertidoras de profármacos (King *et al.*, 2002) o citocinas (Yamada *et al.*, 2000). Los inconvenientes significativos de este planteamiento incluyen **(a)** las bacterias recombinantes vivas pierden gradualmente el ADN plasmídico *in vivo*, principalmente debido a la ausencia de la presión de selección y la segregación de plásmidos asociada, **(b)** las bacterias portadoras de ADN plasmídico tienden a tener una velocidad de crecimiento menor y parece que se acumulan a menores concentraciones y residen durante un periodo de tiempo más corto dentro de los tumores que las bacterias sin plásmidos, **(c)** los vectores bacterianos gramnegativos vivos pueden provocar una respuesta de endotoxinas grave en huéspedes mamíferos, posiblemente debido a la liberación *in vivo* de endotoxinas (lipopolisacárido; **LPS**), y evocan una respuesta de receptores de tipo Toll debido a la invasión celular, **(d)** la mayoría de las bacterias vivas dirigidas a tumores se acumulan y crecen en los focos necróticos y relativamente hipóxicos dentro de los tumores, pero no en tumores bien oxigenados en el borde de los nódulos en crecimientos donde normalmente son más agresivas las células tumorales, **(e)** el riesgo asociado con la posible inversión a un fenotipo virulento de estas bacterias es una gran preocupación (Dunham, 2002) y **(f)** el riesgo de infectar células sanas puede dar lugar a una bacteremia y el choque séptico asociado. Esto último puede ser un problema en particular en pacientes inmunodeprimidos, tales como pacientes con cáncer avanzado.

Debido a que los problemas siguen impidiendo el éxito de los tratamientos contra el cáncer en particular, existe una necesidad urgente de proporcionar estrategias de administración dirigida que administren de forma selectiva agentes bioactivos a células tumorales y órganos objetivo o que protejan los tejidos sanos de los agentes antineoplásicos administrados. Estas estrategias deberían mejorar la eficacia del tratamiento al aumentar los índices terapéuticos de los agentes antineoplásicos, al mismo tiempo que reducen al mínimo los riesgos de toxicidad relacionada con el tratamiento.

La presente invención proporciona un vehículo de administración versátil para estrategias mejoradas de administración de fármacos, ácidos nucleicos terapéuticos y ácidos nucleicos funcionales, especialmente, pero no de forma exclusiva, en el contexto de la quimioterapia contra el cáncer.

### Sumario de la invención

La invención se define en las reivindicaciones.

Para abordar estas y otras necesidades, se proporciona en un aspecto una composición que comprende una pluralidad de células bacterianas muertas intactas y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las células bacterianas muertas contienen un ácido nucleico terapéutico, un fármaco o un ácido nucleico funcional. Con respecto al último, en un modo de realización, el ácido nucleico funcional no tiene plásmidos. A este respecto, los ácidos nucleicos funcionales se introducen directamente en células bacterianas muertas al atravesar la membrana intacta de la célula bacteriana, sin usar construcciones de expresión a base de plásmidos o la maquinaria de expresión de una célula huésped. Estos ácidos nucleicos funcionales sin plásmidos se ejemplifican con ADN o ARN mono-, bi- o multicatenario. En un modo de realización, las células bacterianas muertas contienen un ácido nucleico funcional sin plásmidos que es un ARN funcional. En un modo de realización preferente, la composición no tiene, esencialmente, endotoxina.

También se proporcionan ligandos biespecíficos útiles para dirigir células bacterianas muertas a célula huésped de mamífero. El ligando biespecífico puede ser un polipéptido, un hidrato de carbono o un glucopéptido y puede comprender un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo. En modos de realización preferentes, el ligando biespecífico tiene un primer brazo portador de la especificidad por una estructura de superficie bacteriana y un segundo brazo portador de la especificidad por una estructura de superficie de célula de mamífero. Además, el primer brazo y el segundo brazo del ligando biespecífico puede ser monoespecífico o multivalente. Una estructura de superficie bacteriana deseable para la unión del ligando es un componente de O-polisacárido de un lipopolisacárido (LPS). Las estructuras de superficie de célula de mamífero deseables para la unión de ligandos son receptores, preferentemente aquellos que pueden activar la endocitosis mediada por receptores.

De acuerdo con otro aspecto, se describe un procedimiento de administración que comprende poner en contacto una pluralidad de células bacterianas muertas con células de mamífero que son competentes para la fagocitosis o la endocitosis, de tal forma que las células de mamífero engullen a las células bacterianas muertas y liberan su carga

útil en el interior de la célula. La carga útil puede comprender un ácido nucleico terapéutico, un ácido nucleico funcional o un fármaco.

5 En un modo de realización, se describe un procedimiento de administración de un ácido nucleico funcional que comprende (a) proporcionar una pluralidad de células bacterianas muertas en un vehículo farmacéutico, pluralidad de la que cada célula bacteriana muerta engloba (i) un ácido nucleico funcional o (ii) un plásmido que comprende un segmento que codifica un ácido nucleico y después (b) poner en contacto dichas células bacterianas muertas de la pluralidad con células de mamífero objetivo, de tal forma que dichas células de mamífero engullen dicha célula bacteriana, por lo que se libera dicho ácido nucleico funcional al citoplasma de la célula objetivo. En un aspecto, las  
10 células bacterianas muertas no tienen plásmidos, mientras que en otros, el ácido nucleico funcional es ARN regulador.

De acuerdo con otro aspecto, se describe un procedimiento de administración dirigida que comprende poner en contacto ligandos biespecíficos con (i) células bacterianas muertas intactas que contienen una carga útil deseada y  
15 (ii) células de mamífero, preferentemente células de mamífero no fagocíticas. Los ligandos biespecíficos tienen especificidad tanto por un componente de superficie de las células bacterianas muertas intactas como por un componente de superficie de las células de mamífero, tal como un receptor. Como consecuencia, los ligandos hacen que la célula bacteriana muerta se una a las células de mamífero, las células de mamífero engullen a las células bacterianas muertas y la carga útil contenida en las células bacterianas muertas se libera al citoplasma de la célula de mamífero. La carga útil puede comprender un ácido nucleico terapéutico, un ácido nucleico funcional o un fármaco.

En otro aspecto más, se describe un procedimiento para superar la resistencia a fármacos o la resistencia la apoptosis y tratar una neoplasia maligna en un sujeto mediante la administración de un ácido nucleico funcional a  
25 una célula objetivo. El procedimiento comprende poner en contacto una célula bacteriana muerta que contiene (i) una molécula de ácido nucleico funcional o (ii) un plásmido que comprende un segmento que codifica una molécula de ácido nucleico funcional con una célula de mamífero objetivo. La célula de mamífero engulle a la célula bacteriana muerta, se libera el ácido nucleico funcional al citoplasma, se transporta al núcleo y lo expresa la célula objetivo.

30 En relación con la presente invención, el contacto entre las células bacterianas muertas y las células de mamífero puede ser *in vitro* o *in vivo*.

También se describen procedimientos para cargar células bacterianas muertas con un fármaco. Un procedimiento de este tipo implica crear un gradiente de concentración del fármaco entre un medio extracelular que contiene las células bacterianas muertas y el citoplasma de la célula bacteriana muerta. De forma natural, el fármaco se desplaza a favor de este gradiente de concentración y se introduce en el citoplasma de la célula bacteriana muerta. Se evita la fuga del fármaco del citoplasma bacteriano debido a que las células bacterianas son metabólicamente inactivas.

40 Otro procedimiento de carga de las células bacterianas muertas con un fármaco implica cultivar una célula bacteriana en condiciones tales que la célula bacteriana transcriba y traduzca un ácido nucleico que codifica el fármaco, de modo que se libere el fármaco al citoplasma de la célula bacteriana y después destruir la célula bacteriana para formar una o más células bacterianas muertas que contienen el fármaco en el citoplasma.

45 De acuerdo con otro aspecto, la presente divulgación contempla un procedimiento para formular una célula bacteriana muerta con un ácido nucleico funcional sin plásmidos. El procedimiento comprende coincubar una pluralidad de células bacterianas muertas con un ácido nucleico funcional, tal como ARN regulador como ARNip, ARNmi o ARNhc, en un tampón. En algunos modos de realización, la coincubación puede implicar una agitación suave, mientras que en otros, la coincubación es estática. En algunos aspectos, la coincubación dura aproximadamente media hora, mientras que en otros, dura aproximadamente una hora. En un modo de realización, el tampón comprende solución salina tamponada, por ejemplo, una solución de tampón fosfato 1x. En otro modo de realización, la coincubación se lleva a cabo a una temperatura de aproximadamente 4 °C a aproximadamente 37 °C, de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 30 °C, de aproximadamente 25 °C o de aproximadamente 37 °C. La coincubación puede comprender aproximadamente  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$ ,  $10^{10}$ ,  $10^{11}$ ,  $10^{12}$  o  $10^{13}$  células bacterianas muertas.

55 La presente divulgación contempla un uso de células bacterianas muertas intactas y ligandos biespecíficos en la preparación de un medicamento para su uso en un procedimiento para tratar una enfermedad o modificar un rasgo mediante la administración del medicamento a una célula, un tejido o un órgano. En el medicamento, las células bacterianas muertas contienen una molécula de ácido nucleico terapéutico, un fármaco o una molécula de ácido nucleico funcional y, opcionalmente, ligandos biespecíficos que se pueden unir a las células bacterianas muertas y dirigirse a células de mamífero no fagocíticas. Estos medicamentos son útiles para tratar diversas afecciones y enfermedades al aumentar la expresión o la función de una proteína deseada o al inhibir la expresión o la función de una proteína objetivo. Son ilustrativos de las afecciones y enfermedades de este tipo un cáncer y una enfermedad contraída, tal como el sida, la neumonía, el enfisema y la tuberculosis. De forma alternativa, el tratamiento puede afectar a un rasgo, tal como la fertilidad, o a una respuesta inmunitaria asociada con un alérgeno o un agente infeccioso:  
60  
65

La presente divulgación proporciona también un procedimiento farmacéuticamente aceptable para purificar células bacterianas muertas intactas. El procedimiento combina (i) la destrucción de células bacterianas vivas con antibióticos, (ii) la filtración de flujo cruzado y/o la filtración en línea, para eliminar la endotoxina libre, los desechos celulares, los ácidos nucleicos libres, las vesículas de membrana bacteriana, los contaminantes del medio, y (iii) el secuestro basado en anticuerpos, para eliminar la endotoxina libre residual.

### Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra efectos antitumorales muy significativos por medio de células bacterianas muertas intactas rellenas de fármacos quimioterápicos dirigidas a anticuerpos biespecíficos. Se implantó por vía subcutánea (entre los omóplatos) un injerto de cáncer de mama humano (MDA-MB-468) en ratones Balb/c *nulnu* y cuando los volúmenes de los tumores alcanzaron los  $\sim 70 \text{ mm}^3$ , se trató a los ratones ( $n = 11$  ratones por grupo) por vía intravenosa (*i.v.*) con doxorubicina libre (G2) o células bacterianas de *S. typhimurium* muertas intactas no dirigidas rellenas de dox (G3) o con células bacterianas de *S. typhimurium* muertas intactas dirigidas a EGFR rellenas de dox (G4). Los ratones del G1 fueron los controles y recibieron solución salina fisiológica estéril (*i.v.*). Los tratamientos se administraron en los días marcados con un triángulo en el eje x y el volumen tumoral se midió como se muestra en el eje y. El resultado muestra un efecto antitumoral muy significativo al usar *S. typhimurium*<sub>Dox</sub> muertas<sup>EGFR</sup> (G4) como tratamiento, mientras que los ratones del G2 y el G3 no mostraron efectos antitumorales. Se muestra la desviación estándar para cada medida.

La figura 2 muestra gráficamente que las células bacterianas muertas intactas rellenas de paclitaxel o ARNip inhiben el crecimiento de los tumores de células cancerosas de colon humano (HCT116) *in vivo*.

La figura 3 muestra la inversión de la resistencia farmacológica en ratones portadores de injertos de cáncer de colon humano (Caco-2) al usar un protocolo de tratamiento dual, en el que el primer tratamiento comprende *S. typhimurium* muertas rellenas de EGFR portadoras de ARNhc anti-MDR-1 y el segundo tratamiento comprende *S. typhimurium* muertas rellenas de EGFR, portadoras de irinotecán o 5-fluorouracilo (5-FU). El primer tratamiento y los segundos tratamientos se indican con un triángulo y una flecha, respectivamente, debajo del eje x.

### Descripción detallada

La presente invención se refiere a:

- una composición que comprende (I) una pluralidad de células bacterianas muertas intactas, pluralidad de la que cada célula bacteriana muerta posee una pared celular y/o membrana celular intacta, que contienen material genético que es endógeno de la especie bacteriana, y que engloba (i) un ácido nucleico terapéutico que codifica un producto, tal como un péptido, un polipéptido o una proteína, cuya producción se desea en una célula objetivo, (ii) un fármaco que es una sustancia fisiológica o farmacéuticamente activa que produce un efecto local o sistémico deseado en mamíferos y seres humanos o (iii) una molécula de ácido nucleico funcional, que tras la introducción en una célula huésped, interfiere específicamente con la expresión de una proteína, (II) un vehículo farmacéuticamente aceptable para las mismas y (III) un ligando biespecífico unido a cada célula bacteriana muerta intacta; a
- un procedimiento de carga de células bacterianas muertas intactas con un fármaco que comprende la etapa de crear un gradiente de concentración de dicho fármaco entre un medio extracelular que contiene dichas células bacterianas muertas intactas y el citoplasma de la célula bacteriana muerta intacta, de modo que dicho fármaco se desplaza a favor de dicho gradiente de concentración y se introduce en el citoplasma de la célula bacteriana muerta intacta, en el que cada célula bacteriana muerta posee una pared celular y/o membrana celular intacta y contiene material genético que es endógeno de la especie bacteriana; y a
- un procedimiento de carga de células bacterianas muertas con un fármaco, que comprende las etapas de:
  - (a) cultivar una célula bacteriana en condiciones tales que la célula bacteriana transcriba y traduzca un ácido nucleico terapéutico que codifica dicho fármaco, de modo que se libere dicho fármaco en el citoplasma de dicha célula bacteriana, y a continuación
  - (b) destruir dicha célula bacteriana para formar una o más células bacterianas muertas que contienen dicho fármaco en el citoplasma,
 en el que cada célula bacteriana muerta posee una pared celular y/o membrana celular intacta y contiene material genético que es endógeno de la especie bacteriana.

Los presentes inventores han determinado que las células bacterianas muertas intactas son vehículos eficaces para la administración dirigida de ácidos nucleicos terapéuticos, ácidos nucleicos funcionales y fármacos a células

enfermas, en particular células cancerosas, tanto *in vitro* como *in vivo*. Detrás de esa determinación se encuentran una serie de hallazgos sorprendentes.

5 Por ejemplo, los inventores descubrieron que cuando las composiciones que comprenden (a) células bacterianas muertas intactas que contienen una carga de ácido nucleico terapéutico, un fármaco o un ácido nucleico funcional, (b) ligandos biespecíficos y (c) un vehículo farmacéuticamente aceptable se ponen en contacto con células enfermas *in vitro* o *in vivo*, las células bacterianas muertas intactas vehículo son endocitadas con gran eficacia en células de mamífero no fagocíticas objetivo. Este hallazgo fue una sorpresa, porque aunque se han usado ligandos biespecíficos para dirigir vehículos de administración víricos y no víricos hacia células de mamífero no fagocíticas (Wickham *et al.*, 1996; Nettelbeck *et al.*, 2001; Boucher *et al.*, 2003; Ogris y Wagner, 2002), se creía que la endocitosis mediada por receptores no funcionaría para partículas tan grandes como las células bacterianas.

15 Por ejemplo, se han redirigido vectores adenovíricos hacia receptores de superficie de células de mamífero, tales como la endoglina de las células endoteliales, y se han internalizado por medio de fosas recubiertas de clatrina en la membrana plasmática de la célula de mamífero. Wickham *et al.*, 1996; Nettelbeck *et al.*, 2001; Boucher *et al.*, 2003. Las fosas recubiertas de clatrina tienen el aspecto de una copa que envuelve el vector, pero se entiende que el tamaño de la copa es un factor limitante. Las fosas recubiertas de clatrina tienen un tamaño limitado de 85-110 nm, debido al tamaño del recubrimiento de clatrina. Swanson y Watts, 1995. Las células bacterianas, en cambio, tienen un diámetro de al menos 400 nm y una longitud de 1.000 nm. Por tanto, no cabía esperar que un planteamiento de 20 direccionamiento de este tipo funcionara para células bacterianas muertas.

25 Los conocimientos relativos a otros grandes vectores respaldaban las expectativas de que las células bacterianas muertas no se internalizarían a través de fosas recubiertas de clatrina. Por ejemplo, de forma preferente, los lipoplexos grandes (vectores no víricos de hasta 500 nm) entran en las células por endocitosis independiente del receptor y la clatrina, mientras que los lipoplexos más pequeños (de menos de 200 nm) se pueden internalizar por medio de un proceso inespecífico dependiente de la clatrina. Simoes *et al.*, 1999. Del mismo modo, los virus grandes, tales como el virus de la variolovacuna, con un tamaño del orden de 350 nm x 250 nm, no infectan células de mamífero por medio de una ruta recubierta de clatrina. Essani y Dales, 1979.

30 En una línea similar, las células de mamífero no fagocíticas no pueden engullir patógenos grandes, como las células bacterianas. Solamente los fagocitos profesionales, como los macrófagos, engullen estos patógenos y el proceso de atrapamiento es independiente de la clatrina y del receptor; se lleva a cabo por fagocitosis. La interacción de patógenos grandes con la superficie de la célula induce una cascada de señalización compleja que da lugar a la redistribución de la actina en la membrana plasmática para formar una copa fagocítica grande, que engulle a la 35 bacteria. Dramsi y Cossart, 1998. Las cascadas de señalización responsables (tras la entrada de las bacterias) de la redistribución de la actina de la membrana plasmática son poco conocidas. Galan, 1996; Menard *et al.*, 1996; Finlay y Cossart, 1997; Dramsi y Cossart, 1998.

40 Las investigaciones específicas acerca del efecto del tamaño de partícula sobre la endocitosis mediada por receptores demuestran que el proceso depende en gran medida del tamaño. Por ejemplo, Aoyama *et al.*, 2003, estudiaron el efecto del tamaño de partícula sobre la administración génica glucovírica y llegaron a la conclusión de que el tamaño de partícula óptimo para la endocitosis mediada por receptores es de -25 nm. Véanse también Nakai *et al.*, 2003; Osaki *et al.*, 2004. Gao *et al.*, 2005, confirmaron esa conclusión.

45 Además, aunque se ha informado de que se han usado ligandos biespecíficos para redirigir vectores víricos, el procedimiento no ha sido siempre satisfactorio en el contexto de la administración génica. Al intentar redirigir virus desde sus receptores originales hacia receptores alternativos, muchos experimentos han demostrado que la unión a la superficie celular es insuficiente para la entrada de virus mantenida y la expresión génica. Asimismo, al modificar las proteínas de la envoltura vírica para el redireccionamiento, presentaban una actividad de fusión baja, lo que daba lugar a la entrada ineficaz de los virus en las células. Zhao *et al.*, 1999. En ausencia de un direccionamiento 50 específico, las estrategias dependían de la inyección directa en un emplazamiento localizado. Akporiaye y Hersh, 1999.

55 Por tanto, la técnica sugería que los ligandos biespecíficos no permitirían la entrada de las células bacterianas muertas vehículo en células de mamífero no fagocíticas. Como respaldo adicional a este punto, los inventores descubrieron que las células bacterianas muertas que no están dirigidas son incapaces de adherirse específicamente a las células de mamífero no fagocíticas y administrarles su carga útil, incluso después de repetidos intentos con periodos de incubación prolongados en una serie de líneas celulares de mamífero. En particular, las células de mamífero no fagocíticas no internalizan las células bacterianas muertas no dirigidas. Por el contrario, los 60 fagocitos profesionales, como los macrófagos, fagocitan con facilidad las células bacterianas muertas. Esto corrobora los primeros hallazgos de que las micropartículas de hasta 12  $\mu\text{m}$  las fagocitan los fagocitos profesionales (Kanke *et al.*, 1983) y que la incorporación máxima de micropartículas en los macrófagos se produce con partículas de < 2  $\mu\text{m}$  (Tabata e Ikada, 1988; 1990). Por lo tanto, a diferencia de los vectores víricos que se adhieren específicamente a los receptores víricos y desencadenan su internalización, las células bacterianas muertas no 65 tienen ningún mecanismo similar para invadir o entrar en células de mamífero no fagocíticas.

Frente a estos antecedentes, los inventores descubrieron también que los ligandos biespecíficos pueden dirigir la endocitosis de células bacterianas muertas intactas en el interior de células de mamífero no fagocíticas. Los datos preliminares apuntan a que la internalización de células bacterianas se puede producir por medio de la ruta dependiente del receptor y de la macropinocitosis, si bien los solicitantes no están limitados por esta teoría.

Los inventores descubrieron además que después de la endocitosis, las bacterias muertas se degradan por completo en vacuolas intracelulares, probablemente en compartimentos endolisosómicos. Esto fue sorprendente porque se creía que los mecanismos de degradación agresivos que pueden degradar partículas biológicas grandes como las células bacterianas y parasitarias funcionaban únicamente en fagocitos profesionales, como los macrófagos. Se creía que esos mecanismos permitían el procesamiento completo de antígenos y la presentación por fagocitos profesionales. Dado que la mayoría de las células no fagocíticas no procesan y presentan antígenos, se creía que contenían únicamente sistemas de procesamiento de antígenos moderados, que se usan principalmente para reciclar los componentes celulares.

Después de su internalización por endocitosis mediada por receptores, los vectores se incluyen en membranas endosómicas o lisosómicas y, por lo tanto, se separan del citoplasma. Estos constituye un impedimento significativo para la administración de la carga útil, especialmente porque los compartimentos endosómicos y lisosómicos se pueden hacer muy cáusticos y degradar más del 99 % de la carga útil, tal como los ácidos nucleicos de un vector. Los vectores de administración génica satisfactorios tienen mecanismos que permiten que los ácidos nucleicos entren en el citoplasma, pero los expertos en la técnica no esperarían que las minicélulas tuvieran mecanismos de este tipo.

Los virus, por ejemplo, han desarrollado procesos sofisticados para entrar en el citoplasma de las células de mamífero. Los retrovirus con envuelta, tales como el VIH-1, logran acceder al citoplasma por fusión directa con la membrana plasmática. Stein *et al.*, 1987. Los virus sin envuelta usan diversas estrategias para atravesar la membrana endosómica después de la endocitosis. Por ejemplo, los virus de la gripe inducen la fusión de las membranas vírica y endosómica, que se desencadena por el entorno ácido del endosoma. Marsh y Helenius, 1989. A pH bajo, la glucoproteína de la envuelta vírica de la gripe predominante, la hemaglutinina (HA), sufre cambios conformacionales que dan lugar a la protrusión de una punta hidrófoba en la membrana endosómica que inicia la fusión de las membranas. Bullough *et al.*, 1994. También se cree que los adenovirus escapan hacia el citosol por un mecanismo ligado a la acidificación del endosoma. El pH bajo tiene varios efectos sobre la cápside adenovírica. Por ejemplo, la proteína pentamérica de la cápside sufre cambios conformacionales que exponen regiones hidrófobas para la interacción con la membrana endosómica. Seth *et al.*, 1985. Adicionalmente, la actividad proteasa intrínseca de la cápside adenovírica también parece contribuir al escape endosómico. Greber *et al.*, 1996.

Para los vectores liposómicos, la barrera de la membrana endosómica sigue limitando la eficacia de la administración génica. Se entiende que la liberación satisfactoria de ácidos nucleicos liposómicos es consecuencia de la ruptura de la membrana del endolisosoma. Xu y Szoka, 1996; E1 Ouahabi *et al.*, 1997; Zelphati y Szoka, 1996a; Wattiaux *et al.*, 2000. Se cree que la ruptura de la membrana endolisosómica se produce a través del movimiento *flip-flop* a través de la bicapa de los lípidos, que da lugar a la desestabilización de la membrana y a la entrada de ADN desnudo en el citoplasma. Zelphati y Szoka, 1996a; 1996b; Mui *et al.*, 2000. Existen estudios que han demostrado además que la liberación citoplásmica del contenido de los liposomas implica (a) la neutralización de la carga de un agente complejante catiónico con macromoléculas aniónicas tales como lípidos aniónicos y proteoglicanos, (b) la fusión mediada por lípidos catiónicos y (c) la desestabilización de la membrana por lípidos sensibles al pH. Wrobel y Collins, 1995; Meyer *et al.*, 1997; Clark y Hersh, 1999. Estudios adicionales han demostrado que una mezcla de lípido neutral (DOPE) con lípido catiónico facilita la ruptura de la membrana y aumenta la cantidad de contenido liposómico liberado al citoplasma, porque DOPE promueve la fusión de las partículas liposómicas con las membranas endosómicas. Farhood *et al.*, 1995; Fasbender *et al.*, 1997; Hafez *et al.*, 2001. Asimismo, se han usado PEI catiónicos y dendrímeros de poliamina para facilitar la ruptura de la membrana endosómica, porque tienen una extensa capacidad tamponadora que provoca el hinchamiento y la ruptura de los endosomas. Klemm, 1998; Sonawane *et al.*, 2003. Se puede incorporar una funcionalidad adicional en los vectores liposómicos en forma de una proteína formadora de poros endosomolíticos de *Listeria monocytogenes*, la listeriolisina O (LLO). Lorenzi y Lee, 2005. La LLO puede romper la membrana endosómica, de modo que permite el escape del contenido de los endosomas al citoplasma. Lee *et al.*, 1996.

Por tanto, las enseñanzas actuales parecen indicar que se necesitan mecanismos sofisticados para permitir que parte de la carga útil del vector escape de la membrana lisosómica. La célula bacteriana muerta es una partícula no viva y no es portadora de funciones desestabilizantes de la membrana lisosómica. Los inventores descubrieron que, si las células bacterianas muertas llevan al menos de 70 a 100 copias de ADN plasmídico, entonces parte de este ADN puede escapar de la membrana endosómica sin necesidad de desestabilizar o romper la membrana endosómica. Esto sugiere que, aunque es probable que la mayoría del ADN plasmídico se degrade en la vacuola endolisosómica, fue posible vencer al sistema y permitir de este modo que parte de ADN escapara intacto hacia el citoplasma de la célula de mamífero. Adicionalmente, los inventores descubrieron que, aunque no se cree que las células de mamífero no fagocíticas posean mecanismos de procesamiento lisosómico agresivos que puedan degradar estructuras multicomponente complejas como las células bacterianas, puede que eso no sea cierto. La

visión actual específica que la degradación intracelular de estructuras complejas tales como las células bacterianas se limita a las células fagocíticas profesionales que pueden procesar antígenos por completo y presentarlos.

En un aspecto relacionado, los inventores descubrieron que una concentración significativa de fármaco bioactivo transportado por células bacterianas muertas rellenas de fármacos dirigidas a ligandos biespecíficos también escapa de la membrana endolisosómica y entra en el citoplasma de la célula de mamífero. Adicionalmente, descubrieron que las células bacterianas muertas son muy versátiles en cuanto a su capacidad para incluir una variedad de fármacos diferentes (p. ej., fármacos hidrófilos, hidrófobos y anfipáticos tales como doxorubicina, paclitaxel, cisplatino, carboplatino, 5-fluorouracilo e irinotecán) y han descubierto que todos se introducen con facilidad en células bacterianas muertas a concentraciones terapéuticamente significativas.

Los inventores descubrieron además que cuando se administraban las células bacterianas muertas rellenas de fármacos dirigidas a anticuerpos biespecíficos (por simplificar, denominadas también "terapéuticas") por vía intravenosa en ratones atímicos portadores de injertos de tumores humanos, se extravasaban de las paredes de los vasos sanguíneos circundantes a la masa tumoral y entraban en el microentorno del tumor.

El direccionamiento de los sistemas a base de partículas en el contexto del tratamiento del cáncer ha aprovechado la vasculatura permeable de los tumores (Jain, 1998) y la falta de un drenaje linfático eficaz (Maeda y Matsumura, 1989; Seymour, 1992; Yuan *et al.*, 1994), lo que da lugar a un efecto de permeabilidad y retención potenciado (EPR) (Maeda, 2001) de las partículas circulantes (direccionamiento pasivo). Los vasos tumorales tienen un diámetro irregular, un patrón de ramificación anómalo y no encajan bien en la clasificación habitual de arteriolas, capilares o vénulas. Warren, 1979; Less *et al.*, 1991, 1997; Konerding *et al.*, 1995. Los vasos tumorales son excepcionalmente permeables, algo de especial importancia funcional. Peterson y Appelgren, 1977; Gerlowski y Jain, 1986; Jain, 1987, 1997; Dvorak *et al.*, 1988. La hiperpermeabilidad de los microvasos tumorales a las moléculas grandes se ha observado en numerosos estudios. Gerlowski y Jain, 1986; Jain, 1987; Jain 1996. Sin embargo, el límite superior del tamaño para los agentes que pueden atravesar los vasos de diferentes tumores y cómo se regula esto, es poco conocido. En un estudio se midió el tamaño de poro de corte de un carcinoma de colon humano cultivado de forma subcutánea en ratones inmunodeficientes hasta un tamaño de 400-600 nm. Yuan *et al.*, 1995. Otros informaban de que algunos tumores tienen un tamaño de poro de corte de solamente 100 nm. Hobbs *et al.*, (1998). En consecuencia, resultó sorprendente descubrir que las células bacterianas muertas intactas mayores de 1.000  $\mu\text{m}$  pueden extravasarse de la pared de células endoteliales que rodea los tumores. Este descubrimiento permite el uso de células bacterianas muertas intactas para el tratamiento de tumores *in vivo*.

Adicionalmente, se sugirió con anterioridad que el microentorno tumoral anómalo se caracteriza por la hipertensión intersticial (presión hidrostática elevada fuera de los vasos sanguíneos; Less *et al.*, 1992; Jain, 2001), que limita el acceso de los tratamientos antineoplásicos. Por ejemplo, se informó de que al estudiar los tumores de mama (MDA-MD-231) implantados de forma ortotópica en ratones con IDCG tras la inyección intravenosa del agente de contraste dietilentriaminopentacetato de gadolinio, se observaba una disminución de la entrada del agente de contraste en el tumor. Dadiani *et al.*, 2004. Los autores de ese informe propusieron la teoría de que el aumento observado en la hipertensión intersticial parece indicar que la presión intersticial elevada obliga al fluido a entrar de nuevo en los vasos sanguíneos, de modo que aumenta la relación de flujo de salida y flujo de entrada. Resulta interesante el hecho de que los inventores descubrieron que las células bacterianas muertas no se ven obstaculizadas por esta hipertensión intersticial, sino que pueden conseguir efectos antitumorales muy significativos (fig. 1).

La siguiente descripción esquematiza la invención en relación con estos descubrimientos, sin limitar la invención a los modos de realización, la metodología, los protocolos o los reactivos descritos en particular. Del mismo modo, la terminología usada en el presente documento describe únicamente modos de realización particulares y no limita el alcance de la invención. A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente descripción tienen el mismo significado con que los entienden comúnmente los expertos en la técnica pertinente. Adicionalmente, las formas singulares "un", "una" y "el/la" incluyen la referencia al plural, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

### **Composiciones que comprenden células bacterianas muertas intactas**

En un aspecto, se proporciona una composición que comprende células bacterianas muertas intactas y un vehículo farmacéuticamente aceptable para las mismas. Las células bacterianas muertas pueden contener un ácido nucleico terapéutico, un fármaco, una molécula de ácido nucleico funcional o una combinación de los mismos.

#### ***Células bacterianas muertas intactas***

De acuerdo con la invención, las células bacterianas muertas son células procariotas no vivas de bacterias, cianobacterias, eubacterias y arqueobacterias, como se define en la 2ª edición del BERGEY'S MANUAL OF SYSTEMATIC BIOLOGY. Se considera que estas células están "intactas" si poseen una pared celular y/o membrana celular intacta y contienen material genético que es endógeno de la especie bacteriana.

**Ácidos nucleicos terapéuticos y productos de expresión terapéuticos**

Una molécula de ácido nucleico terapéutico codifica un producto, tal como un péptido, un polipéptido o una proteína, cuya producción se desea en una célula objetivo. Por ejemplo, el material genético de interés puede codificar una hormona, un receptor, una enzima o un (poli) péptido de valor terapéutico. Los procedimientos de este tipo pueden dar lugar a la expresión transitoria de ADN transferido no integrado, a la replicación extracromosómica y la expresión de replicones transferidos tales como episomas, o a la integración de material genético transferido en el ADN genómico de células huésped.

La expresión "moléculas de ácido nucleico" y el término "polinucleótidos" denotan formas poliméricas de nucleótidos de cualquier longitud, ya sean ribonucleótidos o desoxinucleótidos. Incluyen ADN o ARN mono-, bi- o multicatenario, ARN genómico, ADNc, híbridos de ADN-ARN o un polímero que comprende bases de purina y pirimidina u otras bases nucleotídicas naturales, modificadas química o bioquímicamente, no naturales o derivatizadas. El esqueleto de un polinucleótido puede comprender azúcares y grupos fosfato, como es típico en el ARN y el ADN, o azúcares o grupos fosfato modificados. De forma alternativa, el esqueleto del polinucleótido puede comprender un polímero de subunidades sintéticas tales como fosforamiditas y, por tanto, puede ser un fosforamidato de oligodesoxinucleósido o un oligómero mixto de fosforamidato-fosfodiéster. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos y análogos de nucleótidos metilados, uracilo, otros azúcares y grupos enlazadores tales como fluororribosa y tioato, y ramificaciones de nucleótidos. Un polinucleótido se puede modificar adicionalmente, tal como por conjugación con un componente marcador. Otros tipos de modificaciones incluyen casquetes, la sustitución de uno o más de los nucleótidos naturales por un análogo y la introducción de medios para unir el polinucleótido a proteínas, iones metálicos, componente marcadores, otros polinucleótidos o un soporte sólido.

"Polipéptido" y "proteína", usados indistintamente en el presente documento, se refieren a una forma polimérica de aminoácidos de cualquier longitud, que puede incluir aminoácidos traducidos, no traducidos, modificados químicamente, modificados bioquímicamente y derivatizados. Un polipéptido o proteína puede ser natural, recombinante o sintético/a o cualquier combinación de estos. Además, un polipéptido o proteína puede comprender un fragmento de una proteína o un péptido natural. Un polipéptido o proteína puede ser una molécula individual o puede ser un complejo multimolecular. Además, estos polipéptidos o proteínas pueden tener esqueletos peptídicos modificados. Los términos incluyen proteínas de fusión, incluidas proteínas de fusión con una secuencia de aminoácidos heteróloga, fusiones con secuencias líder heterólogas y homólogas, con o sin residuos N-terminales de metionina, proteínas con marcaje inmunológico y similares.

En general, el término "expresión" se refiere al proceso por el que una secuencia polinucleotídica se somete con éxito a la transcripción y traducción, de modo que se expresan concentraciones detectables de la secuencia de aminoácidos o la proteína. En determinados contextos del presente documento, la expresión se refiere a la producción de ARNm. En otros contextos, la expresión se refiere a la producción de proteína.

La transcripción o la traducción de una molécula de ácido nucleico terapéutico dada puede ser útil en el tratamiento del cáncer o una enfermedad contraída, tal como el sida, la neumonía, el enfisema, o en la corrección de fallos congénitos del metabolismo, tales como la fibrosis quística. La transcripción o la traducción de un ácido nucleico terapéutico también pueden efectuar una esterilización anticonceptiva, incluida la esterilización anticonceptiva de animales salvajes. También se pueden contrarrestar los trastornos inflamatorios mediados por alérgenos y mediados por agentes infecciosos por la administración, a través de la presente invención, de una molécula de ácido nucleico terapéutico que, después de su expresión en un paciente, afecta a la(s) respuesta(s) inmunitaria(s) asociada(s) con el alérgeno y el agente infeccioso, respectivamente. Una molécula de ácido nucleico terapéutico también puede tener un producto de expresión o puede haber un producto posterior a la modificación postraduccional del producto de expresión, que reduce las secuelas inmunológicas relacionadas con los trasplantes o que ayuda a facilitar el crecimiento y la regeneración tisular.

Los términos "cáncer", "neoplasia", "tumor", "neoplasia maligna" y "carcinoma", usados indistintamente en el presente documento, se refieren a células o tejidos que presentan un fenotipo de crecimiento anómalo caracterizado por una pérdida significativa del control de la proliferación celular. Los procedimientos y composiciones de la presente invención se aplican en particular a células precancerosas, malignas, premetastásicas, metastásicas y no metastásicas.

Una molécula de ácido nucleico terapéutico puede ser el homólogo sano de un gen que expresa una proteína que funciona de forma anómala o que está presente en concentraciones anómalas en un estado de enfermedad, como es el caso, por ejemplo, con el regulador de la conductancia transmembranaria en la fibrosis quística (Kerem *et al.*, 1989; Riordan *et al.*, 1989; Rommens *et al.*, 1989), con la  $\beta$ -globina en la anemia drepanocítica y con cualquiera de la  $\alpha$ -globina, la  $\beta$ -globina y la  $\gamma$ -globina en la talasemia. Por tanto, una producción en exceso de  $\alpha$ -globina con respecto a  $\beta$ -globina que caracteriza a la  $\beta$ -talasemia puede mejorar con tratamiento génico, de acuerdo con la presente invención, usando una célula bacteriana muerta intacta genomanipulada para que contenga un plásmido que incorpora una secuencia que tiene un transcrito de ARN antisentido frente a una secuencia objetivo del ARNm de la  $\alpha$ -globina.

En el tratamiento del cáncer, una molécula de ácido nucleico terapéutico adecuada para su uso de acuerdo con la presente invención podría tener una secuencia que corresponda a o derive de un gen que está asociado con la supresión de tumores, tal como el gen *p53*, el gen del retinoblastoma y el gen que codifica el factor de necrosis tumoral. Una amplia variedad de tumores sólidos (cáncer, papilomas y verrugas) se deberían poder tratar con este planteamiento, de acuerdo con la invención. Los cánceres representativos a este respecto incluyen carcinoma de colon, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de piel, cáncer de hígado, cáncer de huesos, cáncer de ovarios, cáncer de páncreas, cáncer cerebral, cáncer de la cabeza y el cuello y linfoma. Son papilomas ilustrativos el papiloma de células escamosas, el papiloma del plexo coroideo y el papiloma de la laringe. Son ejemplos de afecciones verrucosas los condilomas acuminados, las verrugas plantares, la epidermodisplasia verruciforme y los condilomas malignos.

Una molécula de ácido nucleico terapéutico para la presente invención puede comprender también un segmento de ADN que codifica una enzima que convierte un profármaco inactivo en uno o más metabolitos citotóxicos, para que, después de la introducción del profármaco *in vivo*, la célula objetivo se vea empujada al suicidio, quizás con las células vecinas también. Las aplicaciones preclínicas y clínicas de este "gen suicida", que puede ser de origen no humano o humano, las revisan Spencer (2000), Shangara *et al.* (2000) y Yazawa *et al.* (2002). Son ilustrativos de genes suicidas de origen no humano los que codifican la timidina cinasa del VHS (*tk*), la citosina desaminasa (CDA) + uracilo fosforribosiltransferasa, la xantina-guanina fosforribosiltransferasa (GPT), la nitrorreductasa (NTR), la fosforilasa de nucleósidos de purina (PNP, DeoD), el citocromo P450 (CYP4B1), la carboxipeptidasa G2 (CPG2) y la D-aminoácido oxidasa (DAAO), respectivamente. Los genes suicidas de origen humano los ejemplifican genes que codifican la carboxipeptidasa A1 (CPA), la desoxicitidina cinasa (dCK), el citocromo P450 (CYP2B1,6), LNGFR/FKBP/Fas, FKBP/Caspasas y ER/p53, respectivamente.

Se podría aplicar un tratamiento con genes suicidas al tratamiento del sida. Esta estrategia se ha probado con vectores suicidas que expresan un producto génico tóxico en cuanto las células de mamífero tratadas se infectan con el VIH-1. Estos vectores usan los elementos reguladores del VIH-1, Tat y/o Rev, para inducir la expresión de un gen tóxico tal como la toxina diftérica  $\alpha$ , la citosina desaminasa o el interferón- $\alpha$ 2 después de la infección por VIH-1. Véanse Curiel *et al.*, 1993; Dingess *et al.*, 1995; Harrison *et al.*, 1992a; Harrison *et al.*, 1992b; Ragheb *et al.*, 1999.

Típicamente, el ácido nucleico terapéutico está contenido en un plásmido en el interior de la célula bacteriana muerta. El plásmido puede contener también un segmento de ácido nucleico adicional que funciona como elemento regulador, tal como un promotor, un terminador, un potenciador o una secuencia señal, y que está enlazado de forma funcional al segmento de ácido nucleico terapéutico. Un promotor adecuado puede ser específico de tejido o incluso específico de tumor, según indique el contexto terapéutico.

. El ácido nucleico terapéutico puede codificar un gen suicida o un homólogo sano de un gen que expresa una proteína que funciona de forma anómala o está presente en concentraciones anómalas en la célula de mamífero. Además, el ácido nucleico terapéutico puede estar contenido en un plásmido que comprende varias secuencias de ácido nucleico. Además, el plásmido puede contener un elemento regulador y/o un elemento indicador.

El término "gen" se refiere a una secuencia polinucleotídica que comprende secuencias de control y codificantes necesarias para la producción de un polipéptido o precursor. El polipéptido puede estar codificado por una secuencia codificante de longitud completa o por cualquier porción de la secuencia codificante. Un gen puede constituir una secuencia codificante ininterrumpida o puede incluir uno o más intrones, enlazados por las uniones de ajuste apropiadas. Además, un gen puede contener una o más modificaciones en las regiones codificantes o no traducidas que podrían afectar a la actividad biológica o a la estructura química del producto de expresión, la velocidad de expresión o la manera de controlar la expresión. Estas modificaciones incluyen, pero sin limitación, mutaciones, inserciones, deleciones y sustituciones de uno o más nucleótidos. A este respecto, se puede hacer referencia a estos genes modificados como "variantes" del gen "original".

El término "célula huésped" se refiere a una célula que se puede usar o se ha usado como receptor para un vector recombinante u otra transferencia de polinucleótidos, e incluye la progenie de la célula original que se ha transfectado. No es necesario que la progenie de una sola célula sea completamente idéntica en morfología o en el complemento de ADN genómico o total al progenitor original debido a las mutaciones naturales, accidentales o deliberadas.

### **Elementos reguladores**

Una molécula de ácido nucleico que se va a introducir por medio del planteamiento de la presente invención también puede tener un segmento codificante deseado enlazado de forma funcional a un elemento regulador, tal como un promotor, un terminador, un potenciador y/o una secuencia señal. Un promotor adecuado puede ser específico de tejido o incluso específico de tumor, según indique el contexto terapéutico.

Un promotor es "específico de tejido" cuando se activa de forma preferente en un tejido dado y, por consiguiente, es eficaz para controlar la expresión en el tejido objetivo de una secuencia estructural enlazada de forma funcional. La categoría de promotores específicos de tejido incluye, por ejemplo: el promotor específico de hepatocitos para la

albúmina y la  $\alpha_1$ -antitripsina, respectivamente; la región de control del gen de la elastasa I, que está activa en células acinares del páncreas; la región de control del gen de la insulina, activa en células beta pancreáticas; la región de control del virus de tumores de mama de ratón, que está activa en testículos, mamas, células linfáticas y mastocitos; la región de control de la proteína básica de mielina, activa en células oligodendrocíticas del cerebro; y la región de control del gen de la hormona liberadora gonadotrópica, que está activa en células del hipotálamo. Véanse Frain *et al.* (1990), Ciliberto *et al.* (1985), Pinkert *et al.*, (1987), Kelsey *et al.* (1987), Swift *et al.* (1984), MacDonald (1987), Hanahan, (1985), Leder *et al.* (1986), Readhead *et al.* (1987) y Mason *et al.* (1986).

También existen promotores que se expresan preferentemente en las células de determinados tumores o en las propias células tumorales y que son útiles para el tratamiento de diferentes cánceres. La clase de promotores que son específicos para células cancerosas se ilustra por: el promotor de la tirosinasa, para dirigirse a melanomas; el promotor MUC1/Df3, para dirigirse a carcinoma de mama; el híbrido de potenciador *myoD*/promotor de SV40, que se dirige a la expresión del rhabdomyosarcoma (RMS); el promotor del antígeno carcinoembrionario (CEA), que es específico para células que expresan CEA tales como células cancerosas de colon, y el promotor del gen de la hexocinasa de tipo II, para dirigirse a carcinomas de pulmón no microcíticos. Véanse Hart (1996), Morton y Potter (1998), Kurane *et al.* (1998) y Katabi *et al.* (1999).

Para la transcripción génica son preferentes los promotores que dependen de la polimerasa (pol) de ARN II o pol II. Para la transcripción de ARNhc son muy preferentes los promotores de la ARN polimerasa III H1 y U6.

Se puede usar una secuencia señal para llevar a cabo la secreción de un producto de expresión o la ubicación de un producto de expresión en un compartimento celular en particular. Por tanto, una molécula de polinucleótido terapéutico que se administra por medio de células bacterianas muertas intactas puede incluir una secuencia señal en el marco de lectura correcto, de tal modo que el producto de expresión de interés lo secretan una célula que engulle o su progenie, influyendo así en las células circundantes, en consonancia con el paradigma de tratamiento escogido. Las secuencias señal ilustrativas incluyen la secuencia de secreción C-terminal de la hemolisina, descrita en la patente de EE. UU. N.º 5.143.830, la secuencia de secreción de BAR1, divulgada en la patente de EE. UU. N.º 5.037.743 y la porción de secuencia señal del polipéptido zsig32, descrita en la patente de EE. UU. N.º 6.025.197.

### 30 **Elementos indicadores**

Una molécula de ácido nucleico que se va a introducir por medio del planteamiento descrito en el presente documento puede incluir un elemento indicador. Un elemento indicador confiere a su huésped recombinante un fenotipo o característica fácilmente detectable, típicamente al codificar un polipéptido que el huésped no produce de otro modo, que se puede detectar, tras su expresión, por análisis histológico o *in situ*, tal como por técnicas de imagen *in vivo*. Por ejemplo, un elemento indicador administrado mediante una célula bacteriana muerta intacta de acuerdo con la presente invención, podría codificar una proteína que produce en la célula huésped que engulle, un cambio colorimétrico o fluorimétrico que es detectable por análisis *in situ* y que es una función cuantitativa o semicuantitativa de la activación transcripcional. Son ilustrativas de estas proteínas las esterasas, las fosfatasa, las proteasas y otras enzimas, cuya actividad genera un cromóforo o fluoróforo detectable.

Son ejemplos preferentes la  $\beta$ -galactosidasa de *E. coli*, que efectúa un cambio de color por medio de una escisión de un sustrato que genera color añil, el indolil- $\beta$ -D-galactósido y una luciferasa, que oxida un aldehído de cadena larga (luciferasa bacteriana) o un ácido carboxílico heterocíclico (luciferina), con la emisión concomitante de luz. También es útil en ese contexto un elemento indicador que codifica la proteína verde fluorescente (GFP) de la medusa, *Aequorea victoria*, como se describe por Prasher *et al.* (1995). El campo de la tecnología relacionada con la GFP se ilustra mediante dos solicitudes PCT publicadas, el documento WO 095/21191 (divulga una secuencia polinucleotídica que codifica una apoproteína de GFP de 238 aminoácidos, que contiene un cromóforo formado desde el aminoácido 65 hasta el 67) y el documento WO 095/21191 (divulga una modificación del ADNc para el apopéptido de la GFP de *A. victoria*, lo que proporciona un péptido con propiedades de fluorescencia modificadas), y mediante un informe de Heim *et al.* (1994) de una GFP mutante, caracterizada por una mejora de 4 a 6 veces de la amplitud de excitación.

Otro tipo de elemento indicador se asocia con un producto de expresión que hace a la célula bacteriana muerta recombinante resistente a una toxina. Por ejemplo, el gen *neo* protege al huésped contra niveles tóxicos del antibiótico G418, mientras que un gen que codifica la hidrofolato reductasa confiere resistencia al metotrexato y el gen de la cloranfenicol acetiltransferasa (CAT) proporciona resistencia al cloranfenicol.

Otros genes para su uso como elemento indicador incluyen los que pueden transformar una célula bacteriana muerta huésped para que exprese antígenos de superficie celular distintivos, p. ej., proteínas de la envuelta vírica tales como gp120 del VIH o gD del herpes, que se detectan fácilmente con inmunoensayos.

### 60 **Fármacos**

Los fármacos útiles en este contexto pueden ser cualquier sustancia fisiológica o farmacológicamente activa que produzca un efecto local o sistémico deseado en animales, en particular en mamíferos y seres humanos. Los

fármacos pueden ser compuestos inorgánicos u orgánicos, sin limitación, incluidos péptidos, proteínas, ácidos nucleicos y moléculas pequeñas, cualquiera de los cuales puede estar caracterizado o no caracterizado. Pueden estar en diversas formas, tal como moléculas sin cambios, complejos moleculares, sales farmacológicamente aceptables, tales como clorhidrato, bromhidrato, sulfato, laurato, palmitato, fosfato, nitrito, nitrato, borato, acetato, maleato, tartrato, oleato, salicilato y similares. Para los fármacos ácidos, se pueden usar sales de metales, aminas o cationes orgánicos, por ejemplo, amonio cuaternario. También se pueden usar derivados de fármacos, tales como bases, ésteres y amidas. Se puede usar un fármaco que es insoluble en agua en una forma que sea un derivado soluble en agua del mismo, o como un derivado básico del mismo, que en cualquier caso o al administrarlo, se convierte mediante enzimas, se hidroliza por el pH del organismo o por otros procesos metabólicos en la forma activa terapéutica original.

Los fármacos útiles incluyen agentes quimioterápicos, agentes inmunodepresores, citocinas, agentes citotóxicos, compuestos nucleolíticos, isótopos radioactivos, receptores y enzimas activadoras de profármacos, que pueden ser naturales o producidos por procedimientos sintéticos o de recombinación.

Los fármacos que se ven afectados por la resistencia multifármaco clásica tienen especial utilidad en la invención, tales como los alcaloides de la vinca (p. ej., vinblastina y vincristina), las antraciclinas (p. ej., doxorubicina y daunorrubicina), inhibidores de la transcripción del ARN (p. ej., actinomicina-D) y fármacos estabilizadores de los microtúbulos (p. ej., paclitaxel). (Ambudkar *et al.*, 1999).

En general, son fármacos preferentes los agentes quimioterápicos contra el cáncer. Los fármacos quimioterápicos contra el cáncer útiles incluyen mostazas nitrogenadas, nitrosorueas, etilenimina, alcanosulfonatos, tetrazina, compuestos de platino, análogos de pirimidina, análogos de purina, antimetabolitos, análogos de folato, antraciclinas, taxanos, alcaloides de la vinca, inhibidores de topoisomerasas y agentes hormonales. Son fármacos quimioterápicos ejemplares actinomicina-D, Alkeran, Ara-C, anastrozol, asparaginasa, BiCNU, bicalutamida, bleomicina, busulfán, capecitabina, carboplatino, carmustina, CCNU, clorambucilo, cisplatino, cladribina, CPT-11, ciclofosfamida, citarabina, citosina arabinósido, citoxano, dacarbazina, dactinomicina, daunorrubicina, dextrazoxano, docetaxel, doxorubicina, DTIC, epirubicina, etilenimina, etopósido, flouxuridina, fludarabina, fluorouracilo, flutamida, fotemustina, gemcitabina, Herceptin, hexametilamina, hidroxurea, idarrubicina, ifosfamida, irinotecán, lomustina, mecloretamina, melfalán, mercaptopurina, metotrexato, mitomicina, mitotano, mitoxantrona, oxaliplatino, paclitaxel, pamidronato, pentostatina, plicamicina, procarbazona, rituximab, esteroides, estreptozocina, STI-571, estreptozocina, tamoxifeno, temozolomida, tenipósido, tetrazina, tioguanina, tiotepa, Tomudex, topotecán, treosulfán, trimetrexato, vinblastina, vincristina, vindesina, vinorelbina, VP-16 y Xeloda.

Los fármacos quimioterápicos contra el cáncer útiles también incluyen agentes alquilantes tales como tiotepa y ciclofosfamida; alquilsulfonatos tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas tales como benzodopa, carbocouona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamelaminas, incluidas alretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilentiofosforamida y trimetilolomelamina; mostazas nitrogenadas tales como clorambucilo, clornafazina, ciclofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, Novembiehin, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, uramustina; nitroureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina y ranimustina; antibióticos tales como aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicina, cactinomicina, caliqueamicina, carabicina, carminomicina, carcinofilina, cromoincinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina, epirubicina, esorubicina, idambicina, marcelomicina, mitomicinas, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiomicina, puomicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina y zorrubicina; anti-metabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos del ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina y trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina y tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina y 5-FU; andrógenos tales como calusterona, propionato de drostanolona, epitioestano, mepitiostano y testolactona; antisuprarrenales tales como aminoglutetimida, mitotano y trilostano; regeneradores de ácido fólico tales como el ácido froilínico; aceglatona; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diazicouona; elfornitina; acetato de eliptinio; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxurea; lentinano; lonidamina; mitoguzona; mitoxantrona; monidamol; nitracrina; pentostatina; fenamet; pirarrubicina; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procarbazona; PSK®; razoxano; sizofirano; espirogermanio; ácido tenuazónico; triazicouona; 2,2',2"-triclorotrietilamina; uretano; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxoides, p. ej., paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ) y doxetaxel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer, Antony, Francia); clorambucilo; gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina; platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitomicina C; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina; navelbina; Novantrone; tenipósido; daunomicina; aminopterina; Xeloda; ibandronato; CPT-11; inhibidor de topoisomerasas RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); ácido retinoico; esperamicinas; capecitabina; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores. También se incluyen agentes antihormonales que actúan para regular o inhibir la acción de las hormonas sobre los tumores, tales como antiestrógenos, incluidos, por ejemplo, tamoxifeno, raloxifeno, 4(5)-imidazoles inhibidores de aromatasa, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, onapristona y toremifeno (Fareston); y antiandrógenos tales como flutamida,

nilutamida, bicalutamida, leuprolide y goserelina; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

5 Los fármacos útiles también incluyen citocinas. Son ejemplos de tales citocinas las linfocinas, las monocinas y las hormonas polipeptídicas tradicionales. Entre las citocinas se incluyen hormonas del crecimiento tales como la hormona del crecimiento humana, la hormona del crecimiento humana con N-metionilo y la hormona del crecimiento bovina; la hormona paratiroidea; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; prorrelaxina; hormonas glucoproteínicas tales como la hormona foliculoestimulante (FSH), la hormona estimulantes del tiroides (TSH) y la hormona luteinizante (LH); el factor de crecimiento hepático; el factor de crecimiento fibroblástico; prolactina; lactógeno placentario; el factores de necrosis tumoral  $\alpha$  y  $\beta$ ; la sustancia inhibidora de Müller; el péptido asociado a la gonadotropina de ratón; inhibina; activina; el factor de crecimiento endotelial vascular; integrina; trombopoyetina (TPO); factores de crecimiento nerviosos tales como el NGF- $\beta$ ; el factor de crecimiento de plaquetas; factores de crecimiento transformadores (TGF) tales como TGF- $\alpha$  y TGF- $\beta$ ; el factor de crecimiento insulinoide I y II; eritropoyetina (EPO); factores osteoinductivos; interferones tales como el interferón  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ; factores estimuladores de colonias (CSF) tales como el CSF de macrófagos (M-CSF); el CSF de granulocitos y macrófagos (GM-CSF); y el CSF de granulocitos (G-CSF); interleucinas (IL) tales como IL-1, IL-1a, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12, IL-15; un factor de necrosis tumoral tal como TNF- $\alpha$  o TNF- $\beta$ ; y otro factores polipeptídicos, incluidos LIF y el ligando kit (KL). Tal como se usa en el presente documento, el término citocina incluye proteínas de origen animal u obtenidas por cultivo de células recombinantes y equivalentes biológicamente activos de las citocinas de secuencia nativa.

15 Los fármacos pueden ser profármacos, activados posteriormente por una enzima activadora de profármacos que convierte un profármaco como un agente quimioterápico de peptidilo en un fármacos antineoplásicos activo. Véanse, p. ej., el documento WO 88/07378; el documento WO 81/01145; la patente de EE. UU. N.º 4.975.278. En general, el componente enzimático incluye cualquier enzima que pueda actuar sobre un profármaco de tal modo que lo convierta en su forma citotóxica, más activa.

25 Para los propósitos de la invención, una célula bacteriana muerta intacta contiene un fármaco si contiene un ácido nucleico que codifica un fármaco. Por ejemplo, un plásmido puede codificar un fármaco que se expresa dentro de células objetivo de mamífero. Esto hace posible la administración endógena de fármacos, lo que tiene ventajas con respecto a la naturaleza transitoria de la administración exógena.

### Ácidos nucleicos funcionales

35 "Ácido nucleico funcional" se refiere a una molécula de ácido nucleico que, después de su introducción en una célula huésped, interfiere de forma específica con la expresión de una proteína. En general, las moléculas de ácido nucleico funcional tienen la capacidad de reducir la expresión de una proteína al interactuar directamente con un transcrito que codifica la proteína. El ARN regulador, tal como el ARNip, el ARNhc, los ARN cortos (típicamente de menos de 400 bases de longitud), los microARN (ARNmi), las ribozimas y el ARN señuelo, y los ácidos nucleicos antisentido constituyen ácidos nucleicos funcionales ejemplares.

40 "ARN regulador" denota una categoría que incluye ARN que afectan a la expresión por interferencia de ARN, la supresión de la expresión génica u otro mecanismo. En consecuencia, además del ARNhc, el ARNip, el ARNmi y el ARNss antisentido, la categoría de ARN reguladores incluye ribozimas y ARN señuelo, entre otros.

### Objetivos de los ácidos nucleicos funcionales

45 Los ácidos nucleicos funcionales de la invención se dirigen preferentemente al gen o el transcrito de una proteína que promueve la resistencia a fármacos, inhibe la apoptosis o promueve un fenotipo neoplásico. En la técnica se ha logrado la aplicación con éxito de estrategias de ácidos nucleicos funcionales en estos contextos, pero sin los beneficios de los vectores de células bacterianas muertas. Véanse, p. ej., Sioud (2004), Caplen (2003), Wu *et al.* (2003), Nieth *et al.* (2003), Caplen y Mousses (2003), Duxbury *et al.* (2004), Yague *et al.* (2004), Duan *et al.* (2004).

50 Las proteínas que contribuyen a la resistencia a fármacos constituyen objetivos preferentes de los ácidos nucleicos funcionales. Las proteínas pueden contribuir a una resistencia a fármacos adquirida o a una resistencia a fármacos intrínseca. Cuando las células enfermas, tales como células tumorales, responden inicialmente a los fármacos pero se hacen resistentes en ciclos de tratamiento posteriores, el fenotipo resistente es adquirido. Los objetivos útiles implicados en la resistencia a fármacos adquirida incluyen transportadores de casete de unión a ATP tales como las P-glucoproteínas (P-gp, P-170, PGY1, MDR1, ABCB1, la proteína asociada a MDR, la proteína de resistencia multifármaco 1), MDR-2 y MDR-3. Son objetivos adicionales implicados en la resistencia a fármacos adquirida MRP2 (proteína asociada a resistencia multifármaco), BCR-ABL (región de concurrencia de fracturas - protooncogén de Abelson), una proteína asociada a la resistencia STI-571, la proteína relacionada con la resistencia pulmonar, la ciclooxigenasa-2, el factor nuclear kappa, XRCC1 (grupo de complemento cruzado por rayos X 1), ERCC1 (gen de complemento cruzado por escisión), GSTP1 (glutación-S-transferasa), la  $\beta$ -tubulina mutante y factores de crecimiento tales como la IL-6. Cuando las células que no se han tratado anteriormente no responden a uno o más

fármacos, el fenotipo resistente es intrínseco. Un ejemplo de una proteína que contribuye a la resistencia intrínseca es la LRP (proteína relacionada con la resistencia pulmonar).

5 Los objetivos particularmente útiles que contribuyen a la resistencia a fármacos incluyen transportadores de casete de unión a ATP tales como P-glicoproteínas, MDR-2, MDR-3, BCRP, APT11a y LRP.

10 Los objetivos útiles también incluyen proteínas que contribuyen a la resistencia a la apoptosis. Estas incluyen Bcl-2 (linfoma/leucemia de linfocitos B), Bcl-X<sub>L</sub>, A1/Bfl 1, cinasa de adhesión focal, dihidrodiol deshidrogenasa y proteína p53 mutante.

15 Otros objetivos útiles incluyen además proteínas supresoras de tumores mutantes y oncogénicas. Los ejemplos incluyen  $\beta$ -catenina, PKC- $\alpha$  (proteína cinasa C), C-RAF, K-Ras (V12), secuencia DEAD DP97 de la helicasa de ARN, DNMT1 (metiltransferasa de ADN 1), FLIP (proteína inhibidora de tipo FLICE), C-Sfc, 53BPI, proteína del grupo Polycomb EZH2 (potenciador del homólogo zeste), ErbB 1, HPV-16 E5 y E7 (papilomavirus humano early 5 y early 7), Fortilin y MCL1P (proteína de leucemia de células mieloides 1), DIP13 $\alpha$  (proteína de interacción con DDC 13a), MBD2 (dominio de unión a metil CpG), p21, KLF4 (factor de tipo Kruppel 4), tpt/TCTP (proteína tumoral de control traduccional), SPK1 y SPK2 (esfingosina cinasa), P300, PLK1 (cinasa tipo Polo 1), Trp53, Ras, ErbB1, VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular), BAG-1 (atanogén asociado a BCL2 1), MRP2, BCR-ABL, proteína asociada a la resistencia STI-571, proteína relacionada con la resistencia pulmonar, ciclooxigenasa-2, factor nuclear kappa, XRCC1, ERCC1, GSTP1,  $\beta$ -tubulina mutante y factores de crecimiento.

20 Con respecto a la infección por VIH, los objetivos incluyen VIH-Tat, VIH-Rev, VIH-Vif, VIH-Nef, VIH-Gag, VIH-Env, LTR, CD4, CXCR4 (receptor de quimiocinas) y CCR5 (receptor de quimiocinas).

25 Debido a la heterogeneidad de las células tumorales, pueden existir una serie de rutas de resistencia a fármacos o apoptosis diferentes funcionales en las células objetivo. Por lo tanto, puede ser necesario cambiar los ácidos nucleicos funcionales con el tiempo. Por ejemplo, si las muestras de biopsia revelan mutaciones nuevas que dan lugar a una resistencia a fármacos adquirida, se pueden diseñar y codificar ARNip específicos en un plásmido de expresión adecuado, que se transforma en una cepa bacteriana productora de células bacterianas muertas, que se usa para producir células bacterianas muertas recombinantes que se administran para abordar la resistencia a fármacos adquirida.

### **Moléculas de ARNip**

35 Las moléculas de ARN de interferencia pequeño (ARNip) son útiles para realizar la interferencia de ARN (ARNi), un mecanismo de silenciamiento génico postranscripcional. ARNip se refiere a moléculas de ARN bicatenario o moléculas de ARN monocatenario en horquilla desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 30 nucleótidos de longitud, que son conocidas por su capacidad para interferir de forma específica con la expresión de proteínas. Preferentemente, las moléculas de ARNip bicatenario tienen 12-28 nucleótidos de largo, más preferentemente 15-25 nucleótidos de largo, aún más preferentemente 19-23 nucleótidos de largo y lo más preferentemente 21-23 nucleótidos de largo. Por lo tanto, las moléculas de ARNip preferentes tienen 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 o 29 nucleótidos de longitud.

45 La longitud de una hebra determina la longitud de una molécula de ARNip bicatenario. Por ejemplo, un ARNip bicatenario que se describe como de 21 ribonucleótidos de largo (un 21-mero) podría comprender dos hebras opuestas de ARN que se alinean juntas para dar 19 apareamientos de bases contiguas. Los dos ribonucleótidos restantes de cada hebra formarían un "saliente". Cuando un ARNip contiene dos hebras de longitudes diferentes, la hebra más larga determina la longitud del ARNip. Por ejemplo, un ARNds que contiene una hebra que tiene 21 nucleótidos de largo y una segunda hebra que tiene 20 nucleótidos de largo, constituye un 21-mero.

50 Son deseables ARNip bicatenarios que comprenden un saliente. El saliente puede estar en el extremo 5' o el 3' de una hebra. Preferentemente, está en el extremo 3' de la hebra de ARN. La longitud de un saliente puede variar pero, preferentemente, es de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 bases y más preferentemente es de aproximadamente 2 nucleótidos de largo. Preferentemente, el ARNip de la presente invención comprenderá un saliente en 3' de aproximadamente 2 a 4 bases. Más preferentemente, el saliente en 3' es de 2 ribonucleótidos de largo. Aún más preferentemente, los 2 ribonucleótidos que comprende el saliente en 3' son de uridina (U).

60 Los ARNip se diseñan para que interactúen con una secuencia de ribonucleótidos objetivo, lo que significa que complementan una secuencia objetivo lo suficiente como para hibridar con la secuencia objetivo. En un modo de realización, la invención proporciona una molécula de ARNip que comprende una secuencia de ribonucleótidos al menos un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 % o un 90 % idéntica a una secuencia de ribonucleótidos objetivo o al complemento de una secuencia de ribonucleótidos objetivo. Preferentemente, la molécula de ARNip al menos un 90 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % idéntica a la secuencia de ribonucleótidos objetivo o al complemento de la secuencia de ribonucleótidos objetivo. Lo más preferentemente, un ARNip será un 100 % idéntica a la secuencia de nucleótidos objetivo o al complemento de la secuencia de ribonucleótidos. Sin embargo,

65

también pueden ser eficaces las moléculas de ARNip con inserciones, deleciones o mutaciones puntuales con relación a un objetivo.

5 Existen herramientas de asistencia en el diseño de ARNip disponibles para el público en general. Por ejemplo, existe una herramienta de diseño de ARNip por ordenador disponible en Internet en [www.dharmacon.com](http://www.dharmacon.com).

10 En relación con esto, los ARNhc comprenden una sola hebra de ARN que forma una estructura de tallo-horquilla, donde el tallo consiste en las hebras sentido y antisentido complementarias que comprende un ARNip bicatenario y el bucle es un enlazador de tamaño variable. Por lo general, la estructura de tallo de los ARNhc tiene desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 30 nucleótidos de largo. Preferentemente, el tallo de las moléculas de ARNhc tiene 12-28 nucleótidos de largo, más preferentemente 15-25 nucleótidos de largo, aún más preferentemente 19-23 nucleótidos de largo y lo más preferentemente 21-23 nucleótidos de largo. Por lo tanto, las moléculas de ARNhc preferentes tienen 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 o 29 nucleótidos de longitud.

### 15 **Ribozimas**

20 Las ribozimas son moléculas de ARN que tienen una actividad enzimática que puede escindir repetidamente otras moléculas de ARN de manera específica de secuencia de bases de nucleótidos. Estas moléculas de ARN enzimático se pueden dirigir prácticamente a cualquier transcrito de ARN y se logra una escisión eficaz *in vitro*.

25 Actualmente se conocen seis variedades básicas de ARN enzimáticos naturales. Todas ellas pueden catalizar la hidrólisis de enlaces fosfodiéster del ARN en trans (y por tanto pueden escindir otras moléculas de ARN) en condiciones fisiológicas. En general, los polinucleótidos enzimáticos actúan uniéndose en primer lugar a un ARN objetivo. Esta unión se produce a través de la porción de unión a objetivo de un polinucleótido enzimático que se mantiene próximo a una porción enzimática de la molécula que actúa para escindir el ARN objetivo. Por tanto, el polinucleótido enzimático reconoce en primer lugar y después se une a un ARN objetivo a través de un apareamiento de bases complementarias y, una vez unido al sitio correcto, actúa de forma enzimática para cortar el ARN objetivo. La escisión estratégica de este ARN objetivo destruirá su capacidad para dirigir la síntesis de una proteína codificada. Después de que el polinucleótido enzimático se haya unido y haya escindido su ARN objetivo, se libera de ese ARN para buscar otro objetivo y puede unirse y escindir nuevos objetivos repetidamente.

35 La naturaleza enzimática de una ribozima es ventajosa. Dado que una sola molécula de ribozima puede escindir muchas moléculas de ARN objetivo, las concentraciones reales de ribozima pueden ser relativamente bajas.

40 Las ribozimas útiles pueden comprender uno de varios motivos, incluidos el de cabeza de martillo (Rossi *et al.* (1992)), el de horquilla (Hampel y Tritz, (1989), Hampel *et al.* (1990)), el motivo del virus de la hepatitis delta (Perrotta y Been (1992), un intrón de grupo I (en la patente de EE. UU. N.º 4.987.071), ARN de RNasa P en asociación con una secuencia guía de ARN (Guerrier-Takada *et al.* (1983)) y ARN de VS de *Neurospora* (Saville y Collins (1990); Saville y Collins (1991); Collins y Olive (1993)). Estos motivos específicos no son limitantes, dado que lo importante en una ribozima de la presente invención es que tenga un sitio de unión a sustrato específico que sea complementario a una o más regiones de ARN objetivo y que tenga secuencias de nucleótidos dentro o alrededor de ese sitio de unión a sustrato que confieran una actividad de escisión de ARN a la molécula.

45 Las ribozimas pueden comprender oligonucleótidos modificados (p. ej., para mejorar la estabilidad, el direccionamiento, etc.). Las secuencias de ácidos nucleicos que codifican las ribozimas pueden estar bajo el control de un promotor constitutivo fuerte, tal como, por ejemplo, el promotor de la polimerasa de ARN II o la polimerasa de ARN III, para que las células transfectadas produzcan cantidades suficientes de la ribozima para destruir los mensajeros endógenos objetivo e inhibir la traducción.

### 50 **Oligonucleótidos antisentido**

55 Los oligonucleótidos antisentido hibridan específicamente con un ácido nucleico que codifica una proteína e interfieren con la transcripción o la traducción de la proteína. En un modo de realización, un oligonucleótido antisentido se dirige a un ADN e interfiere con su replicación y/o transcripción. En otro modo de realización, un oligonucleótido antisentido hibrida específicamente con ARN, incluidos pre-ARNm y ARNm. Estos oligonucleótidos antisentido pueden afectar, por ejemplo, a la translocación del ARN al sitio de traducción de proteínas, a la traducción de la proteína a partir del ARN, al ajuste del ARN para proporcionar una o más especies de ARNm y a la actividad catalítica en la que participa o que facilita el ARN. El efecto global de esta interferencia es la modulación, disminución o inhibición de la expresión de la proteína objetivo.

60 "Oligonucleótido" se refiere a un polinucleótido que comprende, por ejemplo, desde aproximadamente 10 nucleótidos (nt) hasta aproximadamente 1000 nt. Preferentemente, los oligonucleótidos para su uso de acuerdo con la invención tienen desde aproximadamente 10 nt hasta aproximadamente 150 nt. El oligonucleótido puede ser un oligonucleótido natural o un oligonucleótido sintético. Los oligonucleótidos pueden estar modificados.

65

"Oligonucleótido modificado" y "polinucleótido modificado" se refieren a oligonucleótidos o polinucleótidos con una o más modificaciones químicas a nivel molecular de las estructuras moleculares naturales de la totalidad o parte de las bases, restos de azúcar, enlaces fosfato entre nucleósidos, así como a las moléculas a las que se han añadido sustituciones o una combinación de modificaciones en estos sitios. Los enlaces fosfato entre nucleósidos pueden ser fosfodiéster, fosfotriéster, fosforamidato; siloxano, carbonato, carboximetiléster, acetamidato, carbamato, tioéter, fosforamidato con puente, metilfosfonato con puente, fosforotioato, metilfosfonato, fosforoditioato, fosforotioato con puente o enlaces sulfona entre nucleótidos o enlaces 3'-3', 5'-3' o 5'-5' y combinaciones de enlaces similares a estos. El enlace fosfodiéster se puede reemplazar con un enlace sustituto, tal como fosforotioato, metilamino, metilfosfonato, fosforamidato y guanidina, y también se puede sustituir la subunidad de ribosa de los polinucleótidos (p. ej., hexosa fosfodiéster; ácidos nucleicos peptídicos). Las modificaciones pueden ser internas (individuales o repetidas) o en el/los extremo(s) de la molécula de oligonucleótido y pueden incluir adiciones a la molécula de los enlaces fosfato entre nucleósidos, tales como modificaciones de desoxirribosas y fosfatos que escinden o se entrecruzan con las cadenas opuestas o con enzimas u otras proteínas asociadas. Los términos "oligonucleótidos modificados" y "polinucleótidos modificados" también incluyen oligonucleótidos o polinucleótidos que comprenden modificaciones en los restos de azúcar (p. ej., ribonucleótidos 3'-sustituidos o monómeros desoxirribonucleotídicos), cualquiera de los cuales se unen por medio de enlaces 5' a 3'.

Existen varios sitios dentro de un gen que se pueden utilizar para diseñar un oligonucleótido antisentido. Por ejemplo, un oligonucleótido antisentido se puede unir a la región que engloba el codón de iniciación de la traducción, conocido también como el codón de iniciación, del marco de lectura abierto. A este respecto, "codón de iniciación" y "codón de iniciación de la traducción" se refieren en general a la porción de ese ARNm o gen que engloba desde al menos aproximadamente 25 hasta al menos aproximadamente 50 nucleótidos contiguos en cualquier sentido (es decir, 5' o 3') desde un codón de iniciación de la traducción.

Otro sitio para que se produzca la interacción antisentido es el codón de terminación del marco de lectura abierto. Los términos "región del codón de detención" y "región del codón de terminación de la traducción" se refieren en general a una porción de ese ARNm o gen que engloba desde al menos aproximadamente 25 hasta al menos aproximadamente 50 nucleótidos contiguos en cualquier sentido desde un codón de terminación de la traducción.

El marco de lectura abierto o región codificante también puede convertirse en objetivo de forma eficaz. En general, se entiende que el marco de lectura abierto se refiere a la región entre el codón de iniciación de la traducción y el codón de terminación de la traducción. Otra región objetivo es la región no traducida en 5', que es la porción de un ARNm en sentido 5' desde el codón de iniciación de la traducción. Incluye los nucleótidos entre el sitio del casquete 5' y el codón de iniciación de la traducción de un ARNm o los nucleótidos correspondientes en el gen.

Del mismo modo, se puede usar la región no traducida en 3' como objetivo para oligonucleótidos antisentido. La región no traducida en 3' es esa porción del ARNm en sentido 3' desde el codón de terminación de la traducción y, por tanto, incluye los nucleótidos entre el codón de terminación de la traducción y el extremo 3' de un ARNm o los nucleótidos correspondientes del gen.

Un oligonucleótido antisentido también se puede dirigir a la región del casquete en 5' de un ARNm. El casquete en 5' comprende un residuo de guanosina N7-metilado unido al residuo más próximo al extremo 5' del ARNm por medio de un enlace trifosfato 5'-5'. Se considera que la región del casquete 5' incluye la propia estructura de casquete en 5' así como los primeros 50 nucleótidos adyacentes al casquete.

Aunque algunos transcritos de ARNm eucariota se traducen directamente, pueden contener una o más regiones intrónicas, que se escinden de un transcrito antes de su traducción. Las regiones exónicas restantes (y, por lo tanto, traducidas) se ajustan para formar una secuencia de ARNm continua. Los sitios de ajuste del ARNm, es decir, las uniones intrón-exón, representan posibles regiones objetivo y son particularmente útiles en situaciones en las que el ajuste anómalo está implicado en enfermedades, o cuando la sobreproducción de un producto de ajuste de ARNm en particular está implicada en enfermedades. Además, las uniones de fusión anómalas debidas a la reorganización o a deleciones también son objetivos posibles para oligonucleótidos antisentido.

Con estos objetivos diversos en mente, se deben escoger oligonucleótidos antisentido que sean lo suficientemente complementarios a los polinucleótidos objetivo. "Complementario" se refiere a la compatibilidad topológica o a la coincidencia de las superficies de dos moléculas que interaccionan. Debe haber un grado suficiente de complementariedad o apareamiento preciso, de tal modo que se produzca una unión estable y específica entre el oligonucleótido y el polinucleótido objetivo. Es importante el hecho de que no es necesario que la secuencia de un oligonucleótido antisentido se complementaria al 100 % con la de su polinucleótido objetivo para que puedan hibridar específicamente. Un oligonucleótido antisentido se puede hibridar específicamente cuando la unión del oligonucleótido antisentido al polinucleótido objetivo interfiere con la función normal de polinucleótido objetivo para provocar una pérdida de utilidad y hay un grado de complementariedad suficiente para evitar la unión inespecífica del oligonucleótido antisentido a secuencias que no son objetivo en condiciones en las que se desea una unión específica, es decir, en condiciones fisiológicas en el caso de ensayos *in vivo* o de tratamiento terapéutico, y en el caso de ensayos *in vitro*, en las condiciones en las que se realizan los ensayos.

Los oligonucleótidos antisentido pueden tener de al menos aproximadamente 8 nt a al menos aproximadamente 50 nt de longitud. En un modo de realización, los oligonucleótidos antisentido pueden tener de aproximadamente 12 a aproximadamente 30 nt de longitud.

5 Los oligonucleótidos antisentido usados de acuerdo con la presente invención se pueden preparar de forma conveniente y rutinaria por medio de la técnica bien conocida de síntesis en fase sólida. Varios proveedores comercializan los equipos necesarios para esta síntesis, incluido, por ejemplo, Applied Biosystems (Foster City, CA). Adicionalmente o de forma alternativa se puede emplear cualquier otro medio para esta síntesis conocido en la técnica. Es bien conocido el uso de técnicas similares para preparar oligonucleótidos tales como los fosforotioatos y los derivados alquilados.

### **Ácidos nucleicos que codifican ácidos nucleicos funcionales**

15 Para los propósitos de la invención, una célula bacteriana muerta intacta contiene un ácido nucleico funcional si contiene un ácido nucleico que codifica un ácido nucleico funcional. Por ejemplo, un plásmido puede codificar un ácido nucleico funcional que se expresa dentro de células objetivo de mamífero. Esto hace posible la administración endógena de ácidos nucleicos funcionales, lo que tiene ventajas con respecto a la naturaleza transitoria de la administración exógena.

20 Por tanto, las células bacterianas muertas intactas recombinantes pueden llevar ADN plasmídico que codifica una o más secuencias de ARNip con el objetivo de silenciar los genes de resistencia a fármacos o a la apoptosis. Con el uso de células bacterianas muertas que codifican varios ácidos nucleicos funcionales, es posible tratar células que expresan varios mecanismos de resistencia a fármacos. Se pueden expresar individualmente secuencias de ARNip diferentes a partir de promotores diferentes. Por ejemplo, se puede expresar un ARNip que se dirige al ARNm de Pgp a partir del promotor U6 y se puede expresar un ARNip que se dirige al ARNm de Bcl-2 a partir del promotor HI. Preferentemente, estos casetes de expresión múltiple se transportan en un solo plásmido, pero también pueden estar en plásmidos diferentes. También se pueden expresar secuencias de ARNip diferentes a partir de un único promotor, cuando el plásmido recombinante es portador de un casete de expresión que comprende varias secuencias codificantes de ARNip, que están enlazadas pro medio de secuencias polinucleotídicas no codificantes.

30 Se puede situar un único terminador de la transcripción génica corriente abajo del casete de expresión completo.

En una estrategia, un plásmido codifica las hebras sentido y antisentido de un ARNip como dos transcritos independientes que, después de su expresión en una célula objetivo, hibridan para formar dúplex de ARNip funcionales. En una segunda estrategia preferente, un plásmido codifica uno o más ARNip que se expresan cada uno como un transcrito individual que forma una estructura de tallo-bucle de ARN de horquilla corto. La estructura de horquilla se puede procesar con una enzima Dicer para obtener ARNip funcional.

### **Vehículos farmacéuticamente aceptables**

40 "Farmacéuticamente aceptable" se refiere a la compatibilidad fisiológica. Un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable no anula la actividad biológica de la composición administrada, es químicamente inerte y no es tóxico para el organismo en el que se administra.

### **Endotoxina**

45 "Endotoxina" se refiere a lipopolisacárido libre (LPS). En consecuencia, una composición que "no tiene endotoxina" carece de LPS que no está asociado con la membrana celular bacteriana. Una composición que "no tiene, esencialmente, endotoxina" carece de una cantidad o concentración suficiente de LPS para provocar toxicidad en un mamífero, tal como un ser humano. La endotoxina/LPS que no está asociada con una membrana celular bacteriana también se denomina "endotoxina libre".

Se puede eliminar la endotoxina de una composición por filtración a través de un filtro de 0,2 µm. La endotoxina libre y las micelas de endotoxina son menores de 0,2 µm y, por tanto, se filtran fácilmente de una composición que mantiene las células bacterianas muertas, que son mayores de 0,2 µm. Adicionalmente, se pueden usar anticuerpos monoclonales anti-lípido A para unir la endotoxina libre. Los anticuerpos monoclonales anti-lípido A se pueden unir a un soporte sólido tal como una columna de cromatografía de afinidad o perlas magnéticas por medio de su componente Fc, dejando libre los fragmentos Fab de unión al lípido A para unir el LPS libre.

### **Ligandos biespecíficos**

60 Las composiciones también comprenden uno o más ligandos biespecíficos. Los ligandos útiles en la invención incluyen cualquier agente que se una a un componente de superficie de una célula objetivo y a un componente de superficie de una célula bacteriana muerta. Preferentemente, el componente de superficie de una célula objetivo es un receptor, especialmente un receptor que pueda mediar la endocitosis. Los ligandos pueden comprender un componente polipeptídico y/o de hidrato de carbono. Los anticuerpos son ligandos preferentes. Por ejemplo, se puede usar de forma eficaz un anticuerpo biespecífico portador de especificidades duales para un componente de

superficie de células bacterianas muertas intactas de origen bacteriano y para un componente de superficie de células de mamífero objetivo, para dirigir las células bacterianas muertas a las células de mamífero objetivo *in vitro* e *in vivo*. La categoría de ligandos útiles también incluye receptores, enzimas, péptidos de unión, proteínas de fusión/quiméricas y moléculas pequeñas.

5 La selección de un ligando en particular se realiza con base en dos criterios principales: (i) la unión específica a uno o más dominios de la superficie de células bacterianas muertas intactas y (ii) la unión específica a uno o más dominios de la superficie de las células objetivo. Por tanto, preferentemente, los ligandos tienen un primer brazo portador de la especificidad por una estructura de superficie bacteriana de origen bacteriano y un segundo brazo portador de la especificidad por una estructura de superficie de célula de mamífero. Cada uno de los brazos primero y segundo puede ser multivalente. Preferentemente, cada brazo es monoespecífico, incluso si es multivalente.

15 Para la unión a células bacterianas muertas de origen bacteriano, es deseable que un brazo del ligando sea específico para el componente de O-polisacárido de un lipopolisacárido que se encuentra en la célula bacteriana progenitora. Otras estructuras de superficie de células bacterianas muertas que se pueden aprovechar para la unión de ligandos incluyen polipéptidos expuestos en la superficie celular e hidratos de carbono sobre membranas externas, tales como pilosidades, fimbrias, proteínas de la membrana externa y flagelos, y segmentos peptídicos expuestos en la superficie celular.

20 Para la unión a células objetivo, un brazo del ligando es específico para un componente de superficie de una célula de mamífero. Estos componentes incluyen proteínas, péptidos e hidratos de carbono de superficie celular, tanto caracterizados como no caracterizados. Los receptores de superficie celular, especialmente los que pueden activar la endocitosis mediada por receptores, son componentes de la superficie celular deseables para el direccionamiento. Estos receptores, si se sobreexpresan en la superficie de la célula objetivo, confieren una selectividad adicional para dirigirse a las células que se quieren tratar, de modo que se reduce la posibilidad de administración a células que no son objetivo.

30 A modo de ejemplo, se pueden tener como objetivo células tumorales, células metastásicas, células de la vasculatura, tales como células endoteliales y células de músculo liso, células pulmonares, células renales, células sanguíneas, células de médula ósea, células cerebrales, células hepáticas, etc., o precursores de cualquier célula seleccionados al seleccionar un ligando que se une específicamente a un motivo de receptor de superficie celular de las células deseadas. Los ejemplos de receptores de la superficie celular incluyen el antígeno carcinoembrionario (CEA), que se sobreexpresa en la mayoría de carcinomas de colon, recto, mama, pulmón, páncreas y del tubo gastrointestinal (Marshall, 2003); receptores de herregulina (HER-2, *neu* o *c-erbB-2*), que frecuentemente se sobreexpresa en cánceres de mama, ovarios, colon, pulmón, próstata y de cuello uterino (Hung *et al.*, 2000); receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), altamente expresado en una variedad de tumores sólidos, incluidos los de mama, cabeza y cuello, de pulmón no microcíticos y de próstata (Salomon *et al.*, 1995); receptor de asialoglucoproteína (Stockert, 1995); receptor de transferrina (Singh, 1999); receptor del complejo enzimático de las serpinas, que se expresa en hepatocitos (Ziady *et al.*, 1997); receptor del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR), que se sobreexpresa en células de adenocarcinoma ductal pancreático (Kleeff *et al.*, 2002); receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR), para el tratamiento génico antiangiogénico (Becker *et al.*, 2002 y Hoshida *et al.*, 2002); receptor de folato, que se sobreexpresa selectivamente en el 90 % de los carcinomas de ovario no mucinosos (Gosselin y Lee, 2002); glucocáliz de superficie celular (Batra *et al.*, 1994); receptores de hidratos de carbono (Thurnher *et al.*, 1994); y receptor de inmunoglobulinas polimérico, que es útil para la administración génica a células epiteliales respiratorias y atractivo para el tratamiento de enfermedades pulmonares tales como la fibrosis quística (Kaetzel *et al.*, 1997).

50 Los ligandos preferentes comprenden anticuerpos y/o derivados de anticuerpos. Tal como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" engloba una molécula de inmunoglobulina obtenida por la generación de una respuesta inmunógena *in vitro* o *in vivo*. El término "anticuerpo" incluye anticuerpos policlonales, monoespecíficos y monoclonales, así como derivados de anticuerpos, tales como fragmentos de anticuerpo monocatenarios (scFv). Los anticuerpos y derivados de anticuerpos útiles en la presente invención también se pueden obtener por técnicas de ADN recombinante.

55 Los anticuerpos naturales 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 exclusivas de un anticuerpo en particular y comprenden un dominio de unión a antígeno que reconoce un epítipo específico. Las regiones del dominio de unión a antígeno que participan de forma más directa en la unión de anticuerpos son las "regiones determinantes de la complementariedad" (CDR).

65 El término "anticuerpo" también engloba derivados de anticuerpos, tales como fragmentos de anticuerpo que mantienen la capacidad de unirse específicamente a antígenos. Estos 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 disulfuro), Fab' (un fragmento de anticuerpo que contiene un único dominio de unión a antígeno que comprende un Fab y una porción adicional de la cadena pesada a través de la región bisagra),

F(ab')<sub>2</sub> (dos moléculas Fab' unidas por puentes disulfuro entre cadenas en las regiones bisagra de las cadenas pesadas), un Fab biespecifico (una molécula Fab que tienen dos dominios de unión a antígeno, cada uno de los cuales se puede dirigir a un epítipo diferente) y un scFv (la región variable que determina la unión a antígeno de una sola cadena ligera y pesada de un anticuerpo enlazadas juntas por una cadena de aminoácidos).

5 Cuando los anticuerpos, incluidos los fragmentos de anticuerpo, constituyen la totalidad o parte de los ligandos, preferentemente, son de origen humano o se han modificado para que sean adecuados para su uso en humanos. Los llamados "anticuerpos humanizados" son bien conocidos en la técnica. Véase, p. ej., Osbourn *et al.*, 2003. Se han modificado por manipulación genética y/o tratamiento *in vitro* para reducir su antigenicidad en un ser humano. Se describen procedimientos para humanizar anticuerpos, p. ej., en las patentes de EE. UU. N.º 6.639.055, N.º 10 5.585.089 y N.º 5.530.101. En el caso más sencillo, los anticuerpos humanizados se forman al insertar los bucles de unión a antígeno, conocidos como regiones determinantes de la complementariedad (CDR), de un Acm de ratón en una IgG humana. Véanse Jones *et al.*, 1986; Riechmann *et al.*, 1988; y Verhoeyen *et al.*, 1988. No obstante, por lo general, la generación de anticuerpos humanizados de alta afinidad requiere la transferencia de uno o más residuos 15 adicionales de las llamadas regiones estructurales (FR) del Acm de ratón original. También se han desarrollado varias variantes de la tecnología de humanización. Véase Vaughan *et al.*, 1998.

En la invención también se pueden emplear anticuerpos humanos, en lugar de "anticuerpos humanizados". Tienen una alta afinidad por sus respectivos antígenos y se obtienen de forma rutinaria a partir de colecciones muy grandes de presentación en fagos de fragmentos variables monocatenarios (scFv) o Fab. Véanse Griffiths *et al.*, 1994; Vaughan *et al.*, 1996; Sheets *et al.*, 1998; de Haard *et al.*, 1999; y Knappik *et al.*, 2000.

Los ligandos útiles también incluyen anticuerpos monocatenarios biespecificos que, típicamente, son polipéptidos recombinantes que consisten en una porción de cadena ligera variable unida covalentemente por medio de una 25 molécula enlazadora a la porción de cadena pesada variable correspondiente. Véase las patentes de EE. UU. N.º 5.455.030, N.º 5.260.203 y N.º 4.496.778. También se pueden preparar anticuerpos biespecificos por otros procedimientos. Por ejemplo, se pueden crear heteroconjugados químicos enlazando químicamente anticuerpos intactos fragmentos de anticuerpo de diferentes especificidades. Véase Karpovsky *et al.*, 1984. Sin embargo, estos heteroconjugados son difíciles de preparar de manera reproducible y son al menos dos veces más grandes que los anticuerpos monoclonales normales. También se pueden crear anticuerpos biespecificos por intercambio de 30 disulfuros, lo que implica una escisión enzimática y la reasociación de los fragmentos de anticuerpo. Véanse Glennie *et al.*, 1987.

Dado que los fragmentos Fab y scFv son monovalentes, es frecuente que tengan una afinidad baja por las 35 estructuras objetivo. Por lo tanto, los ligandos preferentes preparados a partir de estos componentes se diseñan como conjugados diméricos, triméricos o tetraméricos para aumentar la afinidad funcional. Véanse Tomlinson y Holliger, 2000; Carter, 2001; Hudson y Souriau, 2001; y Todorovska *et al.*, 2001. Estas estructuras conjugadas se pueden crear por entrecruzamientos químicos y/o genéticos.

40 Preferentemente, los ligandos biespecificos son mono-especificos en cada extremo, es decir, específicos para un único componente sobre células bacterianas muertas en un extremo y específicos para un único componente sobre células objetivo en el otro extremo. Los ligandos pueden ser multivalentes en uno o en ambos extremos, por ejemplo, en forma de los llamados diacuerpos, triacuerpos y tetracuerpos. Véase Hudson y Souriau, 2003. Un diacuerpo es un dímero bivalente formado por la asociación no covalente de dos scFv, que proporciona dos sitios de 45 unión de Fv. Del mismo modo, un triacuerpo resulta de la formación de un trímero trivalente de tres scFv, lo que proporciona tres sitios de unión, y un tetracuerpo resulta de la formación de un tetrámero tetravalente de cuatro scFv, lo que proporciona cuatro sitios de unión.

Se ha aprobado el uso terapéutico en seres humanos de varios anticuerpos monoclonales humanizados, humanos y 50 de ratón y fragmentos de los mismos que tienen especificidad por receptores sobre células de mamífero y la lista crece con rapidez. Véase Hudson y Souriau, 2003. Un ejemplo de un anticuerpo de este tipo que se puede usar para formar un brazo de un ligando biespecifico tiene especificidad por HER2: Herceptin<sup>™</sup>; trastuzumab.

También se pueden fusionar las regiones variables de anticuerpo con una amplia variedad de dominios proteínicos. 55 La fusión a dominios de inmunoglobulina humana tales como CH3 de IgG1 añade masa y promueve la dimerización. Véase Hu *et al.*, 1996. La fusión a regiones bisagra-Fc de Ig humana puede añadir funciones efectoras. Asimismo, la fusión a dominios proteínicos heterólogos de proteínas multiméricas promueve la multimerización. Por ejemplo, se ha usado la fusión de un scFv corto a hélices anfipáticas cortas para producir minianticuerpos. Véase Pack y Pluckthun, 1992. Se pueden usar dominios de proteínas que forman heterodímeros, tales como fos/jun, para producir moléculas biespecificas (Kostelny *et al.*, 1992) y, de forma alternativa, se pueden modificar dominios de 60 homodimerización para formar heterodímeros por estrategias de manipulación tales como la de "botón en ojal" (Ridgway *et al.*, 1996). Por último, se pueden seleccionar compañeros de proteínas de fusión que proporcionan tanto la multimerización como una función adicional, p. ej., la estreptavidina. Véase Dubel *et al.*, 1995.

65

**Composiciones adicionales**

En un modo de realización, la composición comprende una célula bacteriana muerta que contiene una molécula de ácido nucleico funcional y un fármaco. La molécula de ácido nucleico funcional puede ser una que se dirija al transcrito de una proteína que contribuye a la resistencia a fármacos. Preferentemente, la molécula de ácido nucleico funcional se dirige al transcrito de una proteína que contribuye a la resistencia frente al mismo fármaco de la composición. El fármaco puede estar contenido en una célula bacteriana muerta, incluso en la misma célula bacteriana muerta que la molécula de ácido nucleico funcional, pero no es necesario que esté contenido de este modo.

**Procedimientos de administración en células competentes para la fagocitosis o la endocitosis**

En otro aspecto, la invención permite la administración al poner en contacto células bacterianas muertas de origen bacteriano con células de mamífero que son competentes para la fagocitosis o la endocitosis. Estas células de mamífero, que pueden engullir células bacterianas progenitoras, de la misma manera que los patógenos bacterianos intracelulares, engullen también las células bacterianas muertas, que liberan su carga útil al citoplasma de las células de mamífero. Este planteamiento de administración se puede efectuar sin el uso de ligandos dirigidos.

En el atrapamiento de las células bacterianas muertas por un tipo de célula dado pueden estar implicados una variedad de mecanismos y la presente invención no depende de ningún mecanismo en particular a este respecto. Por ejemplo, la fagocitosis es un proceso bien documentado en el que los macrófagos y otras células fagocíticas, tales como los neutrófilos, ingieren partículas al extender pseudópodos sobre la superficie de la partícula hasta envolver la partícula por completo. Se ha demostrado la implicación de receptores en el proceso, también descrito como fagocitosis "inespecífica". Véanse Wright y Jong (1986); Speert *et al.* (1988).

Por tanto, una forma de fagocitosis implica la interacción entre ligando de superficie y receptores de ligandos situados en las membranas de los pseudópodos (Shaw y Griffin, 1981). Se cree que esta etapa de unión, mediada por los receptores específicos, depende de las adhesinas bacterianas de superficie. Con respecto a las bacterias menos virulentas, tales como la *E. coli* no enterotoxinógena, también se puede producir la fagocitosis en ausencia de ligandos de superficie para los receptores de fagocitos. Véase Pikaar *et al.* (1995), por ejemplo. Por tanto, la presente invención engloba, pero sin limitación, el uso de células bacterianas muertas que poseen o carecen de adhesinas de superficie, de acuerdo con la naturaleza de las células bacterianas originales, y que son engullidas por fagocitos (es decir, células huésped "competentes para la fagocitosis"), de los que neutrófilos y macrófagos son los tipos principales en los mamíferos.

Otro proceso de atrapamiento es la endocitosis, por el que patógenos intracelulares ejemplificados por especies de *Salmonella*, *Escherichia*, *Shigella*, *Helicobacter*, *Pseudomonas* y *Lactobacilli* acceden a las células epiteliales de mamíferos y se replican en ellas. Dos mecanismos básicos a este respecto son la endocitosis mediada por receptores dependiente de clatrina, también conocida como "endocitosis de fosa recubierta" (Riezman, 1993), y la endocitosis independiente de clatrina (Sandvig y Deurs, 1994). Cuando una célula competente para el atrapamiento que actúa por endocitosis (es decir, una célula huésped "competente para la endocitosis") engulle células bacterianas muertas de acuerdo con la invención pueden estar implicados uno de ellos o ambos. Son células competentes para la endocitosis representativas las células epiteliales de la mama, los enterocitos del tubo gastrointestinal, las células epiteliales del estómago, las células epiteliales del pulmón y las células epiteliales de las vías urinarias y la vejiga.

Al efectuar la administración a una célula de mamífero competente para el atrapamiento sin el uso de un ligando dirigido, la naturaleza de la aplicación contemplada influirá en la elección de la fuente bacteriana para las células bacterianas muertas empleadas. Por ejemplo, las especies de *Salmonella*, *Escherichia* y *Shigella* son portadoras de adhesinas que reconocen los receptores que median la endocitosis sobre los enterocitos del tubo gastrointestinal y pueden ser adecuadas para administrar un fármaco que es eficaz para células cancerosas de colon. De forma similar, las células bacterianas muertas obtenidas a partir de *Helicobacter pylori*, portadoras de adhesinas específicas para las células epiteliales del estómago, podrían ser adecuadas para la administración dirigida a células cancerosas del estómago. La inhalación o la insuflación pueden resultar ideales para administrar células bacterianas muertas intactas obtenidas a partir de una especie de *Pseudomonas* portadora de adhesinas reconocidas por receptores sobre las células epiteliales del pulmón. Las células bacterianas muertas obtenidas a partir de bacterias *Lactobacilli*, portadoras de adhesinas específicas para las células epiteliales de las vías urinarias y la vejiga, podrían ser muy adecuadas para la administración intrauretral de un fármaco para un cáncer de las vías urinarias o de vejiga.

En un modo de realización, el procedimiento de administración es un procedimiento de administración de un ácido nucleico terapéutico que comprende poner en contacto células bacterianas muertas que contienen un plásmido que comprende una secuencia de ácidos nucleicos con células de mamífero que son competentes para la fagocitosis o la endocitosis, de tal modo que las células de mamífero engullen a las células bacterianas muertas. Preferentemente, el plásmido codifica un producto de expresión terapéutico. Después de poner las células bacterianas muertas en contacto con las células de mamífero, estas últimas células producen un producto de

expresión de la secuencia de ácido nucleico terapéutico. El procedimiento de administración de ácido nucleico terapéutico se puede realizar *in vitro* o *in vivo*.

5 En otro modo de realización, el procedimiento de administración es un procedimiento de administración de un fármaco que comprende poner en contacto células bacterianas muertas que contienen un fármaco con células de mamífero que son competentes para la fagocitosis o la endocitosis, de tal modo que las células de mamífero engullen a las células bacterianas muertas. Después, se libera el fármaco al citoplasma de las células de mamífero. De forma alternativa, las células bacterianas muertas pueden contener un plásmido que codifica un fármaco, en cuyo caso, opcionalmente, el plásmido comprende un elemento regulador y/o un elemento indicador. El procedimiento de administración de fármaco se puede realizar *in vitro* o *in vivo*.

15 En otro modo de realización, el procedimiento de administración es un procedimiento de administración de un ácido nucleico funcional que comprende poner en contacto una célula bacteriana muerta que contiene una molécula de ácido nucleico funcional o un plásmido que codifica una molécula de ácido nucleico funcional con células de mamífero que son competentes para la fagocitosis o la endocitosis, de tal modo que las células de mamífero engullen a las células bacterianas muertas. Después, el ácido nucleico funcional o el plásmido se liberan en la célula de mamífero. En caso de que la célula bacteriana muerta contenga un plásmido que codifica una molécula de ácido nucleico funcional, opcionalmente, el plásmido comprende un elemento regulador y/o un elemento indicador y, preferentemente, la célula de mamífero expresa el ácido nucleico funcional. El procedimiento de administración de ácido nucleico funcional se puede realizar *in vitro* o *in vivo*.

25 Por tanto, en un aspecto, un procedimiento de administración de ácido nucleico funcional implica el uso de células bacterianas muertas que comprenden ácido nucleico funcional sin plásmidos. A este respecto, los ácidos nucleicos funcionales se introducen directamente en células bacterianas muertas al atravesar la membrana intacta de la célula bacteriana, sin usar construcciones de expresión a base de plásmidos o la maquinaria de expresión de una célula huésped. En un modo de realización, por lo tanto, un procedimiento de administración de ácido nucleico funcional comprende (a) proporcionar una pluralidad de células bacterianas muertas intactas en un vehículo farmacéuticamente aceptable, pluralidad de la que cada célula bacteriana muerta engloba ácido nucleico funcional sin plásmidos y (b) poner en contacto las células bacterianas muertas de la pluralidad con células de mamífero objetivo, de tal forma que las células de mamífero engullen las células bacterianas muertas de la pluralidad, por lo que se libera el ácido nucleico funcional al citoplasma de las células objetivo.

35 El calificativo "sin plásmidos" indica la ausencia de una construcción, tal como un plásmido o vector vírico, para la expresión *in situ* de un ARN regulador.

#### **Direccionamiento de células bacterianas muertas a células de mamífero específicas**

40 En otro aspecto, la memoria descriptiva permite la administración dirigida mediada que emplea un ligando biespecífico. El ligando pone una célula bacteriana muerta en contacto con una célula de mamífero objetivo, de tal modo que la célula de mamífero engulle a la célula bacteriana muerta, incluida la carga útil de la célula bacteriana muerta.

45 En un modo de realización, el procedimiento de administración dirigida es un procedimiento de administración de ácido nucleico terapéutico que comprende poner en contacto ligandos biespecíficos con células bacterianas muertas que contienen una secuencia de ácido nucleico terapéutico y células de mamífero no fagocíticas. Los ligandos biespecíficos hacen que las células bacterianas muertas se unan a las células de mamífero y las células de mamífero engullen a las células bacterianas muertas. Las células de mamífero pueden producir entonces un producto de expresión del ácido nucleico terapéutico.

50 La eficacia de la administración de ácido nucleico está relacionada con el número de copias de ADN plasmídico que tienen las células bacterianas muertas. Es bien sabido que un obstáculo de la administración de ácido nucleico es el hecho de que > 99 % del ADN internalizado se degrada en el endosoma o el lisosoma, sin que alcance el citoplasma de la célula objetivo. Como partículas no vivas, se espera que las células bacterianas muertas carezcan de funciones que desestabilicen o rompan la membrana endolisosómica de las células objetivo y es improbable que posean mecanismos sofisticados para permitir que el ADN internalizado escape de la membrana endolisosómica. De acuerdo con la presente invención, por lo tanto, son preferentes las células bacterianas muertas portadoras al menos de 70 a 100 copias de ADN plasmídico. Los inventores han usado células bacterianas muertas de este tipo para la administración satisfactoria de ácido nucleico. El resultado satisfactorio sugiere que, aunque se degrade la mayoría del ADN plasmídico en la vacuola endolisosómica, es posible vencer al sistema y permitir que parte de ADN escape intacto hacia el citoplasma de la célula de mamífero.

65 En otro modo de realización, el procedimiento de administración dirigida es un procedimiento de administración de fármaco que comprende poner en contacto ligandos biespecíficos con células bacterianas muertas que contienen una molécula de fármaco y células de mamífero no fagocíticas. Los ligandos biespecíficos hacen que las células bacterianas muertas se unan a las células de mamífero y las células de mamífero engullen a las células bacterianas muertas. Después, se libera la molécula de fármaco al citoplasma de las células de mamífero.

Los inventores han descubierto que una concentración significativa del fármaco transportado por células bacterianas muertas dirigidas a ligandos biespecíficos también escapa de la membrana endolisosómica y entra en el citoplasma de la célula de mamífero. Además, las células bacterianas muertas son muy versátiles en cuanto a su capacidad para incluir una variedad de fármacos diferentes, p. ej., hidrófilos, hidrófobos y anfipáticos, tales como doxorubicina, paclitaxel, cisplatino, carboplatino, 5-fluorouracilo, irinotecán. Todos estos fármacos se incluyen con facilidad en células bacterianas muertas en concentraciones terapéuticamente significativas.

En otro modo de realización, el procedimiento de administración dirigida es un procedimiento de administración de ácido nucleico funcional que comprende poner en contacto ligandos biespecíficos con (a) células bacterianas muertas que contienen una molécula de ácido nucleico funcional o un plásmido que comprende un segmento que codifica una molécula de ácido nucleico funcional y (b) células de mamífero objetivo. Los ligandos biespecíficos hacen que las células bacterianas muertas se unan a las células de mamífero y las células de mamífero engullen a las células bacterianas muertas. Después del atrapamiento de la célula bacteriana muerta, se libera la molécula de ácido nucleico funcional al citoplasma de la célula objetivo o lo expresa la célula objetivo.

Estos procedimientos de administración dirigida se pueden realizar *in vivo* o *in vitro*, o tanto *in vivo* como *in vitro*. El contacto entre el ligando biespecífico, la célula bacteriana muerta y la célula de mamífero se puede producir de una serie de maneras diferentes. Para la administración *in vivo*, es preferible administrar una célula bacteriana muerta que ya tenga el ligando biespecífico unido a ella. Por tanto, la célula bacteriana muerta, el ligando biespecífico y la célula objetivo se ponen en contacto cuando la célula bacteriana muerta dirigida al ligando biespecífico alcanza a la célula objetivo *in vivo*. De forma alternativa, el ligando biespecífico y la célula bacteriana muerta se pueden administrar por separado *in vivo*.

El contacto entre los ligandos biespecíficos, las células bacterianas muertas y las células de mamífero también se puede producir durante una o más incubaciones *in vitro*. En un modo de realización, se incuban los tres elementos al mismo tiempo. De forma alternativa, se pueden realizar incubaciones por etapas. En un ejemplo de un planteamiento por etapas, se incuban en primer lugar las células bacterianas muertas y los ligandos biespecíficos juntos para formar células bacterianas muertas dirigidas a ligandos biespecíficos, que se incuban después con las células objetivo. En otro ejemplo, se incuban en primer lugar los ligandos biespecíficos con las células objetivo, seguido de una incubación con las células bacterianas muertas. Una combinación de una o más incubaciones *in vitro* y administraciones *in vivo* también pues poner en contacto los ligandos biespecíficos, las células bacterianas muertas y las células de mamífero objetivo.

Los inventores descubrieron que el planteamiento de administración dirigida se puede aplicar ampliamente a una variedad de células de mamífero, incluidas células que normalmente son resistentes a la adhesión específica y la endocitosis de células bacterianas muertas. Por ejemplo, los ligandos biespecíficos de anticuerpo con especificidad anti-O-polisacárido en un brazo y especificidad anti-receptor de HER2, anti-receptor de EGF o anti-receptor de andrógenos en el otro brazo unen de forma eficaz células bacterianas muertas a los receptores correspondientes en una variedad de células no fagocíticas objetivo. Estas células incluyen células cancerosas de pulmón, ovarios, cerebro, mama, próstata y piel. Además, la unión eficaz precede la endocitosis rápida de las células bacterianas muertas por cada una de las células no fagocíticas.

Las células objetivo de la invención incluyen cualquier célula en la que se quiera introducir un ácido nucleico terapéutico, un fármaco o un ácido nucleico funcional. Las células objetivo deseables se caracterizan por la expresión de un receptor de superficie celular que, después de unir un ligando, facilita la endocitosis. Son preferentes las células objetivo no fagocíticas, lo que significa que las células no son fagocitos profesionales, tales como los macrófagos, las células dendríticas y los linfocitos citolíticos naturales (NK). También son células objetivo preferentes las de mamífero.

Se pueden emplear procedimientos de administración con el fin de tratar estados de enfermedad. Los términos "tratamiento", "que trata", "tratar" y similares se refieren a la obtención de un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado. El efecto puede ser profiláctico en términos de evitar total o parcialmente una enfermedad o síntoma de la misma y/o puede ser terapéutico en términos de la estabilización o cura parcial o total de una enfermedad y/o efecto secundario atribuible a la enfermedad. "Tratamiento" cubre cualquier tratamiento de una enfermedad en un mamífero, en particular en un ser humano, e incluye: (a) evitar que aparezca la enfermedad o el síntoma en un sujeto que puede tener predisposición a la enfermedad o el síntoma pero que todavía no se ha diagnosticado que la/lo tenga; (b) inhibir el síntoma de la enfermedad, es decir, detener su desarrollo; o (c) aliviar el síntoma de la enfermedad, es decir, provocar la regresión de la enfermedad o el síntoma.

#### **Uso de ácidos nucleicos funcionales para superar la resistencia a fármacos y tratar la enfermedad**

En otro aspecto, se describe un procedimiento para superar la resistencia a fármacos y tratar una enfermedad, tal como el cáncer o el sida, en un sujeto a través del uso de ácidos nucleicos funcionales. El procedimiento comprende (a) proporcionar una célula bacteriana muerta intacta que contiene una molécula de ácido nucleico funcional o un plásmido que comprende un segmento que codifica una molécula de ácido nucleico funcional, donde la molécula de

ácido nucleico funcional se dirige al gen o al transcrito de una proteína que promueve la resistencia a fármacos, (b) poner en contacto la célula bacteriana muerta con una célula de mamífero objetivo, de tal modo que la célula de mamífero engulle a la célula bacteriana muerta y (c) administrar un fármaco a la célula de mamífero objetivo. Preferentemente, la etapa (c) se realiza después de las etapas (a) y (b), para permitir que el ácido nucleico funcional reduzca la resistencia al fármaco antes de la administración del fármaco. La administración del fármaco y la introducción del ácido nucleico funcional se pueden producir de forma consecutiva, en cualquier orden, o simultáneamente.

Los fármacos se pueden administrar por cualquier medio convencional. Por ejemplo, los fármacos se pueden administrar por vía oral, parenteral (incluidas las vías subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal y por infusión), tópica, transdérmica o por inhalación. Los expertos en las técnicas médicas pueden determinar con facilidad el modo de administración apropiado y la dosificación de cada fármaco.

Aunque la administración del fármaco se puede producir por medios convencionales, es preferente la administración por medio de células bacterianas muertas. A este respecto, los inventores han descubierto que las mismas células de mamífero se puede transfectar de nuevo de forma satisfactoria con células bacterianas muertas intactas dirigidas rellenas con diferentes cargas útiles. Por ejemplo, las células bacterianas muertas rellenas de plásmido que codifica ARNip pueden transfectar una célula de mamífero, después de lo cual las células bacterianas muertas rellenas de fármaco pueden administrar fármaco a la misma célula de mamífero. Este hallazgo fue una sorpresa e indica que los procesos intracelulares asociados con la degradación de la célula bacteriana muerta, la liberación endosómica de una carga útil y el escape de la carga útil hacia objetivos intracelulares se mantiene completamente funcional después del primer ciclo de transfección y administración de la carga útil.

El fármaco se puede incluir en una célula bacteriana muerta independiente del ácido nucleico funcional o del plásmido que codifica el ácido nucleico funcional. De forma alternativa, el fármaco se puede incluir en la misma célula bacteriana muerta que la molécula de ácido nucleico funcional o el plásmido que codifica la molécula de ácido nucleico funcional. Determinados fármacos pueden interactuar con los ácidos nucleicos e impiden la inclusión conjunta del fármaco y el ácido nucleico en la misma célula bacteriana muerta. Por ejemplo, se sabe que la doxorubicina interactúa con el ADN.

#### **Inclusión de ácido nucleico funcional en células bacterianas muertas**

El ácido nucleico funcional se puede incluir directamente en células bacterianas muertas intactas. El procedimiento sorteas las etapas necesarias anteriormente de, por ejemplo, clonar ácidos nucleicos que codifican ARN regulador en plásmidos de expresión, transformar bacterias originales productoras de minicélulas con los plásmidos y generar minicélulas recombinantes. En su lugar, el ácido nucleico funcional sin plásmidos se puede introducir directamente en células bacterianas muertas mediante la coincubación con una pluralidad de células bacterianas muertas intactas con ácido nucleico funcional en un tampón.

En algunos modos de realización, la coincubación puede implicar una agitación suave, mientras que en otros, la coincubación es estática. Una coincubación de aproximadamente una hora es suficiente, pero también pueden ser eficaces periodos más cortos, tal como de aproximadamente media hora. En un modo de realización, el tampón comprende solución salina tamponada, por ejemplo, una solución de tampón fosfato 1x. La solución salina tamponada puede estar en forma de gelatina. En otro modo de realización, la coincubación se lleva a cabo a una temperatura de aproximadamente 4 °C a aproximadamente 37 °C, de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 30 °C, de aproximadamente 25 °C o de aproximadamente 37 °C. En otros aspectos, la coincubación puede comprender aproximadamente  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$ ,  $10^{10}$ ,  $10^{11}$ ,  $10^{12}$  o  $10^{13}$  células bacterianas muertas. Se pueden optimizar parámetros específicos de temperatura, tiempo, tampón, concentración de minicélulas, etc. para una combinación de condiciones en particular.

#### **Carga de bacterias muertas con fármacos**

Preferentemente, las células bacterianas muertas contienen una cantidad suficiente de fármaco para ejercer el efecto fisiológico o farmacológico del fármaco sobre una célula objetivo. También preferentemente, los fármacos contenidos en el interior de las células bacterianas muertas son heterólogos, o exógenos, a las células bacterianas muertas, lo que significa que las células bacterianas progenitoras de las células bacterianas muertas no producen el fármaco normalmente.

Se pueden incluir fármacos tanto hidrófilos como hidrófobos en células bacterianas muertas creando un gradiente de concentración del fármaco entre un medio extracelular que contiene células bacterianas muertas y el citoplasma de la célula bacteriana muerta. Cuando el medio extracelular contiene una concentración de fármaco mayor que el citoplasma de la célula bacteriana muerta, el fármaco se desplaza de forma natural a favor del gradiente de concentración y entra en el citoplasma de la célula bacteriana muerta. Sin embargo, cuando se invierte el gradiente de concentración, el fármaco no se desplaza fuera de las células bacterianas muertas.

Para cargar células bacterianas muertas con fármacos que normalmente no son solubles en agua, se pueden disolver los fármacos inicialmente en un disolvente apropiado. Por ejemplo, el paclitaxel se puede disolver en una mezcla 1:1 de etanol y Cremophor EL (aceite de ricino polietoxilado), seguido de una dilución en PBS para obtener una solución de paclitaxel que está parcialmente diluida en medio acuoso y que tiene cantidades mínimas del disolvente orgánico para garantizar que el fármaco permanece en solución. Las células bacterianas muertas se pueden incubar en este medio final para cargar el fármaco. Por tanto, los inventores descubrieron que incluso los fármacos hidrófobos pueden difundir hacia el citoplasma de células bacterianas muertas para obtener una carga de fármaco citoplásmica alta y terapéuticamente significativa. Esto es inesperado porque la membrana de la célula bacteriana muerta se compone de una bicapa de fosfolípidos hidrófoba, que cabría esperar que evitara la difusión de moléculas hidrófobas hacia el citoplasma.

Otro procedimiento de carga de células bacterianas muertas con un fármaco implica cultivar una célula bacteriana progenitora recombinante en condiciones en las que la célula bacteriana progenitora transcribe y traduce un ácido nucleico que codifica el fármaco, de tal como que se libera el fármaco al citoplasma de la célula bacteriana progenitora. Por ejemplo, se puede clonar un agrupamiento de genes que codifican la ruta biosintética celular para un fármaco deseado y transferirlos a una cepa bacteriana progenitora que puede producir células bacterianas muertas. La transcripción y traducción genéticas del agrupamiento de genes dan lugar a la biosíntesis del fármaco dentro del citoplasma de las células bacterianas progenitoras, rellenando el citoplasma bacteriano con el fármaco. Cuando la célula bacteriana progenitora se divide y forma la progenie de células bacterianas muertas, las células bacterianas muertas también contienen el fármaco en el citoplasma. Las células bacterianas muertas pre-llenadas se pueden purificar por cualquiera de los procedimientos de purificación de células bacterianas muertas conocidos en la técnica y descritos anteriormente.

De forma similar, otro procedimiento de carga de células bacterianas muertas con un fármaco implica cultivar una célula bacteriana muerta recombinante que contiene un plásmido de expresión que codifica el fármaco en condiciones tales que el gen que codifica el fármaco se transcribe y se traduce en el interior de la célula bacteriana muerta.

#### **Pureza de las composiciones**

Las células bacterianas muertas de la invención no tienen, sustancialmente, células bacterianas progenitoras contaminantes, es decir, células bacterianas vivas. Por tanto, preferentemente, las composiciones que contienen células bacterianas muertas de la invención contienen menos de aproximadamente 1 célula bacteriana progenitora contaminante por cada  $10^7$  células bacterianas muertas, más preferentemente contienen menos de aproximadamente 1 célula bacteriana progenitora contaminante por cada  $10^8$  células bacterianas muertas, aún más preferentemente contienen menos de aproximadamente 1 célula bacteriana progenitora contaminante por cada  $10^9$  células bacterianas muertas, todavía más preferentemente contienen menos de aproximadamente 1 célula bacteriana progenitora contaminante por cada  $10^{10}$  células bacterianas muertas y lo más preferentemente contienen menos de aproximadamente 1 célula bacteriana progenitora contaminante por cada  $10^{11}$  células bacterianas muertas.

Una composición que consiste esencialmente en células bacterianas muertas y, opcionalmente, ácidos nucleicos terapéuticos, fármacos, ácidos nucleicos funcionales y ligandos biespecíficos, de la presente invención (es decir, una formulación que incluye tales células bacterianas muertas con otros constituyentes que no interfieren indebidamente con la calidad de la composición que se administra) se puede formular de manera convencional, usando uno o más vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables.

Se pueden destruir células bacterianas en cultivo usando una serie de procedimientos diferentes que incluyen (a) el tratamiento con un antibiótico al que es sensible la cepa bacteriana, (b) el tratamiento con calor que está por debajo del nivel al que se produce la coagulación de las proteínas y (c) el tratamiento con disolventes como etanol a una concentración que no da lugar a la pérdida de la integridad de la célula bacteriana y al cierre de los canales proteínicos de la membrana bacteriana. El procedimiento de destrucción de células bacterianas es bien conocido en la técnica de la fabricación de vacunas de bacterias muertas. Preferentemente, el procedimiento de destrucción de células bacterianas no implica una desnaturalización intensa de la configuración espacial de las moléculas; es decir, preferentemente, el procedimiento conserva la estructura tridimensional de las macromoléculas de las células bacterianas, tales como proteínas, polisacáridos y lípidos. Los expertos en la técnica conocen otros procedimientos que se pueden usar para obtener la preparación de bacterias muertas como se define anteriormente.

La ausencia de desnaturalización de la membrana en una preparación de bacterias muertas se puede comprobar por cualquier procedimiento bien conocido en la técnica. Por ejemplo, se puede extraer ADN plasmídico de células bacterianas muertas recombinantes y secuenciarlo para comprobar la integridad del ADN recombinante. Se puede determinar el contenido en plásmidos por PCR en tiempo real y compararlo con el contenido en plásmidos en el mismo número de células bacterianas recombinantes vivas. Si no se conservara la integridad de la membrana en el procedimiento de destrucción, entonces, cabría esperar que se produjera la pérdida de plásmidos. Adicionalmente, si el procedimiento de destrucción dañara el plásmido recombinante, entonces se observarían anomalías en la

secuencia de ADN. También se puede llevar a cabo una prueba donde se comprueba la capacidad del mismo número de células bacterianas vivas y muertas para incluir un fármaco quimioterápico.

5 Las impurezas tales como medios, tampones, desechos celulares, vesículas de membrana, ácidos nucleicos libres y endotoxina libre se pueden eliminar de una preparación de bacterias muertas por filtración, tal como por filtración a través de una filtración de flujo cruzado de 0,2 µm. Es preferente un tamaño de poro de filtro de aproximadamente 0,2 µm porque, por lo general, los contaminantes son más pequeños de 0,2 µm. Por tanto, el uso de este tamaño de poro de filtro permite retirar los contaminantes por filtración y retener las bacterias muertas intactas. La filtración puede ser una filtración en línea o una filtración de flujo cruzado. La filtración de flujo cruzado tiene la ventaja de que el filtro se obstruye menos. Asimismo, es preferente realizar etapas de lavado con intercambio de tampón, que también pueden emplear un tamaño de poro de filtro de aproximadamente 0,2 µm.

### Vías de administración y forma de las composiciones

15 Las composiciones de la invención se pueden administrar por diversas vías y en diversos sitios del cuerpo de un mamífero, para obtener el/los efecto(s) terapéutico(s) deseado(s), ya sea de forma local o sistémica. La administración se puede llevar a cabo, por ejemplo, por administración oral, por aplicación de la formulación en una cavidad corporal, por inhalación o insuflación o por administración parenteral, intramuscular, intravenosa, intraportal, intrahepática, peritoneal, subcutánea, intratumoral o intradérmica. El modo y el sitio de administración dependen de la ubicación de las células objetivo. Por ejemplo, las células de fibrosis quística se pueden convertir en objetivo eficazmente mediante la administración inhalada de las células bacterianas muertas dirigidas. De forma similar, la metástasis tumoral se puede tratar con mayor eficacia por medio de la administración intravenosa de células bacterianas muertas dirigidas. El cáncer de ovario primario se puede tratar por medio de la administración intraperitoneal de células bacterianas muertas dirigidas.

25 Las composiciones se pueden presentar en formas farmacéuticas unitarias, p. ej., en ampollas o viales, o en recipientes multidosis; con o sin conservantes añadidos. La composición 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 dispersantes. Una solución adecuada es isotónica con la sangre del receptor y se ilustra por la solución salina, la solución de Ringer y la solución de dextrosa. De forma alternativa, las composiciones pueden estar en forma de polvo liofilizado, para su reconstitución con un vehículo adecuado, p. ej., agua estéril sin pirógenos o solución salina fisiológica. Las composiciones también pueden estar en forma de una preparación de absorción lenta. Estas composiciones de acción prolongada se pueden administrar por implante (por ejemplo, por vía subcutánea o intramuscular) o por inyección intramuscular.

35 Con respecto a la administración de composiciones de la invención, los términos "individuo", "sujeto", "huésped" y "paciente", usados indistintamente en el presente documento, se refieren a cualquier sujeto mamífero para el que se desee un diagnóstico, un tratamiento o una terapia. En un modo de realización preferente, el individuo, sujeto, huésped o paciente es un ser humano. Otros sujetos pueden incluir, pero sin limitación, ganado vacuno, caballos, perros, gatos, cobayas, conejos, ratas, primates y ratones.

### Pautas de administración

45 En general, las composiciones divulgadas en el presente documento se pueden usar a dosificaciones apropiadas definidas por pruebas rutinarias, para obtener un efecto fisiológico óptimo y minimizar al mismo tiempo cualquier toxicidad posible. La pauta de dosificación se puede seleccionar de acuerdo con una variedad de factores, incluidos la edad, el peso, el sexo, el estado médico del paciente la gravedad de la afección que se va a tratar, la vía de administración y la función renal y hepática del paciente.

50 La precisión óptima para alcanzar concentraciones de célula bacteriana muerta y tratamiento dentro del intervalo que proporciona una eficacia máxima con efectos secundarios mínimos puede requerir una pauta basada en la cinética de disponibilidad de célula bacteriana muerta y tratamiento para dirigirse a los sitios y células objetivo. Se pueden tener en cuenta la distribución, el equilibrio y la eliminación de una célula bacteriana muerta o del tratamiento al determinar la concentración óptima para una pauta terapéutica. Se pueden ajustar las dosificaciones de las células bacterianas muertas y los tratamientos cuando se usan en combinación, para obtener los efectos deseados.

60 Además, se puede optimizar la administración de la dosificación de las composiciones usando un sistema de modelos farmacocinéticos/farmacodinámicos. Por ejemplo, se pueden escoger una o más pautas posológicas y se puede usar un modelo farmacocinético/farmacodinámico para determinar el perfil farmacocinético/farmacodinámico de una o más pautas posológicas. A continuación, se puede seleccionar una de las pautas posológicas para la administración que proporcione la respuesta farmacocinética/farmacodinámica deseada basándose en el perfil farmacocinético/farmacodinámico en particular. Véase, p. ej., el documento WO 00/67776.

Específicamente, las composiciones se pueden administrar al menos una vez a la semana a lo largo de varias semanas. En un modo de realización, las composiciones se administran al menos una vez a la semana durante de varias semanas a varios meses.

5 Más específicamente, las composiciones se pueden administrar al menos una vez al día durante aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 o 31 días. De forma alternativa, las composiciones se pueden administrar aproximadamente una vez al día, aproximadamente una vez cada 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 o 31 días o más.

10 De forma alternativa, las composiciones se pueden administrar aproximadamente una vez a la semana, aproximadamente una vez cada 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 semanas o más. De forma alternativa, las composiciones se pueden administrar al menos una vez a la semana durante aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 17,18, 19 o 20 semanas o más.

15 De forma alternativa, las composiciones se pueden administrar aproximadamente una vez al mes, aproximadamente una vez cada 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 17, 10, 11 o 12 meses o más.

20 Las composiciones se pueden administrar en una única dosis diaria o se puede administrar la dosis diaria total en dosis divididas de dos, tres o cuatro veces al día.

25 En el procedimiento en el que se administran células bacterianas muertas antes de un fármaco, la administración del fármaco se puede producir en cualquier momento desde varios minutos hasta varias horas después de la administración de las células bacterianas muertas. De forma alternativa, el fármaco se puede administrar en cualquier momento desde varias horas hasta varios días, posiblemente de varias semanas hasta varios meses después de las células bacterianas muertas.

30 Más específicamente, las células bacterianas muertas se pueden administrar al menos aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, o 24 horas antes que el fármaco. Además, las células bacterianas muertas se pueden administrar al menos aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 o 31 días antes de la administración del fármaco. En otro modo de realización más, las células bacterianas muertas se pueden administrar al menos aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 semanas o más antes que el fármaco. En otro modo de realización, las células bacterianas muertas se pueden administrar al menos aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 meses o más antes que el fármaco.

40 En otro modo de realización, la célula bacteriana muerta se administra después del fármaco. La administración de la célula bacteriana muerta se puede producir en cualquier momento desde varios minutos hasta varias horas después de la administración del fármaco. De forma alternativa, la célula bacteriana muerta se puede administrar en cualquier momento desde varias horas hasta varios días, posiblemente de varias semanas hasta varios meses después del fármaco.

## Ejemplos

### 45 **Ejemplo 1. Las bacterias muertas se rellenan de forma satisfactoria con el fármaco quimioterápico doxorubicina.**

50 Se cultivó una cepa de *Salmonella typhimurium* durante la noche en caldo de cultivo de soja con tripticasa (TSB). Después, se subcultivó la cepa (1:100) en 100 ml de TSB y se hizo crecer hasta la fase logarítmica temprana ( $DO_{600} = 0,406$ ). Se enumeró el recuento bacteriano plaqueando diluciones seriadas sobre placas de agar TSB y realizando un recuento de colonias después de incubarlas durante la noche. El resultado mostró que el cultivo llevaba  $\sim 5 \times 10^8$  bacterias/ml. Para destruir las células bacterianas, se incubaron 10 ml del cultivo durante 4 h con 500  $\mu\text{g/ml}$  de gentamicina y 500  $\mu\text{g/ml}$  de cloranfenicol. Se plaqueó una muestra de 100  $\mu\text{l}$  sobre una placa de agar TSB para comprobar que se habían destruido las células bacterianas.

55 Se incubaron las células bacterianas muertas ( $1 \times 10^9$ ) con 60  $\mu\text{g/ml}$  de doxorubicina durante 2 h a 37 °C en 1 ml de BSG 1x (gelatina de solución salina tamponada). Se retiró por lavado el exceso de fármaco de las células bacterianas con seis etapas de lavado repetidas donde se centrifugaron las células a 13.200 rpm durante cinco minutos seguido de la resuspensión en solución de BSG recién preparada.

60 Se extrajo la doxorubicina de las bacterias muertas después de cinco ciclos de agitación con vórtex y sonicación en presencia de HCl-alcohol isopropílico 97 mM (HCl-IPA). Después, se diluyeron las muestras en un volumen igual de agua y se repitieron los cinco ciclos. Después de la centrifugación a 13.200 rpm durante 5 min para sedimentar los desechos, se recogieron los sobrenadantes para cuantificar el fármaco por HPLC. La fase móvil comprendía formiato de amonio 100 mM + trietilamina al 0,05 % (pH, 3,5):MQ:MeCN (acetoniitrilo) en una proporción de 28:42:30. La fase estacionaria comprendía una columna LiChrospher RP 18 (MERCK) a 40 °C. La detección fue por

excitación a 480 nm y emisión a 550 nm, usando un sistema de 10AVP de Shimadzu que comprendía un automuestreador, un desgasificador de disolvente, una bomba cuaternaria, un calefactor de columna (40 °C) y un detector de fluorescencia, que funcionaba con la versión del programa informático 7.2 SPI rev B (Shimadzu Corporation).

Se interpoló el área bajo la curva en una curva de calibrado para la doxorubicina y los resultados mostraron que se habían incluido - 2 µg de doxorubicina en  $1 \times 10^9$  células bacterianas muertas.

### **Ejemplo 2. Remisión/estabilización tumoral después de la administración i.v. de células bacterianas muertas rellenas de doxorubicina dirigidas a EGFR en ratones atímicos portadores de injertos de cáncer de mama humano**

Este ejemplo demuestra que las células bacterianas muertas intactas rellenas de doxorubicina dirigidas a ligandos biespecíficos pueden provocar la remisión de injertos de células tumorales de cáncer de mama humano implantados en ratones atímicos hembra de 6 semanas de edad.

Como se describe en el ejemplo 1, se rellenaron células muertas de *S. typhimurium* con el fármaco quimioterápico doxorubicina y se purificaron de endotoxina libre por centrifugación repetida y retirada del sobrenadante por lavado.

Se construyó un anticuerpo biespecífico portador de especificidades anti-LPS y anti-EGFR humano como sigue. Se seleccionó un anticuerpo monoclonal anti-EGFR porque las células injertadas eran células de cáncer de mama humano MDA-MB-468, que se sabe que sobreexpresan el receptor de EGF en la superficie celular. Se construyó un AcBs con especificidades anti-antígeno O de *S. typhimurium* y anti-EGFR como se describe en el documento PCT/US2004/041010. Brevemente, el anticuerpo biespecífico (AcBs) se construyó enlazando un anticuerpo monoclonal (Acm) anti-antígeno O de *S. typhimurium* (IgG1; Biodesign) y un Acm dirigido contra un receptor de superficie de la célula objetivo que es de ratón anti-EGFR humano (IgG2a; Oncogene). Se entrecruzaron los dos anticuerpos por medio de sus regiones Fc usando proteína recombinante A/G purificada (Pierce Biotechnology). Brevemente, se añadió proteína A/G (concentración final de 100 µg/ml) a 0,5 ml de una solución premezclada que contenía 20 µg/ml de cada uno de los Acm anti-antígeno O de *S. typhimurium* y anti-EGFR humano y se incubó durante la noche a 4 °C. Se retiraron los anticuerpos en exceso por incubación con perlas magnéticas conjugadas con proteína G y se mezcló suavemente a temperatura ambiente durante 40 min. Después de la separación magnética de las perlas, se incubó el complejo de proteína A/G-AcBs con  $10^9$  células bacterianas muertas rellenas de dox durante 1 h a temperatura ambiente para recubrir las células con anticuerpo por medio de la unión del brazo Fab específico de antígeno O al LPS de superficie.

Los ratones usados en este ejemplo se adquirieron del Animal Resources Centre, Perth, WA, Australia, y todos los experimentos con animales se realizaron en cumplimiento de la guía de cuidado y uso de animales de laboratorio y con la autorización del comité de ética sobre animales. Los experimentos se realizaron en las instalaciones de animales pequeños acreditadas del NSW Agriculture en EnGeneIC Pty Ltd (Sidney, NSW, Australia). Se cultivaron células de adenocarcinoma de mama (MDA-MB-468, ATCC; células epiteliales mamarias humanas; no fagocíticas) en cultivo tisular hasta la confluencia total en matraces T-75 en medio RPMI 1640 complementado con suero fetal bovino al 5 % (GIBCO-BRL Life Technologies, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EE. UU.) y glutamina (Invitrogen) en una atmósfera humidificada de aire al 95 % y CO<sub>2</sub> al 5 % a 37 °C. Se inyectaron  $1 \times 10^6$  células en 50 µl de medio sin suero junto con 50 µl de matrigel con disminución de factor de crecimiento (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, EE. UU.) por vía subcutánea entre los omóplatos de cada ratón usando una aguja del calibre 23. Se midieron los tumores dos veces a la semana usando un calibre digital electrónico (Mitutoyo, Japón, precisión a 0,001) y se calculó el volumen tumoral medio usando la fórmula, longitud (mm) x anchura<sup>2</sup> (mm) x 0,5 = volumen (mm<sup>3</sup>). 16 días después de implantarlos, los tumores alcanzaron volúmenes de entre 40 mm<sup>3</sup> y 70 mm<sup>3</sup> y se aleatorizaron los ratones en cuatro grupos diferentes de cinco por grupo.

El experimento se diseñó como sigue. **El grupo 1 (control)** recibió una dosis i.v. de 100 µl de solución salina fisiológica estéril. **El grupo 2 (control)** recibió una dosis i.v. de doxorubicina libre (7 mg/kg de peso corporal del ratón). **El grupo 3 (control)** recibió  $1 \times 10^8$ /dosis de bacterias muertas rellenas de dox (*S. typhimurium*<sub>Dox</sub> muertas). **El grupo 4 (control)** recibió  $1 \times 10^8$ /dosis de bacterias muertas rellenas de dox dirigidas a EGFR (<sup>EGFR</sup> *S. typhimurium*<sub>Dox</sub> muertas). Todas las dosis se administraron por vía i.v. y las dosis se dieron en los días 21, 28 y 34.

Los resultados demostraron (figura 1) que las <sup>EGFR</sup> *S. typhimurium*<sub>Dox</sub> muertas eran muy eficaces para lograr la remisión/estabilización tumoral en comparación con los tres controles.

### **Ejemplo 3. Efectos antitumorales después de la administración i.v. de células bacterianas muertas rellenas de proteína del huso cinesina-ARNip o rellenas de paclitaxel dirigidas a EGFR en ratones atímicos portadores de injertos de cáncer de colon humano**

Este ejemplo valora si las células bacterianas muertas intactas rellenas de paclitaxel o ARNip pueden inhibir el crecimiento de los tumores de células cancerosas de colon humano *in vivo*.

Usando los procedimientos descritos en el ejemplo 1, se rellenaron células muertas de *S. typhimurium* con el fármaco quimioterápico paclitaxel y se purificaron de endotoxina libre por centrifugación repetida y retirada del sobrenadante por lavado.

5 Por separado, se incluyó ARNip contra la proteína del huso cinesina (KSP) en la cepa de *S. typhimurium* muerta. La KSP, también denominada cinesina-5 o Eg5, es una proteína motora de microtúbulos que es esencial para la formación de husos bipolares y la correcta separación de las cromátidas hermanas durante la mitosis (Enos y Morris, 1990; Blangy *et al.*, 1995; Dagenbach y Endow, 2004). La inhibición de KSP provoca la formación de husos mitóticos monopolares, activa el punto de control del ensamblaje del huso y detiene las células en la mitosis, lo que da lugar a la consiguiente muerte celular (Blangy *et al.*, 1995; Mayer *et al.*, 1999; Kapoor *et al.*, 2000; Tao *et al.*, 2005). Se sintetizaron las secuencias oligonucleotídicas bicatenarias de ARNip-KSP (hebra sentido: 5'-AAC TGG ATC GTA AGA AGG CAG-3') y se incluyeron en la cepa de *S. typhimurium* muerta incubando  $1 \times 10^{10}$  bacterias con  $1 \mu\text{m}$  de ARNip-KSP. La coincubación se llevó a cabo en solución de tampón fosfato 1x (PBS) (Gibco) durante 12 horas a  $37^\circ\text{C}$  con agitación suave. Después de la inclusión, se sedimentaron las bacterias y se lavaron dos veces con PBS 1x por centrifugación durante 10 minutos a  $16.200 \times \text{g}$ . Se lavaron las células bacterianas dos veces en PBS 1x para eliminar el exceso de ARNip-KSP no incluido.

Se construyó un anticuerpo biespecífico portador de especificidades anti-LPS y anti-EGFR humano como se describe en el ejemplo 2.

20 Los ratones usados en este ejemplo se adquirieron del Animal Resources Centre, Perth, WA, Australia, y todos los experimentos con animales se realizaron en cumplimiento de la guía de cuidado y uso de animales de laboratorio y con la autorización del comité de ética sobre animales. Los experimentos se realizaron en las instalaciones de animales pequeños acreditadas del NSW Agriculture en EnGeneIC Pty Ltd (Sidney, NSW, Australia). Se cultivaron células de cáncer de colon en cultivo tisular hasta la confluencia total en matraces T-75 en medio RPMI 1640 complementado con suero fetal bovino al 5% (GIBCO-BRL Life Technologies, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EE. UU.) y glutamina (Invitrogen) en una atmósfera humidificada de aire al 95% y  $\text{CO}_2$  al 5% a  $37^\circ\text{C}$ . Se inyectaron  $1 \times 10^6$  células en 50  $\mu\text{l}$  de medio sin suero junto con 50  $\mu\text{l}$  de matrigel con disminución de factor de crecimiento (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, EE. UU.) por vía subcutánea entre los omóplatos en ratones Balb/c *nu/nu* ( $n = 8$  ratones por grupo) usando una aguja del calibre 23. Se midieron los tumores dos veces a la semana usando un calibre digital electrónico (Mitutoyo, Japón, precisión a 0,001) y se calculó el volumen tumoral medio usando la fórmula, longitud (mm)  $\times$  anchura  $^2$  (mm)  $\times$  0,5 = volumen ( $\text{mm}^3$ ). 16 días después de implantarlos, los tumores alcanzaron volúmenes de  $\sim 200 \text{mm}^3$  y se aleatorizaron los ratones en cuatro grupos diferentes de ocho por grupo.

35 El experimento se diseñó como sigue. **El grupo 1 (control)** recibió una dosis i.v. de 100  $\mu\text{l}$  de solución salina fisiológica estéril. **El grupo 2 (control)**, bacterias *S. typhimurium* muertas dirigidas a EGFR sin carga útil terapéutica (G2; <sup>EGFR</sup> *S. typhimurium*). **El grupo 3 (expt)**, bacterias *S. typhimurium* muertas dirigidas a EGFR rellenas con fármaco quimioterápico paclitaxel (G3; <sup>EGFR</sup> *S. typhimurium*<sub>paclitaxel</sub>). **El grupo 4 (expt)**, bacterias *S. typhimurium* muertas dirigidas a EGFR rellenas de ARNip frente a la proteína del huso cinesina (G4; <sup>EGFR</sup> *S. typhimurium*<sub>ARNip-KSP</sub>). Los tratamientos se administraron tres veces a la semana.

45 Los resultados demuestran (figura 2) que ambos tratamientos, es decir, <sup>EGFR</sup> *S. typhimurium*<sub>paclitaxel</sub> muertas y <sup>EGFR</sup> *S. typhimurium*<sub>ARNip-KSP</sub> mostraban efectos antitumorales muy significativos en comparación con los dos controles. Por tanto, los datos demuestran que las células bacterianas muertas intactas rellenas de paclitaxel o ARNip inhiben el crecimiento de los tumores de células cancerosas de colon humano *in vivo*.

#### **Ejemplo 4. Uso del tratamiento dual que comprende ARNhc mediado por bacterias muertas dirigidas a receptor seguido de la administración de fármaco mediada por bacterias muertas dirigidas a receptor**

50 Para demostrar que las bacterias muertas dirigidas a receptor pueden invertir la resistencia a fármacos en células cancerosas *in vivo*, se llevó a cabo el siguiente estudio en ratones Balb/c *nu/nu*. Como células de injerto, se usó la línea celular de cáncer de colon humano Caco-2, que es muy resistente a los fármacos quimioterápicos de primera línea para el cáncer de colon, tales como el irinotecán y el 5-fluorouracilo (5-FU).

55 Usando los procedimientos descritos en el ejemplo 1, se rellenaron bacterias *S. typhimurium* muertas con fármaco quimioterápico irinotecán o 5-FU. Se retiró por lavado el exceso de irinotecán o 5-FU unido de forma inespecífica a la superficie exterior de las bacterias muertas por centrifugación de las células bacterianas a 13.200 rpm durante 10 min y se resuspendieron las células lavadas en PBS 1x recién preparado. Se repitió esta etapa de lavado.

60 Las células de *S. typhimurium* muertas rellenas de irinotecán o 5-FU se dirigieron al EGFR por medio de la unión de un anticuerpo biespecífico anti-O-polisacárido/anti-EGFR a la superficie de las células bacterianas, como se describe en los ejemplos anteriores. Se seleccionó un anticuerpo monoclonal anti-EGFR porque se sabe que las células injertadas, Caco-2, sobreexpresan el EGFR sobre la superficie celular (Nyati *et al.*, 2004). Las bacterias muertas rellenas de fármaco dirigidas a EGFR se denominaron <sup>EGFR</sup> *S. typhimurium*<sub>5-FU</sub> y <sup>EGFR</sup> *S. typhimurium*<sub>Iriño</sub>.

65

Se generó una cepa de *S. typhimurium* recombinante portadora de un plásmido que codifica la secuencia anti-ARNhc de MDR1 como sigue. La secuencia de ARNhc de MDR-1 usada en este estudio (5'-TCGAAAGAAACCAACTGTGAGTACTGTACACTGACAGTTGGTTTCTT TTTT-3') la describieron Wu *et al.*, 2003. Se sintetizó la secuencia de ARNhc y se subclonó en el plásmido IMG-800 (Imgenex Corp., San Diego, CA, EE. UU.), de tal modo que la secuencia se podía expresar a partir del promotor plasmídico U6. El plásmido contiene el origen de replicación del pUC, que permite un gran número de copias en células bacterianas. Se secuenció el plásmido recombinante para garantizar que la secuencia del ARNhc era correcta y que estaba en fase para la expresión a partir del promotor U6. Se transformó el plásmido recombinante en *S. typhimurium* y la cepa resultante se denominó *S. typhimurium*<sub>ARNhc-MDR1</sub>. La *S. typhimurium*<sub>ARNhc-MDR1</sub> dirigida a EGFR se construyó uniendo el anticuerpo biespecífico anti-O-polisacárido/anti-EGFR a la superficie de las bacterias recombinantes para generar *S. typhimurium*<sub>ARNhc-MDR1-EGFR</sub>.

Los diversos grupos de ratones (cinco ratones por grupo) recibieron los siguientes tratamientos: grupo 1 (control) solución salina estéril; grupo 2 (control) *S. typhimurium*<sub>ARNhc-MDR1-EGFR</sub>; grupo 3 (control) bacterias muertas rellenas de 5-FU dirigidas a EGFR (*S. typhimurium*<sub>5-FU-EGFR</sub>); grupo 4 (expt) *S. typhimurium*<sub>ARNhc-MDR1-EGFR</sub> seguido de *S. typhimurium*<sub>5-FU-EGFR</sub>; grupo 5 (control) bacterias muertas rellenas de irino dirigidas a EGFR (*S. typhimurium*<sub>irino-EGFR</sub>); grupo 6 (expt) *S. typhimurium*<sub>ARNhc-MDR1-EGFR</sub> seguido de *S. typhimurium*<sub>irino-EGFR</sub>; los grupos 2 a 6 recibieron 1 x 10<sup>9</sup> células bacterianas y todos los tratamientos fueron por vía i.v.

Los resultados demostraron (figura 3) que, como se esperaba, las células Caco-2 seguían siendo resistentes después de los tratamientos con *S. typhimurium*<sub>irino-EGFR</sub>, *S. typhimurium*<sub>5-FU-EGFR</sub> y *S. typhimurium*<sub>ARNhc-MDR1-EGFR</sub>. Las células que recibieron tratamiento dual, es decir, *S. typhimurium*<sub>ARNhc-MDR1-EGFR</sub> seguido de *S. typhimurium*<sub>irino-EGFR</sub> (ratones del G6) o *S. typhimurium*<sub>5-FU-EGFR</sub> (ratones del G4), mostraron una inversión muy significativa de la resistencia a fármacos y remisión tumoral. Los datos demuestran que un protocolo de tratamiento dual, p. ej., administración de ARNhc mediada por bacterias dirigidas a receptor seguido de administración de fármaco quimioterápico mediada por bacterias muertas dirigidas a receptor, es muy eficaz para invertir la resistencia a fármacos en células de mamífero no fagocíticas.

## Referencias

Todas las publicaciones y patentes mencionadas en esta memoria descriptiva se incorporan en el presente documento por referencia. No obstante, la referencia a una publicación o patente no constituye la admisión en cuanto a la técnica anterior.

Akporiaye, E.T. y Hersh, E. Clinical aspects of intratumoral gene therapy. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 1: 443-453 (1999).

Ambudkar, *et al.*, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39: 361 (1999).

Batra RK, Wang-Johanning F, Wagner E, Garver RI Jr, Curiel DT. Receptor-mediated gene delivery employing lectin-binding specificity. *Gene Ther.* 1994 Jul;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 Flk1. *Cancer Biol Ther.* Sept-oct 2002; 1(5):548-53.

Bergey's Manual of Systematic Biology, 2<sup>a</sup> ed., Springer-Verlag, 2001.

Blangy, A., Lane, H.A., d'Herin, P., Harper, M., Kress, M., Nigg, E.A. Phosphorylation by p34cdc2 regulates spindle association of human Eg5, a kinesin-related motor essential for bipolar spindle formation in vivo. *Cell* 83: 1159-1169 (1995).

Boucher, R.C., Pickles, R.J., Rideout, J.L., Pendergast, W. y Yerxa, B.R. Targeted gene transfer using G protein coupled receptors. *Solicitud de patente de EE. UU.* US 2003/004123 A1. 2 de ene, 2003.

Bullough, P.A., Hughson, F.M., Skehel, J.J., Wiley, D.C. Structure of influenza haemagglutinin at the pH of membrane fusion. *Nature* 371: 37-43 (1994).

Caplen, *Expert Opin. Biol. Ther.*, 3(4): 575-86 (2003).

Caplen y Mousses, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1002: 56-62 (2003).

Carter, P. Improving the efficacy of antibody-based cancer therapies. *Nat Rev Cancer.* 2001 Nov;1 (2):118-29.

Ciliberto *et al.*, "Cell-specific expression of a transfected human alpha 1-antitrypsin gene", *Cell.* 41: 531 (1985).

- Chen, L.M., Kaniga, K., Galan, J.E. Salmonella spp. are cytotoxic for cultured macrophages. *Mol. Microbiol.* 21: 1101-1115 (1996).
- 5 Chen, D., Murphy, B., Sung, R., Bromberg, J.S. Adaptive and innate immune responses to gene transfer vectors: role of cytokines and chemokines in vector function. *Gene Ther.* 10: 991-998 (2003).
- Clark, P.R. y Hersh, E.M. Cationic lipid-mediated gene transfer: current concepts. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 1: 158-176 (1999).
- 10 Collins y Olive, 32 *Biochem.* 2795-99 (1993).
- Curiel *et al.*, "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).
- 15 Dagenbach, E.M. y Endow, S.A. A new kinesin tree. *J. Cell Sci.* 117: 3-7 (2004).
- Dang, L.H., Bettegowda, C., Huso, D.L., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. Combination bacteriolytic therapy for the treatment of experimental tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98: 15155-15160 (2001).
- 20 de Haard, H. J. *et al.* 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).
- de Jong, G., Telenius, A., Vanderbyl, S., Meitz, A., Drayer, J. Efficient in-vitro transfer of a 60-Mb mammalian artificial chromosome into murine and hamster cells using cationic lipids and dendrimers. *Chromosome Res.* 9: 475-485 (2001).
- 25 Dinges *et al.*, "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).
- 30 Dow, S.W., Fradkin, L.G., Liggitt, D.H., Willson, A.P., Heath, T.D., Potter, T.A. Lipid-DNA complexes induce potent activation of innate immune responses and antitumor activity when administered intravenously. *J. Immunol.* 163: 1552-1561 (1999).
- 35 Dramsi, S. y Cossart, P. Intracellular pathogens and the actin cytoskeleton. *Annu. Rev. Cell. E. Biol.* 14: 137-166 (1998).
- Duan *et al.*, *Mol. Cancer Therapeutics*, 3(7): 833-38 (2004).
- 40 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.
- Dunham, S.P. The application of nucleic acid vaccines in veterinary medicine, *Res. Vet. Sci.* 73: 9-16 (2002).
- 45 Duxbury *et al.*, *J. Am. Coll. Surg.*, 198: 953-59 (2004).
- El Ouahabi, A., Thiry, M., Fuks, R., Ruyschaert, J. y Vandenbranden, M. The role of the endosome destabilizing activity in the gene transfer process mediated by cationic lipids. *FEBS Lett.* 414: 187-192 (1997).
- 50 Enos, A. P. y Morris, N.R. Mutation of a gene that encodes a kinesin-like protein blocks nuclear division in *A. nidulans*. *Cell* 60: 1019-1027 (1990).
- Essani, K. y Dales, S. Biogenesis of vaccinia: evidence for more than 100 polypeptides in the virion. *Virology* 95: 385-394 (1979).
- 55 Farhood, H., Serbina, N. y Huang, L. The role of dioleoyl phosphatidylethanolamine in cationic liposome mediated gene transfer. *Biochim. Biophys. Acta* 1235: 289-295 (1995).
- Fasbender, A., Marshall, J., Moninger, T.O., Grunst, T., Cheng, S. y Welsh, M.J. Effect of co-lipids in enhancing cationic lipid-mediated gene transfer in vitro and in vivo. *Gene Ther.* 4: 716-725 (1997).
- 60 Felgner, P.L., Ringold, G.M. Cationic liposome-mediated transfection. *Nature* 337: 387-388 (1989).
- Ferrari, S., Griesenbach, U., Geddes, D.M., Alton, E. Immunological hurdles to lung gene therapy. *Clin Exp Immunol*, 132: 1-8 (2003).
- 65

- Finlay, B.B. y Cossart, P. Exploitation of mammalian host cell functions by bacterial pathogens. *Science* 276: 718-25 (1997).
- 5 Fox, M.E., Lemmon, M.J., Mauchline, M.L, *et al.* Anaerobic bacteria as a delivery system for cancer gene therapy: in vitro activation of 5-fluorocytosine by genetically engineered clostridia. *Gene Therapy*. 3: 173-178 (1996).
- 10 Frain *et al.*, "Binding of a liver-specific factor to the human albumin gene promoter and enhancer", *Mol. Cell Biol.* 10: 991 (1990).
- 15 Galan, J.E. Molecular and cellular bases of Salmonella entry into host cells. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 209: 43-60 (1996).
- Gao, H., Shi, W. y Freund, L.B. Mechanics of receptor-mediated endocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102: 9469-9474 (2005).
- 20 Gerlowski, L. y Jain, R. Microvascular permeability of normal and neoplastic tissues. *Microvasc. Res.* 31: 288-305 (1986).
- 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.
- 25 Gosselin MA, Lee RJ.,Folate receptor-targeted liposomes as vectors for therapeutic agents. *Biotechnol Annu Rev.* 2002;8:103-31.
- s protease on virus entry into cells, *EMBO J.* 15: 1766-1777 (1996).
- 30 Green, N.K. y Seymour, L.W. Adenoviral vectors: systemic delivery and tumor targeting. *Cancer Gene Ther.* 9: 1036-1042 (2002).
- Griffiths, A. D. *et al.* Isolation of high affinity human antibodies directly from large synthetic repertoires. *EMBO J.* 13, 3245-3260 (1994).
- 35 Guerrier-Takada *et al.*, *Cell*, 35: 849 (1983).
- Hafez, I.M., Maurer, N. y Cullis, P.R. On the mechanism whereby cationic lipids promote intracellular delivery of polynucleic acids. *Gene Ther.* 8: 1188-1196 (2001).
- 40 Hampel y Tritz, *Biochem.*, 28: 4929 (1989).
- Hampel *et al.*, *Nucleic Acids Research*: 299 (1990)
- 45 Hanahan, Heritable formation of pancreatic beta-cell tumours in transgenic mice expressing recombinant insulin/simian virus 40 oncogenes. 9-15 de mayo de 1985; 315(6015): 115-122.
- Harrison *et al.*, "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).
- 50 Harrison *et al.*, "Inhibition of HIV production in cells containing an integrated, HIV- regulated diphtheria toxin A chain gene", *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 8: 39 (1992b).
- Hart, "Tissue specific promoters in targeting systematically delivered gene therapy", *Semin. Oncol.* 23: 154 (1996).
- 55 Heim *et al.*, "Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein", *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 91: 12501 (1994).
- 60 Hobbs, S.K., Monsky, W.L., Yuan, F., Roberts, W.G., Griffith, L., Torchilin, V.P. y Jain, R.K. Regulation of transport pathways in tumor vessels: Role of tumor type and microenvironment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 4607-4612 (1998).
- 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.* Ago 2002; 25(2):111-21.
- 65

- Hu, S, L Shively, A Raubitschek, M Sherman, LE Williams, JY Wong, JE Shively y 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.
- 5 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.* Ene 2003; 9 (1):129-34.
- 10 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.
- Jain, R.K. Transport of molecules across tumor vasculature. *Cancer Metastasis Rev.* 6: 559-593 (1987).
- 15 Jain, R.K. Delivery of molecular medicine to solid tumors. *Science* 271: 1079-1080 (1996).
- Jain, R.K. The Eugene M. Landis Award Lecture 1996: Delivery of molecular and cellular medicine to solid tumors. *Microcirculation* 4: 1-23 (1997).
- 20 Jain, R.K. Delivery of molecular and cellular medicine to solid tumors. *J. Control. Release* 53, 49-67 (1998).
- Jain, R.K. Delivery of molecular and cellular medicine to solid tumors. *adv. Drug Deliv. Rev.* 46: 149-68 (2001).
- 25 James, M.B., Giorgio, T.D. Nuclear-associated plasmid, but not cell-associated plasmid, is correlated with transgene expression in cultured mammalian cells. *Mol. Ther.* 1: 339-346 (2000).
- 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).
- 30 Kaetzel CS, Blanch VJ, Hempen PM, Phillips KM, Piskurich JF, Youngman KR The polymeric immunoglobulin receptor: structure and synthesis. *Biochem Soc Trans* 25:475-480 (1997).
- 35 Kanke, M., Sniecinski, I., y DeLuca, P.P. Interaction of microspheres with blood constituents. I. Uptake of polystyrene spheres by monocytes and granulocytes and effect on immune responsiveness of lymphocytes. *J. Parenter. Sci. Technol.* 37: 210-217 (1983).
- Kapoor, T.M., Mayer, T.U., Coughlin, M.L., Mitchison, T.J. Probing spindle assembly mechanisms with monastrol, a small molecule inhibitor of the mitotic kinesin, Eg5. *J. Cell Biol.* 150: 975-988 (2000).
- 40 Karpovsky B, Titus JA, Stephany DA, Segal DM. Production of target-specific effector cells using hetero-cross-linked aggregates containing anti-target cell and anti-Fc gamma receptor antibodies. *J Exp Med.* 160:1686-701 (1984).
- 45 Katabi *et al.*, "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).
- Kelsey *et al.*, "Species- and tissue-specific expression of human alpha 1-antitrypsin in transgenic mice", *Genes and Devel.* 1: 161 (1987).
- 50 Kerem *et al.*, "Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis", *Science* 245: 1073 (1989).
- King, I., *et al.* Tumor-targeted Salmonella expressing cytosine deaminase as an anticancer agent. *Hum. Gene Ther.* 13: 1225 -1233 (2002).
- 55 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.* jun 2002; 9(6):522-32.
- 60 Klemm, A.R. Effects of polyethylenimine on endocytosis and lysosome stability. *Biochem. Pharmacol.* 56: 41-46 (1998).
- Knappik, A. *et al.* Fully synthetic human combinatorial antibody libraries (HuCAL) based on modular consensus frameworks and CDRs randomized with trinucleotides. *J. Mol. Biol.* 296, 57-86 (2000).
- 65 Konerding, M.A., Miodonski, A.J., Lametschwandtner, A. Microvascular corrosion casting in the study of tumor vascularity: a review. *Scanning Microsc.* 9: 1233-1243 (1995).

- Kostelny SA, Cole MS, Tso JY. Formation of a bispecific antibody by the use of leucine zippers. *J Immunol.* 1 de mar 1992; 148(5):1:547-53.
- 5 Kreiss, P., Cameron, B., Rangara, R., Mailhe, P., Aguerre-Charriol, O., Airiau, M., Scherman, D., Crouzet, J., Pitard, B. Plasmid DNA size does not affect the physicochemical properties of lipoplexes but modulates gene transfer efficiency. *Nucleic Acids Res.* 27: 3792-3798 (1999).
- 10 Kurane *et al.*, "Targeted Gene Transfer for Adenocarcinoma Using a Combination of Tumor specific Antibody and Tissue-specific Promoter", *Jpn. J. Cancer Res.* 89: 1212 (1998).
- Leder *et al.*, "Consequences of widespread deregulation of the c-myc gene in transgenic mice: multiple neoplasms and normal development", *Cell* 45: 485 (1986).
- 15 Lee, K-D, OhY, Portnoy, D, *et al.* Delivery of macromolecules into cytosol using liposomes containing hemolysin from *Listeria monocytogenes*. *J. Biol. Chem.* 271: 7249-7252 (1996).
- Lee, C. H., Wu, C. L. y Shiao, A. L. (2005a). Endostatin gene therapy delivered by *Salmonella choleraesuis* in murine tumor models. *J. Gene Med.* 6: 1382-1393.
- 20 Lee, C. H., Wu, C. L. y Shiao, A. L. (2005b). Systemic administration of attenuated *Salmonella choleraesuis* carrying thrombospondin-1 gene leads to tumor-specific transgene expression, delayed tumor growth and prolonged survival in the murine melanoma model. *Cancer Gene Ther.* 12: 175-184.
- 25 Lemmon, M.J., van Zijl, P., Fox, M.E., *et al.* Anaerobic bacteria as a gene delivery system that is controlled by the tumor microenvironment. *Gene Therapy.* 8: 791-796 (1997).
- Less, J.R., Skalak, T.C., Sevick, E.M., Jain, R.K. Microvascular architecture in a mammary carcinoma: branching patterns and vessel dimensions. *Cancer Res.* 51: 265-273 (1991).
- 30 Less, J.R., Posner, M.C., Boucher, Y., Borochovit, D., Wolmark, N., Jain, R.K. Interstitial hypertension in human breast and colorectal tumors. *Cancer Res.* 52: 6371-6374 (1992).
- 35 Less, J.R., Posner, M.C., Skalak, T.C., Wolmark, N., Jain, R.K. Geometric resistance and microvascular network architecture of human colorectal carcinoma. *Microcirculation* 4: 25-33 (1997).
- Li, X., Fu, G-F., Fan, Y-R., *et al.* Bifidobacterium *adolescentis* as a delivery system of endostatin for cancer gene therapy: selective inhibitor of angiogenesis and hypoxic tumor growth. *Cancer Gene Ther.* 10: 105-111 (2003).
- 40 Liu, Q., Muruve, D.A. Molecular basis of the inflammatory response to adenovirus vectors. *Gene Ther.* 10: 935-940 (2003).
- 45 Liu, S-C., Minton, N.P., Giaccia, A.J., Brown, J.M. Anticancer efficacy of systemically delivered anaerobic bacteria as gene therapy vectors targeting tumor hypoxia/necrosis. *Gene Ther.* 9: 291-296 (2002).
- Lorenzi, G.L., Lee, K.D. Enhanced plasmid DNA delivery using anionic LPDII by listeriolysin O incorporation. *J. Gene Med.* 7: 1077-1085 (2005).
- 50 Low KB, Ippensohn M, Le T, *et al.* Lipid A mutant *Salmonella* with suppressed virulence and TNF $\alpha$  induction retain tumor-targeting in vivo. *Nat Biotechnol.* 1999;17: 37-41.
- Luo X, Li Z, Lin S, *et al.* Antitumor effect of VNP20009, an attenuated *Salmonella*, in murine tumor models. *Oncol Res.* 2001;12:501-508.
- 55 MacDonald *et al.*, "Expression of the pancreatic elastase I gene in transgenic mice", *Hepatology* 7: 425 (1987).
- Maeda, H. The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: the key role of tumor-selective macromolecular drug targeting. *Adv. Enzyme Regul.* 41: 189-207 (2001).
- 60 Maeda, H. y Matsumura, Y. Tumorotropic and lymphotropic principles of macromolecular drugs. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 6, 193-210 (1989).
- Marsh, M. y A.M. Helenius, A.M. Virus entry into animal cells. *Adv. Virus Res.* 36: 107-151 (1989).
- 65 Marshall. Carcinoembryonic antigen-based vaccines. *Semin. Oncol.* jun 2003; 30 (3 supl. 8): 30-36.

- Mason *et al.*, "The hypogonadal mouse: reproductive functions restored by gene therapy", *Science* 234: 1372 (1986).
- 5 Mayer, T.U., Kapoor, T.M., Haggarty, S.J., King, R.W., Schreiber, S.L., Mitchison, T.J. Small molecule inhibitor of mitotic spindle bipolarity identified in a phenotype-based screen. *Science* 286: 971-974 (1999).
- Menard, R., Dehio, C. y Sansonetti, P.J. Bacterial entry into epithelial cells: the paradigm of *Shigella*. *Trends Microbiol.* 4: 220-226 (1996).
- 10 Meyer, K., Uyechi, L.S. y Szoka, F.C.J. Manipulating the intracellular trafficking of nucleic acids, in: K.L. Brigham (Ed.), *Gene Therapy for Diseases of the Lung*, Marcel Dekker Inc, Nueva York, págs. 135-180 (1997).
- Minton, N.P., Mauchline, M.L., Lemmon, M.J., *et al.* Chemotherapeutic tumour targeting using clostridial spores. *FEMS Microbiol. Rev.* 17: 357-364 (1995).
- 15 Monack, D.M., Raupach, B., Hromockyj, A.E., Falkow, S. *Salmonella typhimurium* invasion induces apoptosis in infected macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 9833-9838 (1996).
- 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).
- 20 Mui, B., Ahkong, Q., Chow, L. & Hope, M. Membrane perturbation and the mechanism of lipid-mediated transfer of DNA into cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1467: 281-292 (2000).
- 25 Nakai, T., Kanamori, T., Sando, S. y Aoyama, Y. Remarkably size-regulated cell invasion by artificial viruses. Saccharide-dependent self aggregation of glycoviruses and its consequences in glycoviral gene delivery. *J. Am. Chem. Soc.* 125: 8465-8475 (2003).
- Nettelbeck, D.M., Miller, D.W., Jerome, V., Zuzarte, M., Watkins, S.J., Hawkins, R.E., Muller, R. y Kontermann, R.E. Targeting of adenovirus to endothelial cells by a bispecific single-chain diabody directed against the adenovirus fiber knob domain and human endoglin (CD 105). *Mol. Ther.* 3: 882-891 (2001).
- 30 Nieth *et al.*, *FEBS Letters*, 545: 144-50 (2003).
- 35 Nuyts S, Mellaert IV, Theys J, Landuyt W, Lambin P, Anne J. Clostridium spores for tumor-specific drug delivery. *Anti-Cancer Drugs*. 2002a;13:115-125.
- Nuyts S, Van Mellaert L, Theys J, *et al.* Radio-responsive *recA* promoter significantly increases TNF $\alpha$  production in recombinant clostridia after 2 Gy irradiation. *Gene Therapy*. 2002b;8:1197-1201.
- 40 Ogris, M. y Wagner, E. Targeting tumors with non-viral gene delivery systems. *Drug Discovery Today* 7: 479-485 (2002).
- 45 Osaki, F., Kanamori, T., Sando, S., Sera, T. y Aoyama, Y. A quantum dot conjugated sugar ball and its cellular uptake. On the size effects of endocytosis in the subviral region. *J. Am. Chem. Soc.* 126: 6520-6521 (2004).
- 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).
- 50 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.
- Paglia P, Terrazzini N, Schulze K, Guzman CA, Colombo MP. In vivo correction of genetic defects of monocyte/macrophages using attenuated *Salmonella* as oral vectors for targeted gene delivery. *Gene Ther* 2000; 7: 1725-1730.
- 55 Pawelek JM, Low KB, Bermudes D. Tumor-targeted *Salmonella* as a novel anticancer vector. *Cancer Res*. 1997;57:4537-4544.
- 60 Pawelek J, Low KB, Bermudes D. Bacteria as tumourtargeting vectors. *Lancet Oncol Rev*. 2003;4:548-556.
- Perrotta y Been, *Biochem.*, 31: 16 (1992).
- Peterson HI, Appelgren L: Tumour vessel permeability and transcapillary exchange of large molecules of different size. *Bibl Anat* 1977, 15:262-265.
- 65

- Pikaar *et al.*, J. Infect. Dis. 172: 481 (1995).
- Pinkert *et al.*, "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).
- 5 Platt J, Sodi S, Kelley M, *et al.* Antitumour effects of genetically engineered Salmonella in combination with radiation. Eur J Cancer. 2000; 36:2397-2402.
- Prasher *et al.*, "Using GFP to see the light", Trends in Genetics 11: 320 (1995).
- 10 Ragheb *et al.*, "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).
- 15 Readhead *et al.*, "Myelin deficient mice: expression of myelin basic protein and generation of mice with varying levels of myelin", Cell 48: 703 (1987).
- Ridgway JB, Presta LG, Carter P. 'Knobs-into-holes' engineering of antibody CH3 domains for heavy chain heterodimerization. Protein Eng. 1996 Jul;9(7):617-21.
- 20 Riechmann, L., Clark, M., Waldmann, H. y Winter, G. Reshaping human antibodies for therapy. Nature 332, 323-327 (1988).
- Riezman, Trends in Cell Biology, 3: 330 (1993).
- 25 Riordan *et al.*, "Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA", Science 245: 1066 (1989).
- Rommens *et al.*, "Identification of the cystic fibrosis gene: Chromosome walking and jumping", Science 245: 1059 (1989).
- 30 Rosenberg, S.A., Spiess, P.M., y Kleiner, D.E. Antitumour effects in mice of the intravenous injection of attenuated Salmonella typhimurium. J. Immunother. 25: 218-225 (2002).
- 35 Rossi *et al.*, Aids Research and Human Retroviruses, 8: 183 (1992)
- Ruiz, F.E., Clancy, J.P., Perricone, M.A., Bebok, Z., Hong, J.S., Cheng, S.H., Meeker, D.P., Young, K.R., Schoumacher, R.A., Weatherly, M.R., Wing, L., Morris, J.E., Sindel, L., Rosenberg, M., van Ginkel, F.W., McGhee, J.R., Kelly, D., Lyrene, R.K., Sorscher, E.J. A clinical inflammatory syndrome attributable to aerosolized lipid-DNA administration in cystic fibrosis. Hum. Gene Ther. 12: 751-761 (2001).
- 40 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.
- 45 Sandvig y Deurs, Trends in Cell Biology, 4: 275 (1994).
- Saville y Collins, Cell, 61: 685-96 (1990).
- Saville y Collins, PNAS (USA), 88: 8826-30 (1991).
- 50 Scheule, R.K. The role of CpG motifs in immunostimulation and gene therapy. Adv. Drug Deliv. Rev. 44: 119-134 (2000).
- Seth, P., Willingham, M.C. y Pastan, I. Binding of adenovirus and its external proteins to Triton X-114. Dependence on pH. J. Biol. Chem. 260: 14431-14434 (1985).
- 55 Seymour, L.W. Passive tumor targeting of soluble macromolecules and drug conjugates. Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 9, 135-187 (1992).
- 60 Shangara *et al.*, "Suicide genes: past, present and future perspectives", Immunology Today 21: 48 (2000).
- Shaw y Griffen, Nature 289: 409 (1981).
- 65 Sheets, M. D. *et al.* 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).

- Simoes, S., Pedro, P., Duzgunes, N. y Pedrosa de Lima, M. Cationic liposomes as gene transfer vectors: barriers to successful application in gene therapy. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1: 147-157 (1999).
- 5 Singh, Transferrin as a targeting ligand for liposomes and anticancer drugs. *Curr Pharm Des.* jun 1999; 5(6):443-51.
- Siould, "Therapeutic siRNAs", *Trends in Pharmacological Sciences*, 25(1): 22-28 (2004).
- 10 Soghomonyan, S.A., Doubrovin, M., Pike, J., Luo, X., Ittensohn, M., Runyan, J.D., Balatoni, J., Finn, R., Tjuvajev, J.G., Blasberg, R. y Bermudes, D. Positron emission tomography (PET) imaging of tumor-localized Salmonella expressing HSV1-TK. *Cancer Gene Ther.* 12: 101-108 (2005).
- 15 Sonawane, N., Szoka, F.J. y Verkman, A. Chloride accumulation and swelling in endosomes enhances DNA transfer by polyamine-DNA polyplexes. *J. Biol. Chem.* 278: 44826-44831 (2003).
- Speert *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 82: 872 (1988).
- 20 Spencer, "Developments in suicide genes for preclinical and clinical applications", *Current Opinion in Molecular Therapeutics* 2: 433-440 (2000).
- Stein, B.S., Gowda, S.D., Lifson, J.D., Penhallow, R.C., Bensch, K.G., Engleman, E.G. pH-independent HIV entry into CD4-positive T cells via virus envelope fusion to the plasma membrane, *Cell* 49: 659-668 (1987)
- 25 Stockert. The asialoglycoprotein receptor: relationships between structure, function, and expression. *Physiol Rev.* Jul 1995; 75(3):591-609.
- Swanson, J. A. y Watts, C. Macropinocytosis. *Trends Cell Biol.* 5: 424-428 (1995).
- 30 Swift *et al.*, "Tissue-specific expression of the rat pancreatic elastase I gene in transgenic mice", *Cell* 38: 639 (1984).
- Tabata, Y., e Ikada, Y. Macrophage phagocytosis of biodegradable microspheres composed of 1-lactic acid/glycolic acid homo- and copolymers. *J. Biomed. Mater. Res.* 22: 837-858 (1988).
- 35 Tachibana, R., Harashima, H., Ide, N., Ukitsu, S., Ohta, Y., Suzuki, N., Kikuchi, H., Shinohara, Y., Kiwada, H. Quantitative analysis of correlation between number of nuclear plasmids and gene expression activity after transfection with cationic liposomes. *Pharm. Res.* 19: 377-381 (2002).
- 40 Tao, W., South, V.J., Zhang, Y., Davide, J.P., Farrell, L., Kohl, N.E., Sepp-Lorenzino, L., Lobell, R.B. Induction of apoptosis by an inhibitor of the mitotic kinesin KSP requires both activation of the spindle assembly checkpoint and mitotic slippage. *Cancer Cell* 8: 49-59 (2005).
- 45 Theys, J., Landuyt, W., Nuyts, S., *et al.* Specific targeting of cytosine deaminase to solid tumors by engineered *Clostridium acetobutylicum*. *Cancer Gene Ther.* 8: 294-297 (2001).
- 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.* Ago 1994; 4(4):429-35.
- 50 Todorovska, A. *et al.* Design and application of diabodies, triabodies and tetrabodies for cancer targeting. *J. Immunol. Methods* 248, 47-66 (2001).
- 55 Tomlinson, I. y Holliger, P. Methods for generating multivalent and bispecific antibody fragments. *Methods Enzymol.* 326, 461-479 (2000).
- Vaughan, T. J. *et al.* Human antibodies with subnanomolar affinities isolated from a large non-immunized phage display library. *Nature Biotechnol.* 14, 309-314 (1996).
- 60 Vaughan, T. J., Osbourn, J. K. y Tempest, P. R. Human antibodies by design. *Nature Biotechnol.* 16, 535-539 (1998).
- Verhoeyen, M., Milstein, C. y Winter, G. Reshaping human antibodies: grafting an antilysozyme activity. *Science* 239, 1534-1536 (1988).
- 65 Wakimoto, H., Johnson; P.R., Knipe, D.M., Chiocca, E.A. (2003) Effects of innate immunity on herpes simplex virus and its ability to kill tumor cells. *Gene Ther.* 10: 983-990 (2003).

- Warren, B.A. The vascular morphology of tumors. *Tumor Blood Circulation: Angiogenesis, Vascular Morphology and Blood Flow of Experimental and Human Tumors*. Edited by Peterson H-I. Boca Raton, CRC Press, Inc., págs. 1-48 (1979).
- 5 Wattiaux, R., Laurent, N., Wattiaux-De Coninck, S. y Jadot, M. Endosomes, lysosomes: their implication in gene transfer. *Adv Drug Deliv. Rev.* 41: 201-208 (2000).
- Weiss, S. y Chakraborty, T. Transfer of eukaryotic expression plasmids to mammalian host cells by bacterial carriers. *Curr. Opin. Biotechnol.* 12: 467-472 (2001).
- 10 Whitmore, M., Li, S., Huang, L. LPD lipopolyplex initiates a potent cytokine response and inhibits tumor growth. *Gene Ther.* 6: 1867-1875 (1999).
- 15 Whitmore, M.M., Li, S., Falo, L., Jr, Huang, L. Systemic administration of LPD prepared with CpG oligonucleotides inhibits the growth of established pulmonary metastases by stimulating innate and acquired antitumor immune responses. *Cancer Immunol. Immunother.* 50: 503-514 (2001).
- 20 Wickham, T.J., Segal, D.M., Roelvink, P.W., Carrion, M.E., Lizonova, A., Lee, G.M. y Kovetski, I. Targeted adenovirus gene transfer to endothelial and smooth muscle cells by using biaspecific antibodies. *J. Virol.* 70: 6831-6838 (1996).
- Wright y Jong, *Experimental Medi.*, 163: 1245 (1986).
- 25 Wrobel, I. y Collins, D. Fusion of cationic liposomes with mammalian cells occurs after endocytosis. *Biochim. Biophys. Acta* 1235: 296-304 (1995).
- Wu, *et al.*, *Cancer Res.*, 63: 1515-19 (2003).
- 30 Xu, Y. y Szoka, F.C. Mechanism of DNA release from cationic liposome/DNA complexes used in cell transfection. *Biochem. J.* 35: 5616-5623 (1996).
- Yague *et al.*, *Gene Therapy*, 11: 1170-74 (2004).
- 35 Yamada, H., Matsumoto, S., Matsumoto, T., Yamada, T. y Yamashita, U. Murine IL-2 secreting recombinant Bacillus Calmette-Guerin augments macrophage mediated cytotoxicity against murine bladder cancer MBT-2. *J. Urol.* 164: 526-531 (2000).
- 40 Yazawa K, Fujimori M, Amano J, Kano Y, Taniguchi S. Bifidobacterium longum as a delivery system for cancer gene therapy: Selective localization and growth in hypoxic tumors. *Cancer Gene Ther.* 2000; 7:269-274.
- Yazawa K, Fujimori M, Nakamura T, *et al.* Bifidobacterium longum as a delivery system for cancer gene therapy of chemically induced rat mammary tumors. *Breast Cancer Res Treat.* 2001; 66:165-170.
- 45 Yazawa *et al.*, "Current progress in suicide gene therapy for cancer", *World J. Surg.* 26: 783 (2002).
- Yew, N.S., Wang, K.X., Przybylska, M., Bagley, R.G., Stedman, M., Marshall, J., Scheule, R.K., Cheng, S.H. Contribution of plasmid DNA to inflammation in the lung after administration of cationic lipid:pDNA complexes. *Hum. Gene Ther.* 10: 223-234 (1999).
- 50 Yu, Y.A., Shabahang, S., Timiryasova, T.M., *et al.* Visualization of tumors and metastases in live animals with bacteria and vaccinia virus encoding light-emitting proteins. *Nat. Biotechnol.* 22: 313-320 (2004).
- 55 Yuan, F., Leunig, M., Huang, S.K., Berk, D.A., Papahadjopoulos, D. y Jain, R.K. Microvascular permeability and interstitial penetration of sterically stabilized (stealth) liposomes in a human tumor xenograft. *Cancer Res.* 54: 352-3356 (1994).
- 60 Yuan, F., Dellian, M., Fukumura, D., Leunig, M., Berk, D., Torchillin, V. y Jain, R. Vascular permeability in a human tumor xenograft: molecular size dependence and cutoff size. *Cancer Res.* 55: 3752-3756 (1995).
- Yuhua, L., Kunyuan, G., Hui, C., *et al.* Oral cytokine gene therapy against murine tumor using attenuated Salmonella typhimurium. *Int. J. Cancer* 94: 438-443 (2001).
- 65 Zelphati, O. y Szoka, F. Intracellular distribution and mechanism of delivery of oligonucleotides mediated by cationic lipids. *Pharm. Res.* 13: 1367-1372 (1996).

Zelphati, O. y Szoka, F. Mechanism of oligonucleotide release from cationic liposomes. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93: 11493-11498 (1996).

5 Zhao, Y., Zhu, L., Lee, S., Li, L., Chang, E., Soong, N.W., Douer, D. y Anderson, W.F. Identification of the block in targeted retroviral-mediated gene transfer. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 4005-4010 (1999).

Zhou, X., Mantis, N., Zhang, X.R., Potoka, D.A., Watkins, S.C. y Ford, H.R. Salmonella typhimurium induces apoptosis in human monocyte-derived macrophages. Microbiol. Immunol. 44: 987-995 (2000).

10 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. Ago 1997; 273(2 Pt 1):G545-52.

Documento WO 81/01145

15 Documento WO 88/07378

Documento WO 95/21191

20 Documento WO 00/67776

Patente de EE. UU. N.º 4.975.278

Patente de EE. UU. N.º 4.987.071

## REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende (I) una pluralidad de células bacterianas muertas intactas, pluralidad de la que cada célula bacteriana muerta posee una pared celular y/o membrana celular intacta, que contienen material genético que es endógeno de la especie bacteriana, y que engloba (i) un ácido nucleico terapéutico que codifica un producto, tal como un péptido, un polipéptido o una proteína, cuya producción se desea en una célula objetivo, (ii) un fármaco que es una sustancia fisiológica o farmacéuticamente activa que produce un efecto local o sistémico deseado en mamíferos y seres humanos o (iii) una molécula de ácido nucleico funcional, que tras la introducción en una célula huésped, interfiere específicamente con la expresión de una proteína, (II) un vehículo farmacéuticamente aceptable para las mismas y (III) un ligando biespecífico unido a cada célula bacteriana muerta intacta.
2. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dichas células bacterianas muertas contienen ácido nucleico funcional.
3. La composición de acuerdo con la reivindicación 2, en la que dicho ácido nucleico funcional no tiene plásmidos.
4. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dichas células bacterianas muertas contienen un fármaco.
5. La composición de acuerdo con la reivindicación 2, en la que dicho ácido nucleico funcional se dirige el transcrito de una proteína que promueve la resistencia a fármacos, inhibe la apoptosis o promueve un fenotipo neoplásico.
6. La composición de acuerdo con la reivindicación 5, en la que dicho ácido nucleico funcional es un ARNip, un ARNhc o un ARNmi que se dirige al transcrito de una proteína que promueve la resistencia a fármacos.
7. La composición de acuerdo con la reivindicación 5, en la que dicho ácido nucleico funcional se dirige al transcrito de la P-glucoproteína, MDR-2 o MDR-3.
8. La composición de acuerdo con la reivindicación 5, en la que dicho ácido nucleico funcional se dirige al transcrito de MRP2, BCR-ABL, la proteína asociada a la resistencia STI-571, la proteína relacionada con la resistencia pulmonar, la ciclooxigenasa-2, el factor nuclear kappa, XRCC1, ERCC1, GSTP1, la  $\beta$ -tubulina mutante o un factor de crecimiento.
9. La composición de acuerdo con la reivindicación 5, en la que dicho ácido nucleico funcional se dirige al transcrito de una proteína que inhibe la apoptosis.
10. La composición de acuerdo con la reivindicación 9, en la que dicho ácido nucleico funcional se dirige a un transcrito de Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, A1/Bfl 1, la cinasa de adhesión focal o la proteína p53.
11. La composición de acuerdo con la reivindicación 5, en la que dicho ácido nucleico funcional se dirige a un transcrito de una proteína que promueve un fenotipo neoplásico.
12. La composición de acuerdo con la reivindicación 11, en la que dicho ácido nucleico funcional se dirige a un transcrito de  $\beta$ -catenina, PKC- $\alpha$ , C-RAF, K-Ras, la secuencia DEAD DP97 de la helicasa de ARN, DNMT1, FLIP, C-Sfc, 53BP1, la proteína del grupo Polycomb EZH2, ErbB1 HPV-16 E5 y E7, Fortilin y MCI1P, DIP13 $\alpha$ , MBD2, p21, KLF4, tpt/TCTP, SPK1 y SPK2, P300, PLK1, Trp53, Ras, ErbB1, VEGF o BAG-1.
13. La composición de la reivindicación 5, que comprende además un fármaco.
14. La composición de la reivindicación 13, en la que dicho fármaco se introduce en una célula bacteriana muerta.
15. La composición de la reivindicación 1, en la que dicho ligando biespecífico comprende un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo.
16. La composición de la reivindicación 1, en la que dicho ligando biespecífico comprende un polipéptido o un hidrato de carbono.
17. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicho ligando biespecífico comprende un primer brazo portador de la especificidad por una estructura de superficie de célula bacteriana y un segundo brazo portador de la especificidad por un receptor de superficie de célula de mamífero no fagocítica.
18. Un procedimiento de carga de células bacterianas muertas intactas con un fármaco que comprende la etapa de crear un gradiente de concentración de dicho fármaco entre un medio extracelular que contiene dichas células bacterianas muertas intactas y el citoplasma de la célula bacteriana muerta intacta, de modo que dicho fármaco se desplaza a favor de dicho gradiente de concentración y se introduce en el citoplasma de la célula bacteriana muerta

intacta, en el que cada célula bacteriana muerta posee una pared celular y/o membrana celular intacta y contiene material genético que es endógeno de la especie bacteriana.

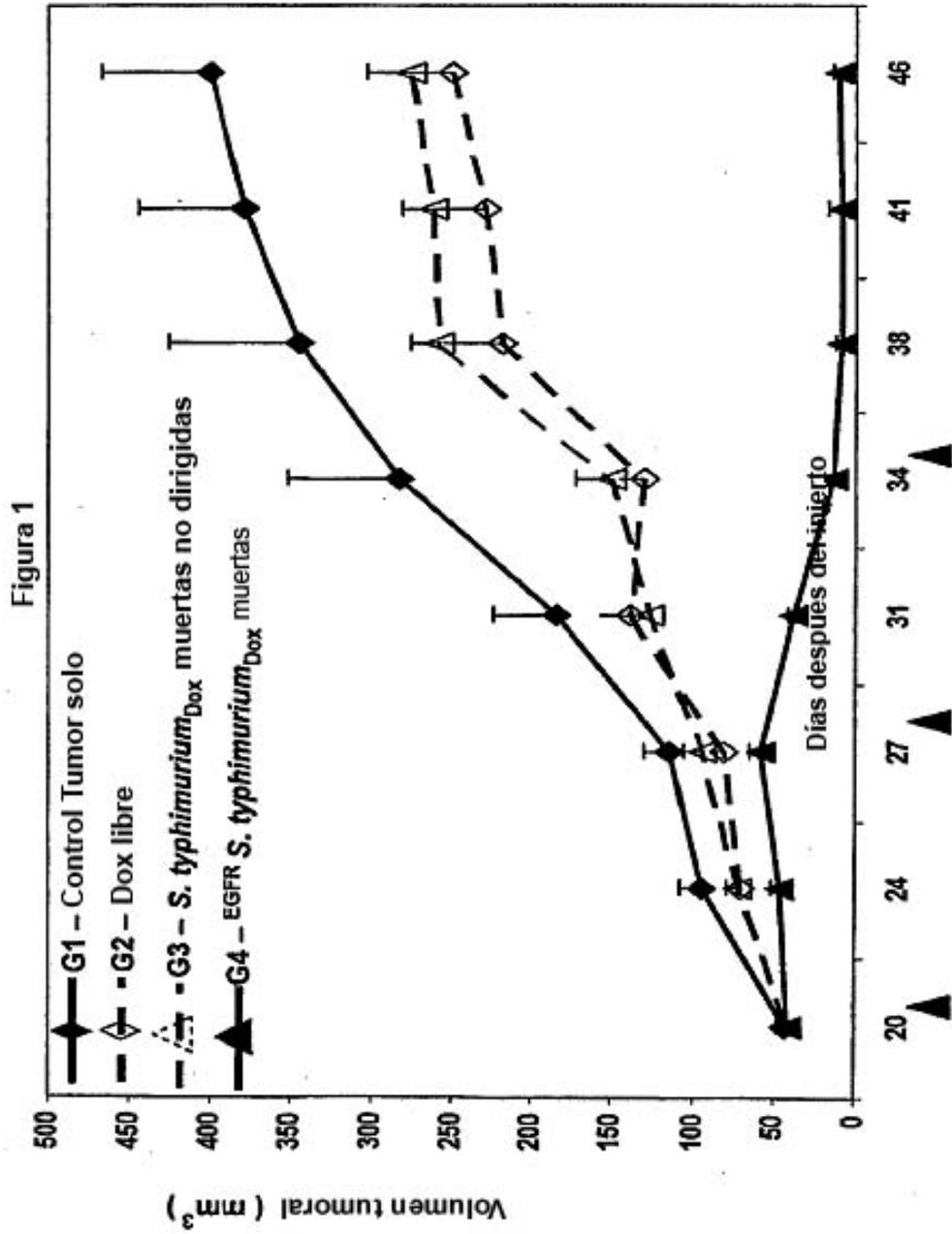
19. Un procedimiento de carga de células bacterianas muertas con un fármaco, que comprende las etapas de:

5 (a) cultivar una célula bacteriana en condiciones tales que la célula bacteriana transcriba y traduzca un ácido nucleico terapéutico que codifica dicho fármaco, de modo que se libere dicho fármaco en el citoplasma de dicha célula bacteriana, y a continuación

10 (b) destruir dicha célula bacteriana para formar una o más células bacterianas muertas que contienen dicho fármaco en el citoplasma,

en el que cada célula bacteriana muerta posee una pared celular y/o membrana celular intacta y contiene material genético que es endógeno de la especie bacteriana.

15 20. Un procedimiento para formular una célula bacteriana muerta de la composición de la reivindicación 3, que comprende coincubar una pluralidad de células bacterianas muertas intactas con ácido nucleico funcional en un tampón.



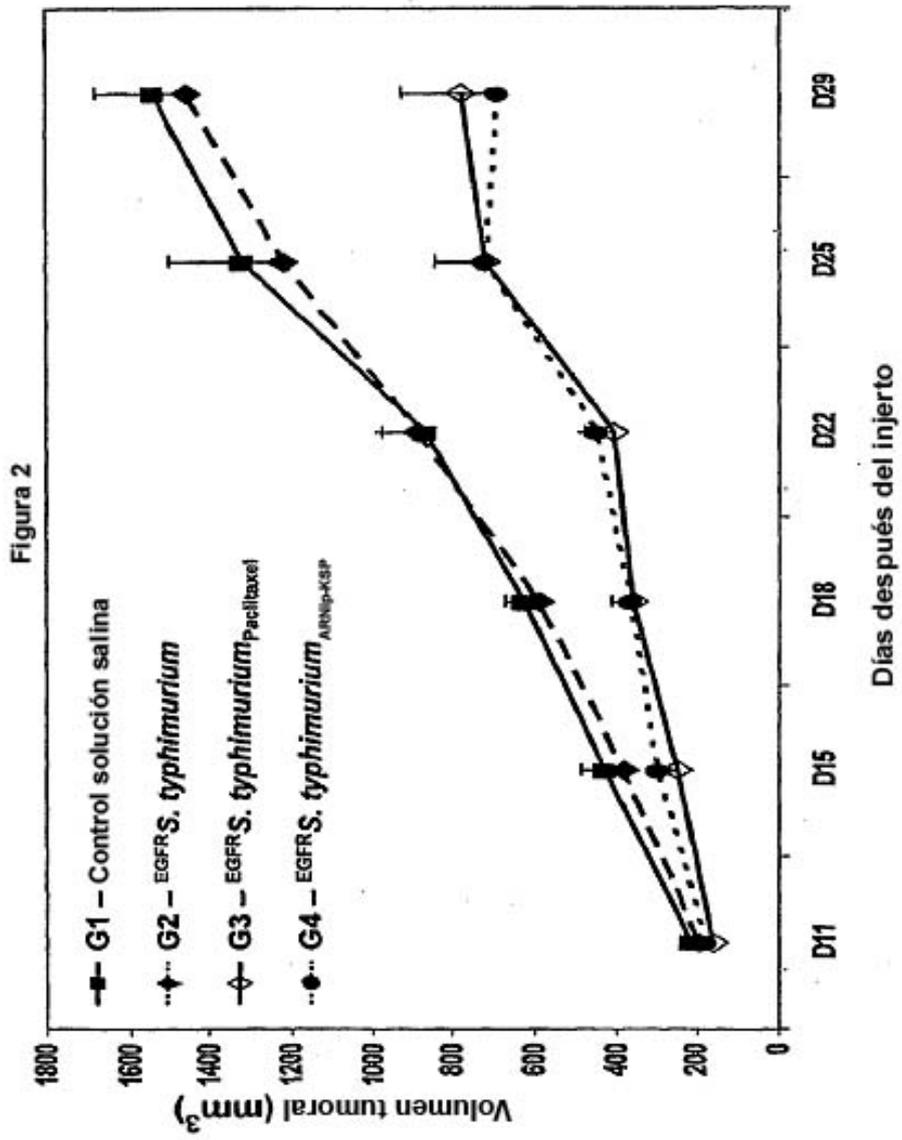


Figura 3

