

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 534 435**

51 Int. Cl.:

C12N 15/11 (2006.01)

C12N 15/88 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

C12N 15/113 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.03.2008 E 08828079 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.01.2015 EP 2145002**

54 Título: **Minicélulas intactas de origen bacteriano que encierran un ácido nucleico funcional exento de plásmido para la administración in vivo a células de mamífero**

30 Prioridad:

30.03.2007 US 909074 P

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

22.04.2015

73 Titular/es:

**ENGENEIC MOLECULAR DELIVERY PTY LTD.
(100.0%)
BUILDING 2, 25 SIRIUS ROAD, LANE COVE
WEST
SYDNEY NSW 2066, AU**

72 Inventor/es:

**BRAHMBHATT, HIMANSHU;
MACDIARMID, JENNIFER y
HULF, TOBY**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 534 435 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

Minicélulas intactas de origen bacteriano que encierran un ácido nucleico funcional exento de plásmido para la administración *in vivo* a células de mamífero

5

Antecedentes de la invención

Recientemente, se desarrollaron una serie de estrategias basadas en ácidos nucleicos para modular diversas funciones celulares (Opalinska y Gewirtz, 2002). Algunas clases de oligonucleótidos como aptámeros, oligonucleótidos señuelo que se unen a factores de transcripción, ribozimas, oligonucleótidos que forman tríplex, motivos CpG inmunoestimulantes, oligonucleótidos antisentido (incluidos los ácidos nucleicos peptídicos), ARN interferentes pequeños y microARN han despertado mucho interés como herramientas de investigación, debido a su modo altamente específico de acción. Estos ácidos nucleicos oligoméricos también tienen un potencial considerable como medicamentos. No obstante, dichos medicamentos enfrentan varios obstáculos como la inestabilidad de los ácidos nucleicos libres y la administración celular segura, eficaz y dirigida de estas macromoléculas (Dykhooorn y Lieberman, 2005).

Un foco de muchas estrategias terapéuticas basadas en ácidos nucleicos es el fenómeno de la interferencia de ARN (ARNi), por la cual el ARN bicatenario (ARNbc) largo de una célula conduce a la degradación específica de la secuencia de transcritos de genes homólogos (complementarios o parcialmente complementarios). Más concretamente, las moléculas de ARNbc largo son procesadas en moléculas de ARN más pequeñas por una ribonucleasa endógena denominada "Dicer" (Grishok *et al.*, 2000; Zamore *et al.*, 2000). Las moléculas de ARN más pequeñas se conocen como "ARN interferente pequeño" (ARNip) cuando derivan de fuentes exógenas y como "microARN" (ARNmi) cuando son producidas a partir de genes que codifican ARN en el propio genoma de la célula. Estas dos clases de ARN reguladores pequeños (por lo general, 21 a 23-nucleótidos) también difieren en que los ARNmi muestran sólo complementariedad parcial para las dianas del ARN mensajero (ARNm).

Los ARN reguladores cortos se unen al denominado "complejo de silenciamiento inducido por ARN" (RISC), que tiene una actividad de helicasa y una actividad de endonucleasa. La actividad de helicasa desenrolla las dos hebras de las moléculas de ARN, permitiendo que la hebra antisentido se una a la molécula de ARN a la que se dirige (Zamore *et al.*, 2000; Zamore, 2002; Vickers *et al.*, 2003). La actividad de endonucleasa hidroliza el ARN que es la diana en el sitio donde se une la hebra antisentido.

En la ARNi, por lo tanto, una molécula de ARN monocatenario (ARNmc) se une a la molécula de ARN que es la diana según las reglas de apareamiento de bases de Watson-Crick y recluta una ribonucleasa que degrada el ARN que es la diana. Por el contrario, la supresión antisentido de la expresión génica conlleva la unión del ARNmc al ARNm, bloqueando la traducción, sin catalizar la degradación del ARNm.

Como clase, los ARN reguladores tienen una vida media de menos de una hora en el plasma humano (Layzer *et al.*, 2004) y son excretados rápidamente por los riñones. En consecuencia, varios grupos han intentado preparar ARN reguladores, incluidos los ARNip, que sean resistentes a las nucleasas. Ejemplos de tales esfuerzos incluyen modificar químicamente los nucleótidos (por ejemplo, 2'-F, 2'-OMe, ácidos nucleicos bloqueados; LNA) o el esqueleto fosfodiéster, por ej. uniones fosforotioato (Chiu y Rana 2003; Choung *et al.*, 2006; Czauderna *et al.*, 2003; Elmén *et al.*, 2005; Layzer *et al.*, 2004; Morrissey *et al.*, 2005). Además, para minimizar el tiempo que los ARNip u otros ARN reguladores pasan en circulación, los profesionales han conjugado las moléculas de ARN a proteínas y anticuerpos para la administración dirigida a células de mamíferos deseadas. En otros esfuerzos por abordar los problemas de baja estabilidad y rápida excreción renal, los profesionales han desarrollado vehículos para la administración de ARN reguladores. También están siendo explorados poliplejos (formados por autoensamblaje de ácidos nucleicos con policationes), lipopoliplejos (formados por la condensación inicial del ácido nucleico con policationes, seguido de la adición de lípidos catiónicos), liposomas y nanopartículas sintéticas.

Estos métodos también enfrentan numerosos obstáculos, como (a) la rápida depuración del suero de las proteínas portadoras a través de la excreción renal, (b) el limitado número de moléculas de ARN regulador que se pueden conjugar a cada proteína portadora, (c) la dificultad en la disociación intracelular de la proteína transportadora de los ARN reguladores intactos, (d) la rápida depuración debida a los poliplejos que se unen a las proteínas del suero que pueden actuar como opsoninas (Dash *et al.* 1999) y (e) la inestabilidad de los liposomas *in vivo*, que causa la liberación de ácidos nucleicos en el suero y la potencial transformación no específica.

También se han desarrollado vectores virales para producir endógenamente ARN reguladores. Véase, por ej., Devroe y Silver, 2004. Sin embargo, estos vectores virales plantean serias preocupaciones de seguridad. Los problemas ilustrativos incluyen la recombinación con virus naturales, potencial oncogénico y de inserción, inmunosupresión inducida por virus, capacidad limitada de los vectores virales para acarrear grandes segmentos de ADN, reversión a la virulencia de los virus atenuados, dificultades en la fabricación y distribución, baja estabilidad y reacciones adversas (Hacein-Bey-Abina *et al.*, 2003; Kootstra y Verma, 2003; Raper *et al.*, 2003; Verma y Weitzman,

2005; Check, 2005).

También se han desarrollado sistemas basados en plásmidos para la expresión recombinante, *in situ* de un ARN regulador, como un ARNip o un precursor más grande (~ 70 nt), un ARN horquillado corto (ARNhc). Un ARNhc contiene secuencias sentido y antisentido de un gen que es la diana que están conectadas por un bucle en horquilla. Véase, por ej., Paddison *et al.*, 2002. Los ARNhc se pueden expresar a partir de un promotor tipo pol III o en el contexto de un ARNmi, mediante promotores pol II.

Como se describe en la solicitud internacional WO 03/033519, los plásmidos que codifican un ARNhc, ARNip u otro ARN regulador se pueden transformar en una cepa bacteriana progenitora que produzca minicélulas intactas, en virtud de una mutación que cause la división celular asimétrica. Dicha transformación produce bacterias recombinantes en las cuales el plásmido se replica intracelularmente, introduciendo gran cantidad de plásmidos en el citoplasma bacteriano. Durante la división asimétrica, algunos de los plásmidos se segregan en el citoplasma minicelular originando minicélulas recombinantes. Después las minicélulas pueden administrar el ADN plasmídico a una célula de mamífero, en la que el ADN plasmídico migra hacia el núcleo celular. En el núcleo el ADN plasmídico expresa el ARNhc u otro ARN regulador, según sea el caso, y el ácido nucleico resultante migra luego al citoplasma, donde puede efectuar ARNi o supresión génica, dependiendo de la naturaleza del ARN regulador involucrado.

Sin embargo, debido a que estos métodos requieren maquinaria hospedadora, administrar cantidades terapéuticamente eficaces de ácido nucleico mediante sistemas basados en la expresión, implica procesos complejos y prolongados que limitan su eficacia. Por consiguiente, es necesaria una metodología más eficaz para la administración de ácidos nucleicos funcionales, como los ARN reguladores, para la administración dirigida a células.

WO/2006/021894 describe la administración de moléculas de ARN a células de mamífero mediante minicélulas de origen bacteriano. Más específicamente, los ejemplos dan a conocer plásmidos, que codifican una secuencia de ARN, que fueron transformados en células bacterianas. Las células bacterianas recombinantes resultantes engendraron minicélulas que recibieron los plásmidos, y las minicélulas que contenían los plásmidos fueron a su vez absorbidas por células de mamífero, en las cuales se liberaron los plásmidos dando lugar a la transcripción de la secuencia de ARN en las células de mamífero.

Resumen de la invención

Por consiguiente, de conformidad con un aspecto de la invención, una composición que contiene (a) una pluralidad de minicélulas intactas, de origen bacteriano, en donde cada minicélula de dicha pluralidad contiene ARN regulador que está empacado en dichas minicélulas y (b) un portador farmacéuticamente aceptable para ellas, donde hay una ausencia en dichas minicélulas de un constructo para la expresión *in situ* de dicho ARN regulador, donde dicho ARN regulador se elige del grupo que consiste en ARNip, ARNmi y ARNhc y donde dicha pluralidad contiene una cantidad terapéuticamente eficaz de dicho ARN regulador.

El ácido nucleico funcional empacado en las minicélulas puede ser dirigido a transcritos de ARN que codifican una proteína que contribuye a la resistencia a los fármacos, la resistencia a la apoptosis o la neoplasticidad, entre otras cosas. Asimismo, una composición de la invención puede contener además un ligando biespecífico compuesto, por ejemplo, por un primer brazo específico para una estructura de superficie de una minicélula y un segundo brazo específico para un receptor de superficie de una célula de mamífero no fagocítica.

La invención permite un método para la administración de un ácido nucleico funcional a una célula de mamífero que es la diana. La metodología inventiva consiste en (a) proporcionar una pluralidad de minicélulas intactas en un portador farmacéuticamente aceptable, donde cada minicélula de la pluralidad contiene ácido nucleico exento de plásmido funcional y (b) poner en contacto las minicélulas de la pluralidad con las células de mamífero de modo que las células de mamífero engullan las minicélulas de la pluralidad, mediante lo cual el ácido nucleico funcional se libera en el citoplasma de las células que son la diana. Como se mencionó, el ARN regulador como ARNip, ARNmi y ARNhc, puede dirigirse a transcritos de ARN que codifican una proteína que contribuye a la resistencia a los fármacos, la resistencia a la apoptosis o la neoplasticidad. En otras realizaciones, la metodología comprende además administrar un fármaco, diferente del ácido nucleico funcional, a la célula de mamífero que es la diana. El fármaco se puede administrar después simultáneamente o incluso antes de la administración de la composición de minicélulas.

De conformidad con otro aspecto, la presente invención contempla un método para formular las minicélulas de la composición de la invención. El método comprende coincubar en un tampón (A) una pluralidad de minicélulas intactas de origen bacteriano con (B) ARN regulador exento de plásmido, obteniendo así minicélulas que contienen dicho ARN regulador, donde dicho ARN regulador se elige del grupo formado por ARNip, ARNmi y ARNhc. En algunas realizaciones, la coincubación puede implicar una agitación suave, en tanto en otras la coincubación es estática. En algunos aspectos, la coincubación dura aproximadamente media hora, en tanto en otros, dura aproximadamente una hora. En una realización, el tampón consiste en solución salina tamponada por ejemplo una

solución tampón de fosfato 1X. En otra realización, la coincubación se realiza a una temperatura entre aproximadamente 4 °C y aproximadamente 37 °C, entre aproximadamente 20 °C y aproximadamente 30 °C, de aproximadamente 25 °C, o de aproximadamente 37 °C. La coincubación puede contener aproximadamente 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} , 10^{12} o 10^{13} minicélulas.

Otros objetivos, características y ventajas se tomarán evidentes a partir de la descripción detallada siguiente. La descripción detallada y los ejemplos específicos se proporcionan sólo a efectos ilustrativos puesto que varios cambios y modificaciones comprendidos por el alcance de la invención serán evidentes para los expertos en el área a partir de esta descripción detallada. Además, los ejemplos demuestran el principio de la invención y no se puede esperar que se ilustre específicamente la aplicación de esta invención para todos los ejemplos en los que será obviamente útil para aquellos expertos en el estado anterior de la técnica.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 describe minicélulas intactas con ARNip empacado marcado con fluoróforo Cy3. La figura 1A es de un microscopio de luz, en tanto la figura 1B muestra la misma diapositiva pero vista bajo luz fluorescente con un filtro de excitación de 515-560 que revela las moléculas de ARNip fuertemente fluorescentes coincidentes con las minicélulas.

La figura 2 es una imagen captada por microscopía confocal de fluorescencia y muestra la adhesión y la internalización de minicélulas con ARNip-Plk1 empacado, dirigidas a EGFFR en células de cáncer de mama humano *in vitro*.

La figura 3 muestra gráficamente un efecto antitumoral significativo logrado mediante tratamiento de xenoinjertos de cáncer de mama humano (MDA-MB-468) en ratones atímicos con minicélulas con KSP-ARNip empacado dirigidas a EGFFR. El grupo de control 1 (-◆-) recibió solución salina estéril, mientras que el grupo experimental 2 (-⊖-) recibió 10^9 minicélulas_{ARNip-KSP} (10⁹), cuatro veces por semana.

La figura 4 describe gráficamente un efecto antitumoral significativo mediante tratamiento de xenoinjertos de cáncer de colon humano (HCT116) en ratones atímicos con minicélulas con KSP-ARNip empacado, en conjunción con minicélulas con carboplatino empacado, dirigidas a EGFFR. El grupo 1 (-◆-) de ratones recibió solución salina estéril y los ratones de los grupos 2 (-△-), 3 (-■-) y 4 (-⊖-) se trataron en las primeras 10 dosis (ver figura 4) con 10^9 minicélulas_{ARNip-PIK1}, 10^9 minicélulas_{ARNip-KSP-1} y 10^9 minicélulas_{ARNip-KSP-2}, respectivamente.

La figura 5 proporciona el análisis FACS, de diversos momentos post transfección, de células de cáncer de colon (HCT116) tratadas con minicélulas experimentales, 10^9 minicélulas_{ARNip-KSP} o 10^9 minicélulas_{ARNip-PIK1}. Las figuras 5A - 5D proporcionan el análisis FACS de muestras recogidas 4 horas después de la transfección, mientras que las figuras 5E - 5H muestran el análisis de muestras recogidas 8 horas después de la transfección. Las figuras 5A y 5E muestran los resultados sólo de las células, mientras que las figuras 5B y 5F se refieren a células + 10^9 minicélulas vacías. Las figuras 5C y 5G muestran los resultados de células + 10^9 minicélulas_{ARNip-KSP} y las figuras 5D y 5H se refieren a células + 10^9 minicélulas_{ARNip-PIK1}.

La figura 6 proporciona el análisis FACS, de diversos momentos post transfección, de células de cáncer de colon (HCT116) tratadas con minicélulas experimentales, 10^9 minicélulas_{ARNip-KSP} o 10^9 minicélulas_{ARNip-PIK1}. Las figuras 6A - 6D proporcionan el análisis FACS de muestras recogidas 16 horas después de la transfección, mientras que las figuras 6E - 6H muestran el análisis de muestras recogidas 24 horas después de la transfección. Las figuras 6A y 6E muestran los resultados sólo de las células, mientras que figuras 6B y 6F se refieren a células + 10^9 minicélulas vacías. Las figuras 6C y 6G muestran los resultados de células + 10^9 minicélulas_{ARNip-KSP} y las figuras 6D y 6H se refieren a células + 10^9 minicélulas_{ARNip-PIK1}.

La figura 7 proporciona el análisis FACS, de diversos momentos post transfección, de células de cáncer de colon (HCT116) tratadas con minicélulas experimentales, 10^9 minicélulas_{ARNip-KSP} o 10^9 minicélulas_{ARNip-PIK1}. Las figuras 7A - 7D proporcionan el análisis FACS de muestras recogidas 32 horas después de la transfección, mientras que las figuras 7E - 7H muestran el análisis de muestras recogidas 48 horas después de la transfección. Las figuras 7A y 7E muestran los resultados sólo de las células, mientras que las figuras 7B y 7F se refieren a células + 10^9 minicélulas vacías. Las figuras 7C y 7G muestran los resultados de células + 10^9 minicélulas_{ARNip-KSP} y las figuras 7D y 7H se refieren a células + 10^9 minicélulas_{ARNip-PIK1}.

Descripción detallada de la invención

Conforme a la presente invención, se pueden empacar cantidades terapéuticamente eficaces de ARN regulador en minicélulas sin recurrir a productos químicos irritantes o electroporación. En este sentido, se ha desarrollado una metodología simple para empacar directamente tales concentraciones terapéuticamente eficaces de ARN regulador en minicélulas intactas que no implique constructos de expresión basados en plásmidos o la maquinaria de expresión de una célula huésped bacteriana. Por consiguiente, un segmento de polinucleótido que codifica el ARN regulador no se clona en un ADN plasmídico ni un vector viral. En cambio, los ácidos nucleicos funcionales exentos de plásmido se empacan directamente en las minicélulas pasando a través de la membrana intacta de la minicélula. Además, una composición de minicélulas de la invención puede administrar de manera segura y eficaz, a las células de mamífero que son la diana, cantidades terapéuticamente eficaces de ARN reguladores como ARNip, ARNmi y ARNhc.

Definiciones

A menos que se indique lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en esta descripción tienen el significado comúnmente comprendido por un experto en el área correspondiente.

Para mayor comodidad, el significado de algunos términos y frases empleados en la memoria, los ejemplos y las reivindicaciones adjuntas se proporcionan a continuación. Otros términos y frases se definen a lo largo de la memoria.

Las formas singulares "un," "una" y "el," "la" incluyen las referencias en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

"Oligonucleótido antisentido" se refiere a una molécula de ácido nucleico complementaria de una porción de un transcrito de un gen particular, que se puede hibridar al transcrito y bloquear su traducción. Un oligonucleótido antisentido puede estar constituido por ARN o ADN.

"Secuencia biomolecular" o "secuencia" se refiere a todo o parte de una secuencia polinucleotídica o polipeptídica.

"Cáncer," "neoplasma", "tumor", "neoplasia maligna" y "carcinoma" que se usan indistintamente en este documento, se refieren a las células o los tejidos que presentan un fenotipo de crecimiento aberrante caracterizado por una pérdida significativa del control de la proliferación celular. Los métodos y las composiciones de esta invención se aplican particularmente a las células malignas, premetastáticas, metastásicas y no metastásicas.

"Complementario" se refiere a la compatibilidad topológica o la coincidencia de las superficies de interacción de dos moléculas, como una molécula de ARNip y su ARNm que es la diana. Las moléculas se pueden describir como complementarias, y además, las características de las superficies de contacto son complementarias entre sí.

"Corresponde a" o "representa" cuando se utiliza en el contexto, por ejemplo, de un polinucleótido o secuencia que "corresponde a" o "representa" un gen significa que una secuencia del polinucleótido está presente en el gen o en el producto génico del ácido nucleico, por ejemplo, ARNm. El polinucleótido puede estar enteramente presente dentro de un exón de una secuencia genómica del gen, o diferentes porciones de la secuencia del polinucleótido pueden estar presentes en exones diferentes, por ejemplo, de modo que la secuencia del polinucleótido contigua esté presente en un ARNm, pre o post empalme, es decir un producto de la expresión del gen.

Un "ARN señuelo" es una molécula que puede adoptar una estructura idéntica a una región funcional importante del ARN al que se va a dirigir. El último ARN puede ser nativo para un huésped mamífero o un patógeno que ha infectado una célula de mamífero, por ej. VIH. El ARN señuelo secuestra la proteína que normalmente interacciona con el ARN que es la diana dando lugar a una interrupción del procesamiento normal del huésped mamífero o patógeno.

"Fármaco" se refiere a cualquier principio farmacológico o fisiológicamente activo que produce un efecto local o sistémico en los animales, especialmente los mamíferos y los seres humanos.

"Expresión" se refiere generalmente al proceso por el cual una secuencia polinucleotídica pasa por un proceso de transcripción y traducción exitoso de modo que se expresan niveles detectables de la secuencia de aminoácidos o la proteína. En ciertos contextos en este documento, expresión se refiere a la producción de ARNm. En otros contextos, expresión se refiere a la producción de proteínas.

"Ácido nucleico funcional" se refiere a una molécula de ácido nucleico que, luego de la introducción en una célula huésped, interfiere específicamente 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, como ARNip, ARNhc, ARN corto (típicamente menos de 400 bases de longitud), micro-ARN (ARNmi), ribozimas y ARN señuelo y ácidos nucleicos antisentido constituyen ejemplos de

ácidos nucleicos funcionales.

"Gen" se refiere a una secuencia polinucleotídica que comprende las secuencias de control y codificación necesarias para la producción de un polipéptido o precursor. El polipéptido puede ser codificado por una secuencia de codificación entera o por cualquier porción de la secuencia de codificación. Un gen puede constituir una secuencia de codificación ininterrumpida o puede incluir uno o más intrones, unidos mediante las uniones de empalme apropiadas. Por otra parte, un gen puede contener una o más modificaciones en las regiones de codificación o sin traducir que podrían afectar la actividad biológica o la estructura química del producto de expresión, la velocidad de expresión o la forma de control de la expresión. Dichas modificaciones incluyen, pero no exclusivamente, mutaciones, inserciones, deleciones y sustituciones de uno o más nucleótidos. En este sentido, dichos genes modificados se pueden denominar "variantes" del gen "nativo".

"Célula huésped" se refiere a una célula que puede ser, o ha sido, utilizada como receptor de un plásmido recombinante u otra transferencia de polinucleótidos e incluye la progenie de la célula original que ha sido transinfectada. La progenie de una célula individual puede no ser necesariamente completamente idéntica en morfología o en complemento de ADN genómico o total a la de la progenitora original debido a una mutación natural, accidental o deliberada.

"Hibridación" se refiere a cualquier proceso mediante el cual una secuencia polinucleotídica se une a una secuencia complementaria a través de apareamiento de bases.

"Individuo", "sujeto" "huésped" y "paciente", que se usan indistintamente en esta descripción, se refieren a cualquier sujeto mamífero para el que se desea diagnóstico, tratamiento o terapia. En una realización preferida, el individuo, sujeto, huésped o paciente es un ser humano. Otros sujetos pueden ser, pero no exclusivamente, ganado vacuno, caballos, perros, gatos, conejillos de indias, conejos, ratas, primates y ratones.

"Marcador" se refiere a agentes que son capaces de proporcionar una señal detectable, directamente o a través de la interacción con uno o más miembros adicionales de un sistema de producción de señales. Los marcadores que son directamente detectables y pueden ser de utilidad en la invención incluyen los marcadores fluorescentes. Los fluoróforos específicos incluyen fluoresceína, rodamina, BODIPY, colorantes de cianina y similares. La invención también contempla el uso de isótopos radioactivos, como ^{35}S , ^{32}P , ^3H y análogos como marcadores. También se pueden utilizar marcadores colorimétricos como oro coloidal o perlas de vidrio o plástico (por ejemplo, poliestireno, polipropileno, látex) coloreadas. Por ejemplo, véase las patentes de Estados Unidos N° 4,366,241, N° 4,277,437, N° 4,275,149, N° 3,996,345, N° 3,939,350, N° 3,850,752 y N° 3,817,837.

"Oligonucleótido" se refiere a un polinucleótido que contiene, por ejemplo, entre aproximadamente 10 nucleótidos (nt) y aproximadamente 1000 nt. Los oligonucleótidos para usar en la invención tienen preferentemente entre aproximadamente 10 nt y aproximadamente 150 nt. El oligonucleótido puede ser un oligonucleótido natural o un oligonucleótido sintético. Los oligonucleótidos se pueden modificar.

"Minicélula" se refiere a formas anucleadas de células bacterianas, engendradas por una alteración en la coordinación, durante la fisión binaria, de la división celular con segregación de ADN. Las minicélulas son diferentes de otras vesículas pequeñas que se generan y liberan espontáneamente en ciertas situaciones y no son debidas a reordenamientos genéticos específicos ni a expresión génica episómica. En el contexto de esta invención las minicélulas están intactas puesto que otras formas "despojadas", como esferoplastos, poroplastos, protoplastos, permitirían que se filtrara el ácido nucleico funcional empacado y no serían terapéuticamente eficaces. La membrana minicelular intacta permite que la carga sea retenida dentro de la minicélula y se libere intracelularmente dentro de la célula huésped de mamífero que es la diana.

En esta descripción, "modificado" y "químicamente modificado" se refieren a oligonucleótidos o polinucleótidos con uno o más cambios químicos en las estructuras moleculares naturales de todas o parte de las bases, porciones azúcar y uniones fosfato entre nucleósidos, así como a las moléculas que añadieron sustituciones o una combinación de modificaciones en estos sitios. Las uniones fosfato entre nucleósidos pueden ser uniones entre nucleótidos fosfodiéster, fosfotriéster, fosforoamidato, siloxano, carbonato, carboximetiléster, acetamidato, carbamato, tioéster, fosforoamidato con puente, fosfonato de metileno con puente, fosforotioato, metilfosfonato, fosforoditioato, fosforotioato o sulfona con puente, o uniones 3'-3', 5'-3' o 5'-5' y combinaciones de uniones similares. La unión fosfodiéster puede ser reemplazada con una unión sustituta, como fosforotioato, metilamino, metilfosfonato, fosforoamidato y guanidina, y la subunidad ribosa de los polinucleótidos también puede ser sustituida (por ej. hexosa fosfodiéster; ácidos nucleicos peptídicos). Las modificaciones pueden ser internas (única o repetida) o en el extremo o los extremos de la molécula de oligonucleótido y pueden incluir adiciones a la molécula de las uniones fosfato entre nucleósidos, como modificaciones desoxirribosa y fosfato que se escinden de, o se entrecruzan con, las cadenas opuestas u otras enzimas o proteínas asociadas. Las expresiones "oligonucleótidos modificados" y "polinucleótidos modificados" también incluyen oligonucleótidos o polinucleótidos que contienen modificaciones en las porciones azúcar (por ejemplo, monómeros ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos 3'-sustituidos), todos los

cuales están unidos entre sí mediante uniones 5' a 3'.

La frase "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, ADN genómico, ADNc, híbridos ADN-ARN o un polímero compuesto por bases purina y pirimidina u otras bases nucleotídicas naturales, modificadas química o bioquímicamente, no naturales, o derivadas. El esqueleto de un polinucleótido puede contener grupos azúcar y fosfato (como se pueden encontrar generalmente en el ARN o ADN), o grupos azúcar o fosfato modificados o sustituidos. Alternativamente, el esqueleto del polinucleótido puede contener un polímero de subunidades sintéticas como fosforoamiditas y así puede ser un fosforoamidato de oligodesoxinucleósido o un oligómero mixto de fosforoamidato-fosfodiéster. Un polinucleótido puede contener nucleótidos modificados, como nucleótidos y análogos de nucleótidos metilados, uracilo, otros azúcares, y grupos de unión como fluororribosa y tioato, y ramificaciones de nucleótido. Un polinucleótido se puede modificar además, por ejemplo por conjugación con un componente marcador. Otros tipos de modificaciones incluyen caquetes, sustitución de uno o más de los nucleótidos naturales con un análogo e introducción de medios para unir el polinucleótido a proteínas, iones metálicos, componentes marcadores, otros polinucleótidos o un soporte sólido.

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

El calificativo "exento de plásmido" denota la ausencia de un constructo, como un plásmido o un vector viral, para la expresión *in situ* de un ácido nucleico funcional.

"Polipéptido" y "proteína", que se usan indistintamente en este documento, se refieren a una forma polimérica de aminoácidos de cualquier longitud, que puede incluir aminoácidos traducidos, sin traducir, modificados químicamente, modificados bioquímicamente y derivados. Un polipéptido o proteína puede ser natural, recombinante o sintético, o cualquier combinación de éstos. Además, un polipéptido o proteína puede comprender un fragmento de una proteína o un péptido natural. Un polipéptido o proteína puede ser una molécula única o puede ser un complejo multimolecular. Además, dichos 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 de metionina N-terminales, proteínas marcadas inmunológicamente, y similares.

"Purificado" se refiere a un compuesto que se extrae de su entorno natural y está al menos aproximadamente 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.9% o 99.99% exento de otros componentes con los que se asocia naturalmente.

"ARN regulador" denota una categoría que incluye los ARN que afectan la expresión por interferencia de ARN, supresión de la expresión génica u otro mecanismo. En consecuencia, además de ARNhc, ARNip, ARNmi y ARNmc antisentido, la categoría de ARN reguladores incluye ribozimas y ARN señuelos, entre otros.

"Ribozima" se refiere a una molécula de ARN que tiene una actividad enzimática que puede escindir repetidamente otras moléculas de ARN de manera específica de la secuencia de bases de nucleótidos.

"Interferencia" de ARN (ARNi) denota un mecanismo guiado por ARN como el descrito antes, que implica la degradación del ARN complementario o parcialmente complementario que es la diana, para la regulación específica de la secuencia o del gen de la expresión génica (síntesis de proteínas).

"Identidad de secuencia" denota un grado de similitud o complementariedad. Puede haber identidad parcial o identidad total. Una secuencia parcialmente complementaria es la que inhibe al menos parcialmente a una secuencia idéntica de hibridarse a un polinucleótido que es la diana; se hace referencia a ella utilizando la expresión funcional "sustancialmente idéntica". La inhibición de la hibridación de la secuencia totalmente complementaria a la secuencia que es la diana se puede examinar utilizando un ensayo de hibridación (transferencia Southern o Northern, hibridación en solución y similares) en condiciones de baja rigurosidad. Una secuencia o sonda sustancialmente idéntica competirá por, e inhibirá, la unión (es decir la hibridación) de una secuencia o sonda completamente idéntica a la secuencia que es la diana, en condiciones de baja rigurosidad. Esto no quiere decir que las condiciones de baja rigurosidad son tales que la unión no específica está permitida; las condiciones de baja rigurosidad requieren que la unión de dos secuencias, una a la otra, sea una interacción específica (es decir, selectiva). La ausencia de unión no específica se puede determinar mediante el uso de una segunda secuencia que sea la diana que carezca incluso de un grado parcial de complementariedad (por ejemplo, menos de 30% de identidad); en ausencia de unión no específica, la sonda no se hibridará a la segunda secuencia no complementaria que es la diana.

Otra forma de ver la identidad de secuencia, en el contexto para dos secuencias de ácidos nucleicos o polipéptidos,

implica establecer referencias para residuos en las dos secuencias que son las mismas cuando se alinean para la máxima coincidencia en una región determinada. Según se usa en este documento, "porcentaje de identidad de secuencia" significa el valor determinado mediante comparación de dos secuencias perfectamente alineadas en una ventana de comparación, en la cual la porción de la secuencia polinucleotídica en la ventana de comparación puede contener adiciones o deleciones (es decir, huecos) en comparación con la secuencia de referencia (que no contiene adiciones ni deleciones) para una alineación óptima de las dos secuencias. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en las que aparece una base de ácido nucleico idéntica en ambas secuencias para calcular el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes entre el número total de posiciones en la ventana de comparación y multiplicando el resultado por 100 para obtener el porcentaje de identidad de secuencia.

"ARN interferente pequeño" (ARNip) se refiere a moléculas de ARN bicatenario, generalmente, de 10 a aproximadamente 30 nucleótidos de longitud que son capaces de mediar la interferencia de ARN (ARNi). En general, las moléculas de ARNip tienen la capacidad de reducir la expresión de una proteína al interactuar directamente con un transcrito que codifica la proteína.

Una cantidad "terapéuticamente eficaz" de ácido nucleico funcional es una dosis de la molécula en cuestión, por ejemplo, ARNip, ARNmi o ARNhc libre, que invoca una respuesta farmacológica cuando se administra a un sujeto, de acuerdo con la presente invención. En el contexto de la presente invención, por lo tanto, una cantidad terapéuticamente eficaz puede ser calibrada por referencia a la prevención o mejora de una afección o síntoma adverso asociado a una enfermedad o trastorno, en un modelo animal o en un sujeto humano, cuando se administran minicélulas con ácido nucleico funcional empacado, como se describe en mayor detalle a continuación. Una cantidad que resulta una "cantidad terapéuticamente eficaz" en una determinada instancia, para un sujeto en particular, puede no ser eficaz para el 100% de los sujetos tratados del mismo modo para la enfermedad o afección bajo consideración, aun cuando dicha dosis sea considerada una "cantidad terapéuticamente eficaz" por los profesionales. La dosis apropiada en este sentido también variará en función, por ejemplo, del tipo, la etapa y la gravedad de la enfermedad o afección a ser afectada. En cualquier caso, la presente ilustración de pruebas *in vitro* (Ejemplo 2) y pruebas *in vivo* (Ejemplos 4, 5 y 6) según la presente invención, así como de la metodología para cuantificar una cantidad administrada en minicélulas de una molécula de ácido nucleico funcional (Ejemplo 3), cuando se considere a la luz de toda la descripción, capacita a una persona conocedora en ensayos preclínicos y clínicos de posibles fármacos para determinar, a través de la experimentación sistemática, la cantidad terapéuticamente eficaz de ácido nucleico funcional para una indicación particular.

Los términos "tratamiento", "que trata", "tratar" y similares se refieren a la obtención de un efecto farmacológico y/o fisiológico deseados. El efecto puede ser profiláctico en términos de prevenir parcial o completamente una enfermedad o un síntoma de ésta, y/o puede ser terapéutico en términos de una estabilización o cura parcial o total de una enfermedad y/o un efecto adverso atribuible a la enfermedad. "Tratamiento" cubre cualquier tratamiento de una enfermedad en un mamífero, particularmente un humano, e incluye (a) prevenir la aparición de la enfermedad o el síntoma en un sujeto que puede estar predispuesto a la enfermedad o el síntoma, pero que aún no se le ha diagnosticado; (b) inhibir la enfermedad o el síntoma, es decir detener su progreso; o (c) aliviar la enfermedad o el síntoma, es decir, causar la regresión de la enfermedad o el síntoma.

Minicélulas

Las minicélulas de la invención son formas anucleadas de *E. coli* u otras células bacterianas, engendradas por una alteración en la coordinación, durante la fisión binaria, de la división celular con segregación de ADN. La replicación cromosómica procariota está vinculada a la fisión binaria normal, que implica la formación del tabique intermedio de la célula. En *E. coli*, por ejemplo, la mutación de los genes *min*, tales como *minCD*, puede eliminar la inhibición de la formación del tabique en los polos de la célula durante la división celular, dando lugar a la producción de una célula hija normal y una minicélula anucleada. Véase de Boer *et al.*, 1992; Raskin & de Boer, 1999; Hu & Lutkenhaus, 1999; Harry, 2001. Las minicélulas son diferentes de otras vesículas pequeñas que se generan y liberan espontáneamente en ciertas situaciones y, en contraste con las minicélulas, no se deben a reordenamientos genéticos específicos ni a la expresión génica episómica. En una realización preferida, las minicélulas poseen paredes celulares intactas ("minicélulas intactas").

Además de mutaciones en el operón *min*, también se generan minicélulas anucleadas luego de una serie de otros reordenamientos genéticos o mutaciones que afectan la formación del tabique, por ejemplo en el *divIVB1* en el *B. subtilis*. Véase Reeve y Cornett, 1975. Las minicélulas también se pueden formar después de una perturbación en los niveles de expresión génica de proteínas implicadas en la división celular/segregación cromosómica. Por ejemplo, la sobreexpresión de *minE* conduce a la división polar y la producción de minicélulas. Del mismo modo, minicélulas menos cromosoma pueden resultar de defectos en la segregación cromosómica por ejemplo la mutación *smc* en *Bacillus subtilis* (Britton *et al.*, 1998), la deleción de *spoOJ* en *B. subtilis* (Ireton *et al.*, 1994), la mutación *mukB* en *E. coli* (Hiraga *et al.*, 1989), y la mutación *parC* en *E. coli* (Stewart y D'Ari, 1992). Los productos génicos se pueden suministrar *in trans*. Cuando son sobreexpresados desde un plásmido de alto número de copias, por

ejemplo, CafA puede aumentar la velocidad de división celular y/o inhibir la partición cromosómica después de la replicación (Okada *et al.*, 1994), resultando en la formación de células encadenadas y minicélulas anucleadas (Wachi *et al.*, 1989). Las minicélulas se pueden preparar a partir de cualquier célula bacteriana de origen grampositivo o gramnegativo.

5 En un aspecto, las minicélulas pueden contener uno o más ácidos nucleicos funcionales exentos de plásmido cuya administración se desea. Los ácidos nucleicos funcionales de la invención tienen la capacidad de reducir la expresión de una proteína al interactuar directamente con un transcrito que codifica la proteína.

10 Empacado de ácido nucleico funcional en minicélulas intactas

El ácido nucleico funcional se puede empacar directamente en minicélulas intactas. El proceso omite los pasos requeridos previamente, por ejemplo, de clonar ácidos nucleicos que codifican ácido nucleico funcional en plásmidos de expresión, transformar bacterias progenitoras que producen minicélulas con los plásmidos y generar minicélulas recombinantes. En cambio, el ácido nucleico funcional exento de plásmido se puede empacar directamente en minicélulas intactas mediante coincubación de una pluralidad de minicélulas intactas con ácido nucleico funcional en un tampón. En algunas realizaciones, la coincubación puede implicar una agitación suave, en tanto en otras la coincubación es estática. Un período de coincubación de aproximadamente una hora ha demostrado ser suficiente, pero periodos más cortos, como de aproximadamente media hora también pueden ser eficaces. En una realización, el tampón consiste en solución salina tamponada por ejemplo una solución tampón de fosfato 1X. La solución salina tamponada puede estar en forma de gelatina. En otra realización, la coincubación se realiza a una temperatura entre aproximadamente 4 °C y aproximadamente 37 °C, entre aproximadamente 20 °C y 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} minicélulas. Los parámetros específicos de temperatura, tiempo, tampón, concentración de minicélulas, etc. se pueden optimizar para una combinación de condiciones particular.

El éxito de este método es sorprendente porque, por más de cuatro décadas, los profesionales han desarrollado una diversidad de procesos químicos y electroquímicos (revisado por Miller, 1994) para transformar los ácidos nucleicos dentro de células bacterianas. Los profesionales han utilizado una medida tan severa porque la sabiduría convencional ha sostenido que los ácidos nucleicos como ARNip, ARNmi o ARNhc exentos de plásmido son demasiado grandes para ingresar pasivamente en el citoplasma de la minicélula. Por ejemplo, las porinas, que son proteínas en barril β que normalmente actúan como poros de difusión, permiten el transporte pasivo a través de la membrana bacteriana externa de moléculas con pesos moleculares de 600 Dalton o menos (Nikaido, 1994). Mientras tanto, el ADN plasmídico bicatenario que codifica ARNhc supera 1 millón de Dalton y los ARNip o ARNmi bicatenarios superan los 15 000 Dalton.

Además, una vez empacados, los ácidos nucleicos funcionales permanecen dentro de la minicélula y están protegidos de la degradación. En este sentido, estudios de incubación prolongados con minicélulas con ARNip empacado incubadas en solución salina estéril no mostraron ninguna filtración de ARNip. Además, coincubar minicélulas con ARNip empacado con nucleasas, confirmó que los ARNip habían penetrado la membrana externa de las minicélulas intactas y estaban protegidos de la degradación. Del mismo modo, a pesar del hecho de que se podría esperar que las minicélulas portaran nucleasas residuales del citoplasma bacteriano progenitor, los ARNip empacados son estables en el citoplasma de la minicélula. El ARNip empacado también evita la maquinaria degradadora presente dentro de los fagolisosomas, como ácidos, radicales libres de oxígeno e hidrolasas ácidas (Conner y Schmid, 2003), para efectuar el knockdown (reducción de la expresión) del ARNm que es la diana dentro de la célula de mamífero.

En otras realizaciones, varios ácidos nucleicos funcionales dirigidos a diferentes ARNm que son la diana, se pueden empacar en la misma minicélula. Este método se puede utilizar para combatir la resistencia a los fármacos y la resistencia a la apoptosis. Por ejemplo, los pacientes con cáncer habitualmente presentan resistencia a los medicamentos quimioterapéuticos. Dicha resistencia puede ser mediada por la sobreexpresión de genes como bombas de multirresistencia a los fármacos (MDR) y genes antiapoptóticos, entre otros. Para combatir esta resistencia, las minicélulas se pueden empacar con concentraciones terapéuticamente significativas de ácido nucleico funcional para los genes asociados a MDR y administrar a un paciente antes de la quimioterapia. Además, empacar en la misma minicélula varios ácidos nucleicos funcionales dirigidos a diferentes ARNm que son la diana, puede aumentar el éxito terapéutico puesto que la mayoría de las dianas moleculares están sujetas a mutaciones y tienen alelos múltiples.

60 Por lo tanto, empacar ácido nucleico funcional exento de plásmido directamente en minicélulas intactas, como se describe aquí, ofrece numerosas ventajas. Por ejemplo, dado que el método inventivo no requiere modificar genéticamente las bacterias progenitoras para dar cabida a la expresión de ácido nucleico funcional, se puede usar una bacteria progenitora para producir minicélulas que contengan muchos tipos de ácidos nucleicos, dirigidos a una diversidad de indicaciones. Asimismo, se puede cargar una minicélula con varios ARN diferentes, evitando o

superando de esta manera los mecanismos de resistencia.

Ácidos nucleicos funcionales

5 Como se señaló antes, ácido nucleico funcional denota una categoría que incluye moléculas de ácido nucleico que afectan la expresión por interferencia de ARN, supresión de la expresión génica u otro mecanismo. Dichas moléculas son ejemplificadas por ADN o ARN mono, bi o multicatenario. Los ejemplos de ácidos nucleicos funcionales incluyen, pero no exclusivamente, ARN regulador, como ARNhc, ARNip, ARNmi y ARNmc antisentido, por consiguiente, ribozimas y ARN señuelos y ácidos nucleicos antisentido.

10 En una realización preferida de la invención, las minicélulas intactas son portadoras de moléculas de ARNip. Las moléculas de ARNip son útiles para llevar a cabo ARNi, un mecanismo de silenciamiento génico postranscripcional. Como se indicó, "ARNip" se refiere generalmente a moléculas de ARN bicatenario de aproximadamente 10 a aproximadamente 30 nucleótidos de longitud que se denominan así por su capacidad para interferir específicamente con la expresión de proteínas. Preferentemente, las moléculas de ARNip tienen 12-28 nucleótidos de longitud, más preferentemente 15-25 nucleótidos, aún más preferentemente 19-23 nucleótidos y muy preferentemente 21-23 nucleótidos de longitud. Por lo tanto, las moléculas de ARNip preferidas tienen 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 28 o 29 de nucleótidos de longitud.

20 La longitud de una hebra designa la longitud de una molécula de ARNip. Por ejemplo, un ARNip que se describe como de 21 ribonucleótidos de longitud (21 mer) podría estar constituido por dos hebras opuestas de ARN que se aparean por apareamiento de 19 bases contiguas. Los dos ribonucleótidos restantes de cada hebra formarían un "voladizo". Cuando un ARNip contiene dos hebras de diferente longitud, la más larga de las hebras indica la longitud del ARNip. Por ejemplo, un ARNbc que contenga una hebra de 21 nucleótidos de longitud y una hebra de 20 nucleótidos de longitud, constituye un 21-mer.

25 Son deseables los ARNip que contienen un voladizo. El voladizo puede estar en el extremo 5' o el 3' de una hebra. Preferentemente se encuentra en el extremo 3' de la hebra del ARN. La longitud de un voladizo puede variar, pero preferentemente es de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 bases, y más preferentemente es de aproximadamente 2 nucleótidos de longitud. Preferentemente, el ARNip de la presente invención contendrá un voladizo 3' de aproximadamente 2 a 4 bases. Más preferentemente, el voladizo 3' tendrá 2 ribonucleótidos de longitud. Aún más preferentemente, los 2 ribonucleótidos que constituyen el voladizo 3' son uridina (U).

35 Los ARNhc contienen una única hebra de ARN que forma una estructura de bucle en horquilla, donde el tallo consta de hebras sentido y antisentido complementarias que constituyen un ARNip bicatenario, y el bucle es un conector de tamaño variable. La estructura de tallo de los ARNhc tiene generalmente entre aproximadamente 10 y aproximadamente 30 nucleótidos de longitud. Preferentemente, las moléculas de ARNhc tienen 12-28 nucleótidos de longitud, más preferentemente 15-25 nucleótidos de longitud, aún más preferentemente 19-23 nucleótidos de longitud y muy preferentemente 21-23 nucleótidos de longitud. Por lo tanto, las moléculas de ARNhc preferidas tienen tallos de 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 o 29 nucleótidos de longitud.

45 Los ARNip de la invención están diseñados para interactuar con una secuencia de ribonucleótidos que es la diana, lo que significa que complementan una secuencia que es la diana lo suficiente como para hibridarse a dicha secuencia que es la diana. En una realización, la invención proporciona una molécula de ARNip que contiene una secuencia de ribonucleótidos al menos 70%, 75%, 80%, 85% o 90% idéntica a una secuencia de ribonucleótidos que es la diana o al complemento de una secuencia de ribonucleótidos que es la diana. Preferentemente, la molécula de ARNip es al menos 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a la secuencia de ribonucleótidos que es la diana o al complemento de la secuencia ribonucleótidos que es la diana. Muy preferentemente, un ARNip será 100% idéntico a la secuencia de ribonucleótidos que es la diana o al complemento de la secuencia de ribonucleótidos. No obstante, moléculas de ARNip con inserciones, deleciones o mutaciones puntuales con relación a una diana también pueden ser eficaces.

50 Concordantemente, en un aspecto de la invención, las minicélulas intactas pueden ser portadoras de una o más secuencias de ARNip que tiene como meta silenciar la resistencia a los fármacos o los genes de resistencia a la apoptosis. Empleando minicélulas que codifiquen múltiples ARNip, es posible tratar células que expresan mecanismos de multiresistencia a fármacos.

55 Las herramientas para ayudar al diseño de ARNip, y ARN regulador en general, están disponibles para el público. Por ejemplo, una herramienta informática de diseño de ARNip está disponible en internet en www.dharmacon.com.

60 Dianas del ácido nucleico funcional

El ácido nucleico funcional de la invención se dirige al gen o transcrito de una proteína que promueve la resistencia a los fármacos, inhibe la apoptosis, promueve un fenotipo neoplásico, inhibe la proliferación de patógenos o inhibe la

replicación o la proliferación viral. Se ha logrado la aplicación exitosa de las estrategias con ácido nucleico funcional en estos contextos, pero sin los beneficios de vectores minicelulares. Véase, por ej., Sioud (2004), Caplen (2003), Wu *et al.* (2003), Yague *et al.* (2004).

5 Las proteínas que contribuyen a la resistencia a los fármacos o la promoción del fenotipo neoplásico constituyen dianas preferidas del ácido nucleico funcional. Las proteínas pueden contribuir a la resistencia a los fármacos adquirida o intrínseca. Cuando células enfermas, como las células tumorales, responden inicialmente a los fármacos pero se vuelven resistentes en los ciclos de tratamiento siguientes, se adquiere el fenotipo resistente. Las dianas útiles implicadas en la resistencia adquirida o intrínseca a los fármacos incluyen, pero no exclusivamente, transportadores de casetes de unión a ATP como la P-glucoproteína (P-gp, P-170, PGY1, MDR1, ABCB1, proteína asociada a MDR, proteína de multiresistencia a fármacos 1, MDR-2 y MDR-3, MRP2 (proteína asociada a la multiresistencia a fármacos), BCR-ABL (región de rotura de conglomerados - protooncogén de Abelson), proteína asociada a la resistencia a STI-571, proteína relacionada a la resistencia pulmonar, ciclooxigenasa-2, factor nuclear kappa, XRCC1 (grupo 1 de complementación cruzada de reparación de rayos X), ERCC1 (gen de complementación cruzada de reparación por escisión), GSTP1 (Glutación S-transferasa), β -tubulina mutante, Abcb1a (ABCB4), Abcc1, Abcc2, Abcc3 (MLP-2), Abcc5, Abcc6, Abcd2, Abcg2, Bax, Bcl2, Bcl21 (bcl-x), Mvp, Rb1, Top1, Top2a, Top2b, Trp53 (p53). Otros genes implicados en la resistencia a los fármacos también incluyen (a) genes involucrados en el metabolismo de los fármacos, por ejemplo, Arnt, Blmh, C130052I12Rik (CRR9p), Comt, Crabp1, Cyp1a1, Cyp1a2, Cyp2b19, Cyp2b20, Cyp2c29, Cyp2c40, Cyp2c70, Cyp2d22, Cyp2e1, Dhfr, Ephx1, Ephx2, Gstm1 (MGST1), Gstp1, Nat2, Nqo1, Sod1, Ste, Tpm1, Tyms, Ugcg, (b) genes involucrados en la reparación del ADN por ejemplo Apc, Atm, Brca1, Brca2, Ercc3 (XPB), Mgmt, Mlh1, Xpa, Xpc, (c) genes involucrados en el ciclo celular por ejemplo Ccnd1 (ciclina D1), Ccne1 (ciclina E1), Cdk1, Cdk2, Cdk4, Cdkn1a (p21Waf1), Cdkn1b (p27Kip1), Cdkn2a (p16Ink4a), Cdkn2d (p19), KSP., (d) genes involucrados en los receptores de los factores de crecimiento por ejemplo Egfr, Erbb2 (Neu, HER2), Erbb3, Erbb4, Fgf2 (bFGF), Met, (e) genes involucrados en los receptores de hormonas por ejemplo Ar, Esr1, Esr2, Igf2r, Ppara, Ppard, Pparg, Ppargc1, Rara, Rarb, Rxra, Rxrb, Rxrg, Srd5a2, y (f) genes involucrados en factores de transcripción por ejemplo Ahr, Ap1s1, Ap1s2, Elk1, Fos (c-fos), Gabpa, Hif1a, Mafb, Myc (c-myc), Nfkb1, Nfkb2, Nfkbib, Nfkbie, Relb (1-rel), Tnfrsf11A.

Las dianas útiles también incluyen proteínas que contribuyen a la resistencia a la apoptosis. Estas incluyen Bcl-2 (leucemia/linfoma de linfocitos B), Bcl-X_L, 1 A1/Bfl, cinasa de adhesión focal y proteína mutante p53.

Las dianas útiles incluyen además proteínas supresoras de tumores mutantes y oncogénicas. Los ejemplos incluyen β -catenina, PKC- α (proteína cinasa C), C-RAF, K-Ras (V12), h-Ras, ARN helicasa Dead box DP97, DNMT1 (ADN metiltransferasa 1), FLIP (proteína inhibidora tipo Flice), C-Sfc, 53BP1, EZH2 proteína del grupo Polycomb (potenciador de homólogo zeste), ErbB1, HPV-16 E5 y E7 (virus del papiloma humano tipo early 5 y early 7), Fortilin & MCI1P (proteína de leucemia de células mieloides 1), DIP13 α (proteína de interacción con DDC 13a), MBD2 (dominio de unión a metil CpG), p21, KLF4 (factor tipo Kruppel 4), tpt/TCTP (proteína tumoral de control traduccional), SPK1 & SPK2 (esfingosina cinasa), P300, PLK1 (cinasa tipo Polo 1), Trp53, Ras, ErbB1, VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular) y BAG-1 (atanogén asociado a BCL2 1).

Se han identificado un gran número de dianas moleculares para el tratamiento del cáncer, y plataformas descubrimiento de ARNi están identificando rápidamente una serie de nuevas dianas diferentes. Los ejemplos de tales dianas moleculares, útiles en esta invención, incluyen: tirosina cinasa (variante), Akt (proteína cinasa B, PKB), Akt1, AlphaLbeta2 integrina, aminopeptidasa, receptor de andrógenos, Aurora A, AuroraB, receptor del factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) (bFGFr), BRaf, antígeno carcinoembrionario (CEA), CD142, CD37, CD44, CD5, CD74, CD77, Chk1, CHK2, CHras, CSF1r, CXCR4, Ciclina D1 (CCND1), cinasa dependiente de ciclina 1 (CDK1), cinasa dependiente de ciclina 2 (CDK2), inhibidor 1B de la cinasa dependiente de ciclina (CDKN1B, p27, KIP1), CYP26, receptor del factor de crecimiento de fibroblastos 3 (FGFr3), receptor del factor de crecimiento de fibroblastos 4 (FGFr4), G250, vía de señalización de Hedgehog (Hh), factor de crecimiento/factor de dispersión de hepatocitos (HGF/SF o SF/HGF), HEr4 (ErbB4), HIF, Histona desacetilasa 9 (HDAC9), gen Homeobox (HOXB7), Hialuronano (HA), factor de crecimiento semejante a la insulina (IGF), receptor 1 del factor de crecimiento semejante a la insulina (IGF1r, IGF1r, IGF1r, IGF1r), proteína 2 de unión al factor de crecimiento semejante a la insulina (IGFBP2), proteína 5 de unión al factor de crecimiento semejante a la insulina (IGFBP5), cinasa unida a integrina (ILK) receptor de la interleucina (IL6), receptor tipo II de la interleucina 1 (IL1), interleucina 10 (IL10), receptor de la interleucina 4 (IL4), interleucina 6 (IL6), interleucina 15 (IL15), cadena alfa del receptor de la interleucina 3 (IL3r alpha), JAK, JAK3, JNK1, JNK2, proteína quinesina del huso mitótico (KSP), Laminina 5, Lewis (b), receptor beta de la linfotóxina (LT) (LTBr), receptores del ácido lisofosfatídico (LPA) (LPAr), ácido lisofosfatídico aciltransferasa, factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF), MAGE3, microtúbulos, MUC2, Notch 1 (TAN1), proteína cinasa activada por mitógeno P38 (p38 MAPK), mediador de la apoptosis regulado por P53 (PUMA), vía de señalización de la tirosina cinasa (TK) PDGF, homólogo de fosfatasa y tensina (PTEN), fosfatidilinositol 3'cinasa (PI3K), activador del plasminógeno, receptor de urocina (PLAU)(PLAUr), cinasa semejante a Polo 1 (Plk1), Poli (ADP ribosa), polimerasa (PARP), antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA), antígeno de células madre prostáticas (PSCA), antígeno prostático específico (PSA) 773, proteína tirosina fosfatasa (PTP), proteína Rad51, RAF1, receptor alfa del ácido retinoico (RAR), receptor gamma del ácido retinoico (RAR), receptor beta del retinoide X (RXr), inhibidor

de la serina (o cisteína) proteinasa, transcriptasa inversa de la telomerasa (TERT, hTERT), Telómeros, antígeno de Thomsen Friedenreich (TF), Trombospondina 1 (TSP1), Transferrina, factor de necrosis tumoral alfa (TNFa, TNFA), receptor del factor de necrosis tumoral (TNFr, TNFr), anhidrasa carbónica asociada a tumor (CA) IX (CA9), interferón tipo I, ubiquitina ligasa, molécula de adhesión celular vascular 1 (VCAM1, CD106), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, VEGFA), factor de crecimiento endotelial vascular D (VEGFD), Vitronectina (VTN), tumor de Wilms 1 (WT1), etc.

Con respecto a la infección por el VIH, las dianas incluyen VIH-Tat, VIH-Rev, VIH-Vif, VIH-Nef, VIH-Gag, VIH-Env, LTR, CD4, CXCR4 (receptor de quimiocina) y CCR5 (receptor de quimiocina).

Debido a la heterogeneidad de las células tumorales, pueden existir una serie de vías de resistencia a fármacos o resistencia a la apoptosis diferentes operativas en las células que son la diana. Por lo tanto, puede ser necesario con el paso del tiempo cambiar los ácidos nucleicos funcionales utilizados en los métodos de la invención. Por ejemplo, si las muestras de biopsia revelan nuevas mutaciones que dan lugar a una resistencia a los fármacos adquirida, se pueden diseñar ácidos nucleicos funcionales específicos y empaçar en minicélulas intactas que se administran a células huésped de mamífero para enfrentar la resistencia a los fármacos adquirida.

Administración de ácido nucleico funcional a través de minicélulas intactas

La invención permite un método de administración de ácido nucleico funcional, que comprende (a) proporcionar una pluralidad de minicélulas intactas en un portador farmacéuticamente aceptable, donde cada minicélula de la pluralidad contiene ácido nucleico funcional exento de plásmido y (b) poner en contacto las minicélulas de la pluralidad con las células de mamífero de modo que las células de mamífero engullan las minicélulas de la pluralidad, mediante lo cual el ácido nucleico funcional se libera en el citoplasma de las células que son la diana. Las minicélulas se ponen en contacto con la célula de mamífero que es la diana a través de ligandos biespecíficos como se describe en la solicitud PCT publicada WO 05/056749. El contacto entre la minicélula y la célula de mamífero que es la diana puede ser *in vitro* o *in vivo*.

Método para superar la resistencia a los fármacos y tratar la enfermedad

La invención permite además un método para superar la resistencia a los fármacos y el tratamiento de una enfermedad, como cáncer o SIDA, en un sujeto. El método consiste en (a) empaçar en minicélulas intactas purificadas uno o más ácidos nucleicos funcionales que se dirijan a genes o transcritos de las proteínas que promueven la resistencia a los fármacos, (b) poner en contacto las minicélulas que contienen el ácido nucleico funcional con una célula de mamífero que sea la diana, de modo que la célula de mamífero engulla la minicélula, como se describe en la solicitud PCT 749 citada previamente y (c) administrar un fármaco a la célula de mamífero que es la diana, como se describe en la solicitud PCT publicada WO 05/079854. Preferentemente, el paso (c) se realiza después de los pasos (a) y (b), para permitir que el ácido nucleico funcional disminuya la resistencia al fármaco antes de la administración del mismo. La administración del fármaco y la introducción del ácido nucleico funcional se pueden producir consecutivamente, 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 (que incluye las vías subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal y por infusión), tópica, transdérmica o por inhalación. El modo adecuado de administración y dosificación de cada fármaco puede ser determinado fácilmente por los expertos en el área médica.

Administración de fármacos a través de minicélulas

Aunque la administración de fármacos se puede producir por medios convencionales, se prefiere la administración mediante minicélulas, como se describe en la solicitud PCT publicada WO 05/079854. En este sentido, los inventores descubrieron que las mismas células de mamífero pueden volver a ser transinfectadas exitosamente por minicélulas intactas dirigidas que están empaçadas con diferentes cargas útiles. Por ejemplo, minicélulas con ácido nucleico funcional empaçado pueden transinfectar una célula de mamífero, luego de lo cual las minicélulas con fármaco empaçado pueden administrar el fármaco a la misma célula de mamífero para obtener un efecto antitumoral complementario o sinérgico.

El fármaco se puede empaçar en una minicélula diferente del ácido nucleico funcional. Alternativamente, el fármaco se puede empaçar en la misma minicélula que el ácido nucleico funcional. Ciertos fármacos pueden interactuar con ácidos nucleicos e impedir el empaçado conjunto de fármaco y ácido nucleico en la misma minicélula. Por ejemplo, se sabe que la doxorubicina interactúa con el ADN.

Preferentemente, las minicélulas de la invención contienen una cantidad suficiente de fármaco para ejercer el efecto fisiológico o farmacológico de éste en una célula que es la diana. También preferentemente, los fármacos contenidos en las minicélulas son heterólogos, o extraños a las minicélulas, lo que significa que las células

bacterianas progenitoras de las minicélulas normalmente no producen el fármaco.

Tanto los fármacos hidrófilos como hidrófobos se pueden empacar en minicélulas creando un gradiente de concentración del fármaco entre un medio extracelular que contiene las minicélulas y el citoplasma de éstas. Cuando el medio extracelular contiene una mayor concentración de fármaco que el citoplasma de las minicélulas, el fármaco se desplaza naturalmente en sentido descendente del gradiente de concentración, hacia el citoplasma de las minicélulas. Sin embargo, cuando se invierte el gradiente de concentración, el fármaco no se desplaza fuera de las minicélulas. El procedimiento y los mecanismos para la carga de fármaco en las minicélulas es el descrito la solicitud PCT publicada WO 05/079854.

Para cargar minicélulas con fármacos que normalmente no son solubles en agua, los fármacos se pueden disolver inicialmente en un solvente adecuado. Por ejemplo, el paclitaxel se puede disolver en una mezcla 1:1 de etanol y cremophore EL (aceite de ricino polietoxilado), seguido de una dilución en PBS para lograr una solución de paclitaxel que esté parcialmente diluida en medio acuoso y tenga cantidades mínimas del solvente orgánico para asegurar que el fármaco permanece en solución. Las minicélulas se pueden incubar en este medio final para la carga del fármaco. Por lo tanto, los inventores descubrieron que incluso fármacos hidrófobos pueden difundir en el citoplasma de las minicélulas para lograr una carga de fármaco citoplasmática elevada y terapéuticamente significativa. Esto es inesperado porque la membrana de las minicélulas está compuesta de una bicapa fosfolipídica hidrófoba, que se esperaba que impidiera la difusión de moléculas hidrófobas al citoplasma.

Otro método de carga de las minicélulas con un fármaco implica cultivar una célula bacteriana progenitora recombinante en condiciones tales que la célula bacteriana progenitora transcriba y traduzca un ácido nucleico que codifica el fármaco y el fármaco sea liberado en el citoplasma de la célula bacteriana progenitora. Por ejemplo, una agrupación de genes que codifica la vía celular biosintética para un fármaco deseado se puede clonar y transferir a una cepa bacteriana progenitora que sea capaz de producir minicélulas. La transcripción y la traducción genéticas de la agrupación de genes da lugar a la biosíntesis del fármaco dentro del citoplasma de las células bacterianas progenitoras, llenando el citoplasma bacteriano con el fármaco. Cuando la célula bacteriana progenitora se divide y forma la progeie de minicélulas, las minicélulas también contienen el fármaco en su citoplasma. Las minicélulas preempacadas se pueden purificar mediante cualquier proceso de purificación de minicélulas adecuado, incluido el método descrito antes.

Asimismo, otro método de carga de minicélulas con un fármaco implica el cultivo de una minicélula recombinante que contenga un plásmido de expresión que codifique el fármaco en condiciones tales que el gen que codifica el fármaco sea transcrito y traducido dentro de la minicélula.

Fármacos

Los fármacos útiles en la invención pueden ser cualquier principio farmacológica o fisiológicamente activo que produzca un efecto local o sistémico deseado en los animales, especialmente los mamíferos y seres humanos. Los fármacos pueden ser compuestos inorgánicos u orgánicos, incluidos sin limitación, péptidos, proteínas, ácidos nucleicos y moléculas pequeñas, cualquiera de los cuales puede estar caracterizado o sin caracterizar. Pueden estar en diversas formas, como moléculas incambiadas, complejos moleculares, sales farmacológicamente aceptables, 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, como bases, ésteres y amidas. Se puede usar un fármaco que se insoluble en agua en una forma que sea un derivado soluble en agua del fármaco, o como una base derivada de éste, que en cualquier instancia, o mediante su administración, sea convertido por enzimas, hidrolizado por el pH del organismo, o por otros procesos metabólicos, en su forma terapéuticamente activa original.

Los fármacos útiles incluyen antineoplásicos, inmunosupresores, citocinas, citotóxicos, compuestos nucleolíticos, isótopos radioactivos, receptores y enzimas activadoras de profármacos, que pueden ser de origen natural o producidos por métodos de recombinación.

Los fármacos que son afectados por multirresistencia a fármacos clásica tienen particular utilidad en la invención, como los alcaloides de la vinca (por ejemplo, vinblastina y vincristina), las antraciclinas (por ejemplo, doxorubicina y daunorubicina), los inhibidores de la transcripción del ARN (por ejemplo, actinomicina-D) y los fármacos que estabilizan los microtúbulos (por ejemplo, paclitaxel).

En general, los antineoplásicos son fármacos preferidos. Los antineoplásicos útiles incluyen mostazas de nitrógeno, nitrosorueas, etilenimina, sulfonatos de alcano, tetrazina, compuestos de platino, análogos de pirimidina, análogos de purina, antimetabolitos, análogos de folato, antraciclinas, taxanos, alcaloides de la vinca, inhibidores de la topoisomerasa y agentes hormonales. Los ejemplos de antineoplásicos son actinomicina-D, Alkeran, Ara-C, anastrozol, asparaginasa, BiCNU, bicalutamida, bleomicina, busulfán, capecitabina, carboplatino, carboplatino,

5 carmustina, CCNU, clorambucilo, cisplatino, cladribina, CPT-11, ciclofosfamida, citarabina, arabinósido de citosina, citoxano, dacarbazina, dactinomicina, daunorrubicina, dexrazoxano, docetaxel, doxorubicina, DTIC, epirubicina, etilenimina, etopósido, floxuridina, fludarabina, fluorouracilo, flutamida, fotemustina, gemcitabina, Herceptin, hexametilamina, hidroxiourea, 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.

10 Los antineoplásicos útiles también incluyen agentes alquilantes como tiotepa y ciclofosfamida; alquilsulfonatos como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas como benzodopa, carbocadona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamelaminas, incluidas altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilentioposforamida y trimetilolomelamina; mostazas de nitrógeno como clorambucilo, clornafazina, ciclofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, Novembiehin, fenesterina, prednimustina, trofosfámina, mostaza de uracilo; nitroureas como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina y ranimustina; antibióticos como aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, caliqueamicina, carabicina, carminomicina, carcinofilina, cromoinicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina, epirubicina, esorrubicina, idambicina, marcelomicina, mitomicinas, ácido micofenólico, nogalamina, olivomicinas, peplomicina, potfromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina y zorrubicina; antimetabolitos como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos del ácido fólico como denopterina, metotrexato, pteropterina y trimetrexato; análogos de purina como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiampirina y tioguanina; análogos de pirimidina como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina y 5-FU; andrógenos como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestanol, mepitiostano y testolactona; antisuvarrenales tales como aminoglutetimida, mitotano y trilostano; regeneradores del ácido fólico como el ácido frolinico; aceglatona; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diazicuona; elfomitina; acetato de eliptinio; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxiourea; lentinano; lonidamina; mitoguazona; mitoxantrona; mopidamol; nitracrina; pentostatina; fenamet; pirarrubicina; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procarbazona; PSK®; razoxano; sizofirano; espirogermanio; ácido tenuazónico; triazicuona; 2,2',2"-triclortrietilamina; uretano; vindesina; dacarbazona; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxoides, p. ej., paclitaxel (TAXOL®, BristolMyers Squibb Oncology, Princeton, NJ) y doxetaxel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer, Antony, Francia); clorambucilo; gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino 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 las 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, como antiestrógenos, incluidos, por ejemplo, tamoxifeno, raloxifeno, 4(5)-imidazoles inhibidores de aromatasas, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, onapristona y toremifeno (Fareston); y antiandrógenos como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida y goserelina; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

45 Los fármacos útiles también incluyen citocinas. Son ejemplos de dichas citocinas las linfocinas, las monocinas y las hormonas polipeptídicas tradicionales. Entre las citocinas se incluyen las hormonas del crecimiento como la hormona del crecimiento humana, la N-metionil-hormona del crecimiento humana y la hormona del crecimiento bovina; la hormona paratiroidea; la tiroxina; la insulina; la proinsulina; la relaxina; la prorrelaxina; las hormonas glucoproteínicas como la hormona estimulante del folículo (FSH), la hormona estimulante de la tiroides (TSH) y la hormona luteinizante (LH); el factor de crecimiento hepático; el factor de crecimiento de los fibroblastos; la prolactina; el lactógeno placentario; los factores de necrosis tumoral α y β ; la sustancia inhibidora mulleriana; el péptido asociado a la gonadotropina de ratón; la inhibina; la activina; el factor de crecimiento endotelial vascular; la integrina; la trombopoyetina (TPO); los factores de crecimiento nerviosos como el NGF- β ; el factor de crecimiento de plaquetas; los factores de crecimiento transformantes (TGF) como TGF- α y TGF- β ; el factor de crecimiento insulinoide I y II; la eritropoyetina (EPO); los factores osteoinductivos; los interferones como el interferón α , β y γ ; los factores estimulantes de colonias (CSF) como el CSF de macrófagos (M-CSF); el CSF de granulocitos y macrófagos (GM-CSF); y el CSF de granulocitos (G-CSF); las interleucinas (IL) 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 como TNF- α o TNF- β ; y otros factores polipeptídicos, incluidos LIF y el ligando kit (KL). Según se usa en este documento el término citocina incluye proteínas de origen natural u obtenidas por cultivo de células recombinantes y equivalentes biológicamente activos de las citocinas de secuencia nativa.

Los fármacos pueden ser profármacos, activados posteriormente, por ejemplo, por una enzima activadora de profármacos que convierta un profármaco, como un quimioterapéutico peptídico, en un principio activo antineoplásico. Por ejemplo, véase WO 88/07378, WO 81/01145 y la patente de Estados Unidos N° 4,975,278. En

general el componente enzimático incluye cualquiera enzima capaz de actuar sobre un pro fármaco de manera de convertirlo en su forma citotóxica más activa.

Administración dirigida de minicélulas a células de mamífero específicas

5 En un aspecto de la invención, una minicélula se dirige a una célula de mamífero que es la diana a través de un ligando biespecífico como se describe en las solicitudes PCT publicadas WO 056749/05 y 05/079854 WO. El ligando biespecífico, que tiene especificidad por ambos componentes, la minicélula y la célula de mamífero, hace que la minicélula se una a las células de mamífero, de modo que la minicélula sea engullida por la célula de mamífero, mediante lo cual el ácido nucleico funcional se libera en el citoplasma de la célula de mamífero. Este método de administración dirigida se puede realizar *in vivo* o *in vitro*, o tanto *in vivo* como *in vitro*.

15 El contacto entre el ligando biespecífico, la minicélula y la célula de mamífero se puede producir de varias maneras diferentes. Para la administración *in vivo*, es preferible administrar una minicélula que ya tenga el ligando biespecífico unido a ella. Por lo tanto, la minicélula, el ligando biespecífico y la célula que es la diana se ponen todos en contacto cuando la minicélula dirigida por el ligando biespecífico alcanza la célula que es la diana *in vivo*. Alternativamente, el ligando biespecífico y la minicélulas se pueden administrar por separado *in vivo*.

20 El contacto entre los ligandos biespecíficos, las minicélulas y las células de mamífero también se puede producir durante una o más incubaciones *in vitro*. En una realización, los tres elementos se incuban juntos todos a la vez. Alternativamente, se pueden realizar incubaciones paso a paso. En un ejemplo de un método paso a paso, primero se incuban juntos las minicélulas y los ligandos biespecíficos para formar las minicélulas dirigidas por el ligando biespecífico, que después se incuban con las células que son la diana. En otro ejemplo, primero se incuban los ligandos biespecíficos con las células que son la diana, seguido de una incubación con minicélulas. Una combinación de una o más incubaciones *in vitro* y administraciones *in vivo* también puede poner en contacto los ligandos biespecíficos, las minicélulas y las células de mamífero que son la diana.

30 Los inventores encontraron que el método de administración dirigida es ampliamente aplicable a una variedad de células de mamíferos, incluidas las células que normalmente son resistentes a la adhesión específica y la endocitosis de minicélulas. Por ejemplo, ligandos de anticuerpos biespecíficos con especificidad anti-O-polisacárido en un brazo y especificidad anti-receptor HER2 o anti-receptor EGF en el otro brazo unen eficazmente las minicélulas a los receptores respectivos en una diversidad de células no fagocíticas que son la diana. Estas células incluyen las células de cáncer de pulmón, ovario, cerebro, mama, próstata y piel. Además, la unión eficaz precede la endocitosis rápida de las minicélulas por cada una de las células no fagocíticas.

35 Las células de la invención que son la diana incluyen cualquier célula en la cual se va a introducir un ácido nucleico funcional. Las células que son la diana deseables se caracterizan por la expresión de un receptor de superficie celular que, luego de la unión de un ligando, facilita la endocitosis. Las células que se prefieren como diana no son fagocíticas, lo que significa que las células no son fagocitos profesionales, como los macrófagos, las células dendríticas y los linfocitos citolíticos naturales (Natural Killer). Las células preferidas como diana también son de mamífero.

45 Los ligandos útiles en los métodos de administración dirigida de esta invención incluyen cualquier agente que se una a un componente de superficie de una célula que es la diana y a un componente de superficie de una minicélula. Preferentemente, el componente de superficie de una célula que es la diana es un receptor, especialmente un receptor capaz de mediar la endocitosis. Los ligandos pueden contener un componente polipéptido y/o carbohidrato. Los anticuerpos son los ligando preferidos. Por ejemplo, un anticuerpo biespecífico que tenga especificidades duales para un componente de superficie de minicélulas intactas de origen bacteriano y un componente de superficie de células de mamífero que son la diana, se puede utilizar eficazmente para la administración dirigida de minicélulas a las células de mamífero que son la diana *in vitro* e *in vivo*. Los ligandos útiles también incluyen receptores, enzimas, péptidos de unión, proteínas de fusión/quiméricas y moléculas pequeñas.

55 La elección de un ligando particular se realiza sobre dos criterios principales: (i) unión específica a uno o más dominios en la superficie de minicélulas intactas y (ii) unión específica a uno o más dominios en la superficie de las células que son la diana. Por lo tanto, los ligandos tienen preferentemente un primer brazo con especificidad por una estructura de superficie de una minicélula intacta de origen bacteriano y un segundo brazo que tiene especificidad por una estructura de superficie de una célula de mamífero. Cada uno de los primero y segundo brazos puede ser multivalente. Preferentemente, cada brazo es monoespecífico, incluso si es multivalente.

60 Para unir minicélulas de origen bacteriano, es deseable que un brazo del ligando sea específico para el componente O-polisacárido de un lipopolisacárido que se encuentra en la célula bacteriana progenitora. Otras estructuras superficiales de la minicélula que puedan ser explotadas para la unión del ligando incluyen polipéptidos expuestos a la superficie celular y carbohidratos de las membranas externas, como proteínas de las membranas externas, pilosidades, fimbrias, flagelos y segmentos peptídicos expuestos en la superficie celular.

Para la unión a las células que son la diana, un brazo del ligando es específico para un componente de superficie de una célula de mamífero. Dichos componentes incluyen proteínas péptidos y carbohidratos de la superficie celular ya sean caracterizados o sin caracterizar. Los receptores de la superficie celular especialmente los capaces de activar la endocitosis mediada por receptor, son componentes de la superficie celular deseables como dianas. Dichos receptores, si se sobreexpresan en la superficie de la célula que es la diana, confieren selectividad adicional para la administración dirigida a las células que se van a tratar, reduciendo así la posibilidad de la administración a células que no son la diana.

A modo de ejemplo, se puede atacar células tumorales, células metastásicas, células de la vasculatura, como células endoteliales y células del músculo liso, células pulmonares, células renales, glóbulos, células de la médula ósea, células cerebrales, células hepáticas, etc., o precursores de cualquier célula seleccionada mediante la elección de un ligando que se una específicamente a un motivo del receptor de la superficie celular en las células deseadas. Los ejemplos de receptores de la superficie celular incluyen el antígeno carcinoembrionario (CEA), que se sobreexpresa en la mayoría de los 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 el cáncer de mama, ovario, colon, pulmón, próstata y de cuello uterino (Hung *et al.*, 2000); el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), que se expresa mucho en una diversidad de tumores sólidos, como los de mama, cabeza y cuello, de pulmón no microcíticos y de próstata (Salomon *et al.*, 1995); el receptor de asialoglucoproteína (Stockert, 1995); el receptor de transferrina (Singh, 1999); el receptor del complejo enzimático de las serpinas, que se expresa en los hepatocitos (Ziady *et al.*, 1997); el receptor del factor de crecimiento de los fibroblastos (FGFR), que se sobreexpresa en las células del adenocarcinoma ductal pancreático (Kleeff *et al.*, 2002); el receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR), para la genoterapia antiangiogénica (Becker *et al.*, 2002 y Hoshida *et al.*, 2002); el receptor de folato, que se sobreexpresa selectivamente en el 90% de los carcinomas de ovario no mucinosos (Gosselin y Lee, 2002); el glucocáliz de la superficie celular (Batra *et al.*, 1994); los receptores de carbohidratos (Thurnher *et al.*, 1994); y el receptor de inmunoglobulinas polimérico, que es útil para la administración génica a células epiteliales respiratorias y atractivo para el tratamiento de enfermedades pulmonares como la fibrosis quística (Kaetzel *et al.*, 1997).

Los ligandos preferidos son los anticuerpos y/o derivados de anticuerpos. Según se usa en este documento, el término "anticuerpo" abarca una molécula de inmunoglobulina obtenida mediante generación *in vivo* o *in vitro* de una respuesta inmunógena. El término "anticuerpo" incluye anticuerpos policlonales, monoespecíficos y monoclonales, así como derivados de anticuerpos, como los fragmentos de anticuerpo monocatenarios (scFv). Los anticuerpos y los derivados de anticuerpos útiles en la presente invención también se pueden obtener por técnicas de recombinación del ADN.

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 contienen un dominio de unión al antígeno que reconoce un epítipo específico. Las regiones del dominio de unión al antígeno que participan más directamente en la unión del anticuerpo son las "regiones determinantes de la complementariedad" (CDR).

El término "anticuerpo" también abarca derivados de anticuerpos, como fragmentos de anticuerpos que mantienen la capacidad de unirse específicamente a antígenos. Dichos fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos Fab (un fragmento que contiene el dominio de unión al 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 al antígeno que comprende un Fab y una porción adicional de la cadena pesada a través de la región bisagra), F(ab')₂ (dos moléculas Fab' unidas por puentes disulfuro intercatenarios en las regiones bisagra de las cadenas pesadas), un Fab biespecífico (una molécula Fab que tiene dos dominios de unión al antígeno, cada uno de los cuales se puede dirigir a un epítipo diferente) y un scFv (la región variable que determina la unión al antígeno de una sola cadena ligera y pesada de un anticuerpo unidas entre sí por una cadena de aminoácidos).

Cuando los anticuerpos, incluidos los fragmentos de anticuerpos, constituyen parte o la totalidad de los ligandos, preferentemente son de origen humano o se modifican para ser aptos para uso en seres humanos. Los denominados "anticuerpos humanizados" son bien conocidos en el área. Véase, por ej., Osbourn *et al.*, 2003. Fueron modificados por manipulación genética y/o tratamiento *in vitro* para reducir su antigenicidad en un ser humano. Los métodos para humanizar anticuerpos se describen, por ej., en las patentes de Estados Unidos N° 6,639,055, N° 5,585,089 y N° 5,530,101. En el caso más simple, los anticuerpos humanizados se forman mediante injerto de bucles de unión al antígeno, conocidos como regiones determinantes de la complementariedad (CDR), de un mAb de ratón en una IgG humana. Véanse Jones *et al.*, 1986; Riechmann *et al.*, 1988; Verhoeyen *et al.*, 1988. Sin embargo, la generación de anticuerpos humanizados de alta afinidad generalmente requiere la transferencia de uno o más residuos adicionales de las regiones denominadas marco (FR) del mAb original de ratón. También se han desarrollado varias variantes de la tecnología de humanización. Véase Vaughan *et al.*, 1998.

También se pueden usar en la invención 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 biespecíficos que, típicamente, son polipéptidos recombinantes que consisten en una porción de cadena ligera variable unida covalentemente a través de una molécula conectora a la porción de cadena pesada variable correspondiente. Véanse las patentes de EE. UU. N° 5,455,030, N° 5,260,203 y N° 4,496,778. Los anticuerpos biespecíficos también se pueden preparar por otros métodos. Por ejemplo, se pueden crear heteroconjugados químicos mediante unión química de anticuerpos intactos o fragmentos de anticuerpos de diferentes especificidades. Véase Karpovsky *et al.*, 1984. No obstante, dichos heteroconjugados son difíciles de preparar de manera reproducible y son al menos dos veces más grandes que los anticuerpos monoclonales normales. Los anticuerpos biespecíficos también se pueden crear por intercambio de disulfuro, que implica la escisión enzimática y la reasociación de los fragmentos de anticuerpo. Véase Glennie *et al.*, 1987.

Debido a que los fragmentos Fab y scFv son monovalentes a menudo tienen baja afinidad por estructuras que son la diana. Por lo tanto, los ligandos preferidos 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. Dichas estructuras conjugadas se pueden crear por entrecruzamiento químico y/o genético.

Los ligandos biespecíficos de la invención son preferentemente monoespecíficos en cada extremo, es decir, específicos para un solo componente de las minicélulas en un extremo y específicos para un solo componente en las células que son la diana en el otro extremo. Los ligandos pueden ser multivalentes en uno o ambos extremos, por ejemplo, en la forma de los denominados diacuerpos, triacuerpos y tetracuerpos. Véase Hudson y Souriau, 2003. Un diacuerpo es un dímero bivalente formado por una asociación no covalente de dos scFvs, que produce dos sitios de 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.

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

También se pueden fusionar las regiones variables de los anticuerpos a una amplia variedad de dominios proteínicos. La fusión a dominios de inmunoglobulina humana como CH3 de IgG1 agregan masa y promueven 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 biespecíficas (Kostelny *et al.*, 1992) y, alternativamente, se pueden modificar genéticamente dominios de homodimerización para formar heterodímeros por estrategias de manipulación genética como la de "botón en ojal" (Ridgway *et al.*, 1996). Por último, se pueden seleccionar compañeros de proteínas de fusión que proporcionen tanto multimerización como una función adicional, por ej., la estreptavidina. Véase Dubel *et al.*, 1995.

Administración a células competentes para la fagocitosis o la endocitosis

La invención proporciona además la administración poniendo en contacto minicélulas de origen bacteriano con células de mamífero que son competentes para la fagocitosis o la endocitosis. Dichas células de mamífero, que son capaces de engullir células bacterianas progenitoras de la manera de los patógenos bacterianos intracelulares, engullen asimismo las minicélulas que liberan su carga útil en el citoplasma de las células de mamífero. Este método de administración se puede efectuar sin el uso de ligandos que dirijan.

Diversos mecanismos pueden estar implicados en el proceso de engullir minicélulas por un determinado tipo de célula, 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, como los neutrófilos, ingieren partículas al extender pseudópodos sobre la superficie de la partícula hasta envolver la partícula por completo. Aunque se ha descrito como fagocitosis "inespecífica" se ha demostrado que participan en el proceso receptores específicos. Véase Wright *et al.*, (1986); Speert *et al.*, (1988).

Por lo tanto, una forma de fagocitosis implica la interacción entre ligandos de superficie y receptores de ligandos ubicados en las membranas de los pseudópodos. Se cree que este paso de unión, mediado por los receptores específicos, depende de las adhesinas bacterianas de superficie. Con respecto a las bacterias menos virulentas, tales como la *E. coli* no enterotoxigénica, la fagocitosis también se puede producir en ausencia de ligandos de superficie para los receptores de fagocitos. Véase, por ejemplo, Pikaar *et al.* (1995). Por lo tanto, la presente invención abarca, pero no exclusivamente, el uso de minicélulas que poseen o carecen de adhesinas superficiales, de acuerdo con la naturaleza de las células bacterianas progenitoras, y que son engullidas por fagocitos (es decir, células huésped "competentes para la fagocitosis"), de las cuales los neutrófilos y macrófagos son los tipos principales en los mamíferos.

Otro proceso por el que se engulle es la endocitosis, mediante la cual 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 receptor dependiente de clatrina, también conocida como "endocitosis de fosa cubierta" (Riezman, 1993), y la endocitosis independiente de clatrina (Sandvig y Deurs, 1994). Cualquiera de ellas o ambas pueden estar implicadas cuando una célula competente para engullir que actúa por endocitosis (es decir, una célula huésped "competente para la endocitosis") engulle minicélulas de conformidad con la invención. Son células competentes para la endocitosis, 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 engullir sin el uso de un ligando que dirija, la naturaleza de la aplicación contemplada influirá en la elección de la fuente bacteriana para las minicélulas empleadas. Por ejemplo, las especies *Salmonella*, *Escherichia* y *Shigella* son portadoras de adhesinas que son reconocidas por los receptores que median la endocitosis en los enterocitos del tubo gastrointestinal y pueden ser adecuadas para administrar un fármaco que sea eficaz contra las células de cáncer de colon. De manera similar, las minicélulas derivadas de *Helicobacter pylori*, portadoras de adhesinas específicas para las células epiteliales del estómago, podrían ser adecuadas para la administración dirigida a las células de cáncer de estómago. La inhalación o la insuflación pueden ser ideales para administrar minicélulas intactas derivadas de una especie de *Pseudomonas* portadora de adhesinas que son reconocidas por los receptores de las células epiteliales pulmonares. Las minicélulas derivadas de *Lactobacilli*, portadoras de adhesinas específicas para las células epiteliales de las vías urinarias y la vejiga, podrían ser adecuadas para la administración intrauretral de un fármaco a cáncer de vías urinarias o de vejiga.

Formulaciones

Como se indicó, en un aspecto se proporciona una composición que contiene (a) una pluralidad de minicélulas intactas de origen bacteriano, en donde cada minicélula de dicha pluralidad contiene ARN regulador que está empacado en dichas minicélulas y (b) un portador farmacéuticamente aceptable para ellas, donde hay una ausencia en dichas minicélulas de un constructo para la expresión *in situ* de dicho ARN regulador, donde dicho ARN regulador se elige del grupo que consiste en ARN_{ip}, ARN_{mi} y ARN_{hc} y donde dicha pluralidad contiene una cantidad terapéuticamente eficaz de dicho ARN regulador.

La formulación contiene opcionalmente un fármaco. En un ejemplo, la minicélula de la formulación contiene el fármaco, en tanto en otro la minicélula puede contener una molécula de ácido nucleico, como un plásmido, que codifica el fármaco.

Las formulaciones también contienen opcionalmente un ligando biespecífico para la administración dirigida de la minicélula a una célula que es la diana. La minicélula y el ligando pueden ser cualquiera de los descritos en este documento. Por consiguiente, la minicélula contiene un ácido nucleico que codifica un ácido nucleico funcional y el ligando biespecífico es preferentemente capaz de unirse a un componente de superficie de la minicélula y a un componente de superficie de la célula de mamífero que es la diana.

Las formulaciones se pueden presentar en formas farmacéuticas unitarias, por ejemplo, en ampollas o viales o en recipientes multidosis, con o sin conservante añadido. La formulación puede ser una solución, una suspensión o una emulsión en vehículos acuosos u oleosos, y puede contener agentes de formulación, como suspendentes, estabilizantes y/o dispersantes. Una solución adecuada es isotónica con la sangre del receptor y se ilustra mediante solución salina, solución de Ringer y solución de dextrosa. Alternativamente, la formulaciones pueden estar en forma de polvo liofilizado para la reconstitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua apirógena estéril o suero fisiológico. Las formulaciones también pueden estar en forma de una preparación en depot. Dichas formulaciones de acción prolongada se pueden administrar mediante implantación (por ejemplo, subcutáneamente o intramuscularmente) o mediante inyección intramuscular.

Vías de administración

Las formulaciones descritas en este documento se pueden administrar por diferentes vías y en diversos sitios en el cuerpo de un mamífero, para lograr los efectos terapéuticos deseados, ya sea local o sistémicamente. La administración se puede lograr, por ejemplo, mediante 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 que son la diana. Por ejemplo, las células de fibrosis quística pueden ser eficazmente atacadas por administración inhalada de las minicélulas dirigidas. De manera similar, las metástasis tumorales pueden ser tratadas más eficazmente por administración intravenosa de las minicélulas dirigidas. El cáncer de ovario primario se puede tratar por administración intraperitoneal de minicélulas dirigidas.

Pureza

En un aspecto, las minicélulas están sustancialmente exentas de células bacterianas progenitoras contaminantes. Por lo tanto, las formulaciones que contienen minicélulas contienen preferentemente menos de aproximadamente 1 célula bacteriana progenitora contaminante cada 10^7 minicélulas, más preferentemente contienen menos de aproximadamente 1 célula bacteriana progenitora contaminante cada 10^8 minicélulas, incluso más preferentemente contienen menos de aproximadamente 1 célula bacteriana progenitora contaminante cada 10^9 minicélulas, todavía más preferentemente contienen menos de aproximadamente 1 célula bacteriana progenitora contaminante cada 10^{10} minicélulas y muy preferentemente contienen menos de aproximadamente 1 célula bacteriana progenitora contaminante cada 10^{11} minicélulas.

Los métodos de purificación de minicélulas son conocidos en el área y se describen en la publicación internacional número WO03/033519. Uno de dichos métodos combina filtración de flujo cruzado (el flujo de alimentación es paralelo a la superficie de una membrana; Forbes, 1987) y filtración sin salida (el flujo de alimentación es perpendicular a la superficie de la membrana). Opcionalmente, la combinación de filtración puede estar precedida por una centrifugación diferencial, a baja fuerza centrífuga, para eliminar parte de las células bacterianas y así enriquecer el sobrenadante en minicélulas.

Otro método de purificación emplea la centrifugación por gradiente de densidad en un medio biológicamente compatible. Luego de la centrifugación, se recoge una banda de minicélulas del gradiente, y opcionalmente, las minicélulas se someten a otras rondas de centrifugación por gradiente de densidad para maximizar su pureza. El método puede incluir además un paso preliminar de realización de una centrifugación diferencial en la muestra que contiene las minicélulas. Cuando se realiza a una fuerza centrífuga baja, la centrifugación diferencial eliminará una parte de las células bacterianas progenitoras, enriqueciendo así el sobrenadante en minicélulas.

Métodos de purificación particularmente eficaces explotan la filamentación bacteriana para aumentar la pureza de las minicélulas. Por lo tanto un método de purificación de minicélulas puede incluir los pasos de (a) someter una muestra que contenga minicélulas a una condición que induzca a las células bacterianas progenitoras a adoptar una forma filamentosa, seguido de (b) filtración de la muestra para obtener una preparación de minicélulas purificada.

También se pueden combinar métodos de purificación de minicélulas conocidos. Una combinación sumamente eficaz de los métodos es la siguiente:

Paso A: centrifugación diferencial de un cultivo celular bacteriano que produce minicélulas. Este paso, que se puede realizar a 2000 g durante aproximadamente 20 minutos, elimina la mayor parte de las células bacterianas progenitoras dejando las minicélulas en el sobrenadante.

Paso B: centrifugación por gradiente de densidad utilizando un medio de gradiente de densidad isotónico y atóxico. Este paso separa las minicélulas de muchos contaminantes, incluidas las células bacterianas progenitoras, con mínima pérdida de minicélulas. Preferentemente, este paso se repite dentro de un método de purificación.

Paso C: filtración de flujo cruzado a través de un filtro de $0.45 \mu\text{m}$ para reducir aún más la contaminación con células bacterianas progenitoras.

Paso D: filamentación inducida por estrés de las células bacterianas progenitoras restantes. Esto se puede llevar a cabo sometiendo la suspensión de minicélulas a cualquiera de diversas condiciones ambientales que inducen estrés.

Paso E: tratamiento antibiótico para eliminar las células bacterianas progenitoras.

Paso F: filtración de flujo cruzado para eliminar los contaminantes pequeños, como ampollas de membrana, fragmentos de membranas, desechos bacterianos, ácidos nucleicos, componentes del medio y demás, y para concentrar las minicélulas. Se puede emplear un filtro de $0.2 \mu\text{m}$ para separar las minicélulas de los contaminantes pequeños y un filtro de $0.1 \mu\text{m}$ para concentrar las minicélulas.

Paso G: filtración sin salida para eliminar las células bacterianas filamentosas muertas. Se puede emplear un filtro de 0.45 µm para este paso.

- 5 Paso H: eliminación de endotoxina de la preparación de minicélulas. Se pueden emplear perlas magnéticas recubiertas con antilípido A para este paso.

Cronograma de administración

10 En general, las formulaciones dadas a conocer en este documento se pueden utilizar en las dosis adecuadas definidas por pruebas de rutina, para obtener un efecto fisiológico óptimo, minimizando cualquier toxicidad potencial. El régimen de dosificación se puede elegir de conformidad con diversos factores que incluyen la edad, el peso, el género, la afección médica del paciente, la gravedad de la afección que se va a tratar, la vía de administración, y la función renal y hepática del paciente.

15 La precisión óptima para lograr las concentraciones de minicélulas y fármacos dentro del intervalo que produce la máxima eficacia con mínimos efectos secundarios puede requerir un régimen basado en la cinética del ácido nucleico funcional y la disponibilidad del fármaco para los sitios que son la diana y las células que son la diana. La distribución, el equilibrio y la eliminación de una minicélula o un fármaco pueden ser tenidos en cuenta cuando se determina la concentración óptima para un régimen de tratamiento. Las dosis de las minicélulas y los fármacos se pueden ajustar cuando se usan en combinación, para lograr los efectos deseados.

20 Por otra parte, la administración de la dosis de las formulaciones se puede optimizar utilizando un sistema de modelado farmacocinético/farmacodinámico. Por ejemplo, se pueden elegir uno o más regímenes de dosificación y utilizar un modelo farmacocinético/farmacodinámico para determinar el perfil farmacocinético/farmacodinámico de uno o más regímenes de dosificación. A continuación, se puede elegir uno de los regímenes de dosificación para la administración que logre la respuesta farmacocinética/farmacodinámica deseada basándose en el perfil farmacocinético/farmacodinámico particular. Véase, por ej., WO 00/67776. En este sentido, se puede determinar un régimen de dosificación para cualquier indicación empleando el método y el modelo descritos en este documento en el ejemplo 6, modificado para la célula particular de interés.

25 Específicamente, las formulaciones se pueden administrar al menos una vez por semana en el transcurso de varias semanas. En una realización, las formulaciones se administran al menos una vez por semana durante varias semanas a varios meses.

35 Más específicamente, las formulaciones 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. Alternativamente, las formulaciones 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.

40 Las formulaciones se pueden administrar alternativamente aproximadamente una vez por 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. Alternativamente, las formulaciones se pueden administrar al menos una vez por semana durante aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 semanas o más.

45 Alternativamente, las formulaciones se pueden administrar aproximadamente una vez por mes, aproximadamente una vez cada 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 meses o más.

50 Las formulaciones se pueden administrar en una única dosis diaria, o la dosis diaria total se puede administrar en dosis fraccionadas dos, tres o cuatro veces al día.

55 En un método en el cual las minicélulas se administran antes que un fármaco, la administración del fármaco puede tener lugar en cualquier momento desde varios minutos hasta varias horas después de la administración de las minicélulas. El fármaco se puede administrar alternativamente en cualquier momento desde varias horas hasta varios días, posiblemente desde varias semanas hasta varios meses después de las minicélulas.

60 Más específicamente, las minicélulas con ácido nucleico funcional empacado 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. Por otra parte, las minicélulas 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 que la administración del fármaco. Aún en otra realización, las minicélulas 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 otra realización, las minicélulas se pueden administrar al menos aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 meses antes que

el fármaco.

En otra realización, la minicélula se administra después que el fármaco. La administración de la minicélula se puede realizar en cualquier momento desde varios minutos hasta varias horas después de la administración del fármaco. La minicélula se puede administrar alternativamente en cualquier momento desde varias horas hasta varios días, posiblemente desde varias semanas hasta varios meses después que el fármaco.

Los ejemplos siguientes son sólo ilustrativos, en vez de limitantes, y proporcionan una comprensión más completa de la invención.

Ejemplos

1. Empacado directo de ARN regulador en minicélulas intactas *in vitro*

Se prepararon y purificaron minicélulas intactas de origen bacteriano como se describe en la solicitud de patente de Estados Unidos publicada N° US 2004/0265994. Se obtuvo ARNip de glicerolaldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) marcado con Cy3 (máximo de excitación ($\lambda_{\text{máx}}$) 547 nm, máximo de emisión ($\lambda_{\text{máx}}$) 563 nm), producto de Ambion (Austin, Texas EE.UU.), y se reconstituyó en agua exenta de nucleasa hasta una concentración final de 50 μM .

Se resuspendieron aproximadamente 10^7 minicélulas en solución tampón de fosfato (PBS) 1x (Gibco) y se coincubaron con ARNip de GAPDH marcado con Cy3 1 μM . La incubación se llevó a cabo durante 2 horas a 37 °C con agitación suave. Se simuló la carga de minicélulas de control por incubación con 1 x PBS solo. Después de la carga las minicélulas se sedimentaron y se lavaron dos veces con PBS 1x por centrifugación durante 10 minutos a 16 200 x g. Las minicélulas experimentales y de control se observaron bajo un microscopio de fluorescencia DMLB, producto de Leica (Alemania) equipado con una cámara D70, producto de Olympus Microscopes (Alemania). Las imágenes se adquirieron usando un objetivo de inmersión de aceite 100 x.

Los experimentos de coincubación anteriores también se llevaron a cabo bajo diferentes condiciones experimentales como la incubación a temperatura ambiente, 37 °C y 4 °C. Además, los tiempos de coincubación se variaron para incluir 1 hora, 2 horas, 4 horas y 12 horas, respectivamente.

Como se muestra en la figura 1B, las moléculas de ARNip intactas difundieron rápidamente al interior de las minicélulas. La incubación de 2 horas a 37 °C fue suficiente para lograr un empacado significativamente alto de las minicélulas.

Para determinar si las moléculas de ARNip estaban dentro de las minicélulas o adheridas a la superficie de las minicélulas, las minicélulas con ARNip marcado con Cy3 fluorescente se incubaron con exonucleasas durante la noche, seguido de repetición de microscopía de fluorescencia. Los resultados fueron idénticos a los que se muestran en la figura 1B, lo que indica que los ARNip fueron internalizados por las minicélulas y no se adhirieron a la superficie de éstas.

2. Transfección *in vitro* de células de cáncer de mama humano con minicélulas con ARN empacado dirigidas por anticuerpo biespecífico

Para demostrar que las minicélulas que tenían ARN regulador eran estables en suero *in vitro* y que podían ser internalizadas por células de mamífero a las que eran específicamente dirigidas, se realizó el experimento siguiente.

Se sintetizó ARNip dirigido a polo-cinasa 1 (Plk1) con una secuencia que es la diana 5'-GGTGGATGTGGTCCATTTT-3', y se marcó con un marcador (tag) fluorescente, AlexaFluor 488. Las polo-cinasas tienen múltiples funciones durante la entrada en la mitosis, la maduración del centrosoma, la formación del huso bipolar, la segregación de cromosomas y la citocinesis y, crucialmente, la vigilancia de la fidelidad del control del punto de inspección (Glover *et al.*, 1998; Barr *et al.*, 2004; van de Weerd y Medema 2006). En los seres humanos, Plk1 es el miembro mejor caracterizado de esta familia. Plk1 se asocia a la tumorigénesis y pertenece a la familia de las serina/treonina cinasas, que representan dianas atractivas para nuevos antineoplásicos. En consecuencia, Plk1 se considera una diana prometedora para el desarrollo de fármacos contra el cáncer (Strebhardt y Ullrich, 2006).

Se purificaron las minicélulas y 10^9 minicélulas se empacaron con anti-^{AF488}Plk1 ARNip, como se describe en el ejemplo 1. Se preparó un anticuerpo biespecífico (BsAb) portador de especificidades antígeno O anti-S. typhimurium y anti-EGFR humano, que se unió a las minicélulas^{AF488-PIK1-ARNip} como se describió en la solicitud PCT publicada WO 05/056749. Las minicélulas resultantes se designaron ^{EGFR}minicélulas^{AF488-PIK1-ARNip}. Estas minicélulas (10^9) se incubaron con células de cáncer de mama humano, en cultivo tisular, a una densidad de 10 000 minicélulas:1 célula tumoral. La incubación se llevó a cabo durante 1 hora, 2 horas, 4 horas y 24 horas. En cada uno de esos momentos,

las células se recogieron y se tñeron con DAPI (colorante nuclear azul fluorescente). Las células se observaron utilizando el microscopio confocal IX81(Olympus) y el software CellR.

En 1 hora las minicélulas portadoras de ARNip fluorescentes se habían adherido a las células MDA-MB-468 (véase Figura 2). Esta unión se debió, se cree, a la unión al BsAb unido a las minicélulas, que se dirigió al receptor EGF en las células MDA-MB-468, puesto que las minicélulas_{AF488-PIK1-ARNip} no dirigidas en la incubación de control se lavaron y no mostraron ninguna fluorescencia verde asociada a las células MDA-MB-468. A las 2 horas post incubación, las minicélulas_{EGFR-PIK1-ARNip} se internalizaron en las células MDA-MB-468 y mostraron fluorescencia verde intensa. A las 24 horas la mayor parte de la fluorescencia verde había desaparecido, indicando que las minicélulas internalizadas se habían roto, presumiblemente dentro de los fagolisosomas.

3. Extracción y cuantificación de ARNip de minicélulas intactas

Dado que el ARNip no se produce naturalmente en las células bacterianas ni en las minicélulas de origen bacteriano, no es de extrañar que no exista ninguna metodología establecida para la extracción de ARNip de dichas partículas. En consecuencia, los inventores de la presente desarrollaron un método para la extracción cuantitativa de los ARNip que están empacados en minicélulas intactas, de conformidad con la invención.

La proteína quinesina del huso mitótico (KSP), también conocida como "quinesina-5" y "Eg5," es una proteína motora asociada a los microtúbulos. Es esencial para la formación de husos bipolares y la segregación adecuada de cromátidas hermanas durante la mitosis (Enos y Morris, 1990; Blangy *et al.*, 1995; Sawin y Mitchison, 1995; Dagenbach y Endow, 2004). La inhibición de KSP causa la formación de husos mitóticos monopolares, activa el punto de control del ensamblaje del huso y detiene a las células en la mitosis, conduciéndolas a la subsiguiente muerte celular (Blangy *et al.*, 1995; Caner *et al.*, 1999; Kapoor *et al.*, 2000; Tao *et al.*, 2005).

Se eligió un ARNip contra KSP para el empacado en minicélulas, para informar la optimización de la extracción de ARNip de las minicélulas según la invención. Más específicamente, se sintetizaron las secuencias de oligonucleótidos bicatenarios KSP-1-ARNip (hebra sentido; 5'-AAC TGG ATC GTA AGA AGG CAG-3') y se empacaron en minicélulas, conforme a los procedimientos establecidos en el ejemplo 1, supra.

Se procesaron minicélulas_{ARNip-KSP} (10^{10}) y una cantidad semejante de minicélulas de control vacías, empleando una serie de kits de extracción de ácido nucleico disponibles en el comercio. Los resultados mostraron que el kit de aislamiento de ARNmi mirVana (Ambion) proporcionó la extracción cuantitativa de ARNip-KSP de las minicélulas intactas. El procedimiento se llevó a cabo según las instrucciones del fabricante.

El ARNip purificado se tñó primero con un colorante de ácido nucleico fluorescente ultra sensible, RiboGreen™, producto de Molecular Probes Inc. (Eugene, Oregon EE.UU.), seguido de la cuantificación usando el fluoroespectrómetro NanoDrop ND-3300, producto de NanoDrop Technologies Inc. (Wilmington, Delaware EE.UU.), también según las instrucciones del fabricante. El RiboGreen™ unido a ARN tiene un máximo de excitación de ~ 500 nm y un máximo de emisión de ~ 525 nm.

Los resultados mostraron que las minicélulas fueron capaces de portar ARNip. 10^{10} minicélulas vacías portaron ~1.4 µg de ARN, presumiblemente un nivel de fondo de ARN bacteriano formado endógenamente. El mismo número de minicélulas_{ARNip-KSP} portó ~2.7 µg de ARN, que contenía ARN bacteriano endógeno más ARNip-KSP empacado exógenamente. Por lo tanto, estos datos demuestran que 10^{10} minicélulas pueden empacar al menos ~1.3 µg de ARNip empacado exógenamente.

4. Demostración *in vivo* de efectos antitumorales logrados con ARN empacado en minicélulas

Se realizaron los estudios siguientes para demostrar que minicélulas con ARN regulador empacado podrían administrar ARN regulador intacto en concentraciones terapéuticamente eficaces a células tumorales *in vivo*.

Se eligió ARNip contra KSP, como se describe en el ejemplo 3, para empacar en las minicélulas de acuerdo con la presente invención. Se purificaron minicélulas, y 10^9 minicélulas se empacaron con ARNip anti-KSP, como se describe en el ejemplo 1. También se preparó un BsAb y se unió a las minicélulas_{ARNip-KSP}, como se describe en el ejemplo 2, para generar minicélulas_{EGFR-ARNip-KSP}.

Los ratones utilizados en este ejemplo se compraron a Animal Resources Centre (Perth, WA, Australia), y todos los experimentos con animales se llevaron a cabo cumpliendo con las pautas de atención y uso de animales de laboratorio, con la aprobación del Comité de ética para la experimentación animal. Los experimentos se realizaron en las instalaciones para animales pequeños acreditadas por NSW Agriculture en EnGenelC Pty Ltd (Sydney, Nueva Gales del Sur, Australia).

Se cultivaron células de cáncer de mama humano (MDA-MB-468, ATCC) en cultivo tisular en medio RPMI 1640

complementado con 5% de suero fetal bovino GIBCO-BRL, producto de Invitrogen Corporation (Carlsbad, California EE.UU.), y glutamina (Invitrogen) en atmósfera humedecida de 95% de aire y 5% de CO₂ a 37 °C. 1 x 10⁶ células en 50 µl de medio exento de suero se mezclaron junto con 50 µl de matrigel de factor de crecimiento reducido, producto de BD Biosciences (Franklin Lakes, Nueva Jersey EE.UU.). Por medio de una aguja de calibre 23, las células se inyectaron por vía subcutánea entre los omóplatos de cada ratón. Los tumores se midieron dos veces por semana, usando calibrador digital electrónico (precisión de 0.001), producto de Mitutoyo (Japón) y se calculó la media del volumen del tumor empleando la fórmula: longitud (mm) x ancho² (mm) X 0.5 = volumen (mm³).

Los diversos tratamientos comenzaron una vez que los tumores alcanzaron volúmenes entre 170 mm³ y 200 mm³, y los ratones se distribuyeron aleatoriamente en dos grupos diferentes de ocho por grupo. El grupo de control 1 recibió solución salina estéril, en tanto el grupo experimental 2 recibió ^{EGFR}minicélulas_{ARNip-KSP} (10⁹), cuatro veces por semana.

Como se muestra en la figura 3, ^{EGFR}minicélulas_{ARNip-KSP} proporcionaron un efecto antitumoral altamente significativo en comparación con los controles de solución salina. Los resultados demuestran que (a) los ARNip fueron estables dentro de las micéculas *in vivo*, (b) se administraron ARNip intactos y totalmente funcionales a las células tumorales *in vivo*, y (c) las micéculas administraron concentraciones terapéuticamente eficaces de ARNip a las células tumorales *in vivo*.

5. Demostración de terapia contra el cáncer a medida mediante tratamiento con ARN empacado en micéculas, seguido de fármaco empacado en micéculas

La mayor parte de las terapias contra el cáncer se asocian a resistencia a los fármacos. Lo mismo es cierto para tratamientos con ARN regulador, dado que las mutaciones genéticas en las células tumorales pueden tornar ineficaz el ARN regulador si el gen que es la diana muta dentro de la secuencia a la que se dirige el ARN regulador.

No ha habido ninguna estrategia eficaz para encarar la resistencia a los fármacos en pacientes con cáncer. En cambio, deben administrarse nuevos fármacos para evitar la mutación. No obstante, este método enfrenta serias dificultades puesto que la mayoría de los antineoplásicos son sumamente tóxicos y las terapias combinadas aumentan esa toxicidad, resultando en la limitación de la dosis y el frecuente abandono de la terapia cuando el paciente ya no puede hacer frente a la toxicidad. El estudio siguiente se condujo para evaluar la eficacia del ARN empacado en micéculas para enfrentar dicha resistencia.

Como se describió antes, se purificaron micéculas y se empacaron (10⁹) con ARNip anti-KSP o anti-Pik1. También como se describió previamente se preparó un anticuerpo biespecífico (BsAb) portador de especificidades O-antígeno anti-*S. typhimurium* y anti-EGFR humano, que se unió a las micéculas_{ARNip-KSP} para generar ^{EGFR}micéculas_{ARNip-KSP}.

Se establecieron xenoinjertos de cáncer de colon humano (HCT116; ATCC) en ratones atímicos, como se describe en el ejemplo 3, y se trataron i.v. de la manera siguiente: los ratones del grupo 1 recibieron solución salina estéril, y los ratones de los grupos 2, 3 y 4 se trataron en las primeras 10 dosis (véase Figura 4) con 10⁹ ^{EGFR}micéculas_{ARNip-Pik1}, ^{EGFR}micéculas_{ARNip-KSP-1} y ^{EGFR}micéculas_{ARNip-KSP-2}, respectivamente. Las secuencias de Pik1 y KSP-1 fueron como se muestra en los ejemplos anteriores. ARNip-KSP-2 (hebra sentido; 5' CTGAAGACC TGAAGACAAT 3') se dirige a un segmento diferente del ARNm de KSP. Después del día 33, los ratones de los grupos 2, 3 y 4 se trataron con dos dosis de ^{EGFR}micéculas_{carboplatino}.

Los resultados mostraron (Figura 4) que después del día 26, los tumores se volvieron resistentes al tratamiento con ARNip. Concordantemente, los ratones de los grupos 2, 3 y 4 se trataron en las cuatro dosis siguientes, con las tres dosis de ^{EGFR}micéculas_{ARNip-Pik1}, + ^{EGFR}micéculas_{ARNip-KSP-1}, + ^{EGFR}micéculas_{ARNip-KSP-2} combinadas en cantidades iguales, es decir, ~ 3 x 10⁸ de cada tipo de micéculas. Además, hacia el día 33 los tumores fueron sumamente resistentes a todos los ARNip (Figura 4). Luego de la administración de ^{EGFR}micéculas_{carboplatino}, el crecimiento del tumor en los ratones de los grupos 3 y 4 se retrasó significativamente. Luego de la administración de ^{EGFR}micéculas_{carboplatino}, los ratones del grupo 3 mostraron una regresión significativa en el volumen del tumor.

Estos datos muestran que las células tumorales resistentes a los fármacos se pueden tratar eficazmente *in vivo*, de conformidad con la presente invención. En particular, (1) las administraciones secuenciales de micéculas dirigidas, portadoras de secuencias de ARN regulador diseñadas para reducir significativamente la carga tumoral, son seguidas, cuando las células tumorales se vuelven resistentes al efecto antitumoral mediado por ARNip, de (2) micéculas dirigidas portadoras de un fármaco que no actúa sobre la misma proteína a la que se dirigió el ARN regulador.

6. Demostración del knockdown (disminución de la expresión) de proteínas que son la diana en células tumorales y la detención resultante en la proliferación celular después de la administración dirigida de una cantidad terapéuticamente eficaz de ARN regulador empacado en micéculas intactas

Para demostrar que los métodos de la invención empacaban cantidades terapéuticamente eficaces de ARN regulador en minicélulas intactas, fue necesario demostrar que minicélulas con ARN regulador empacado dirigidas por anticuerpo biespecífico podían activar eficaz y eficientemente la detención de la proliferación celular e inducir la muerte celular apoptótica.

5 En una atmósfera humedecida de 95% de aire y 5% de CO₂ a 37 °C, se cultivaron células de cáncer epitelial colónico humano (HCT116) en cultivo tisular en medio RPMI 1640 complementado con 5% de suero fetal bovino y glutamina. Como se describió antes, las minicélulas se purificaron y se empacaron con ARN_{ip} dirigido contra PIK1 o KSP, y se unieron a un BsAb portador de especificidades de O-antígeno anti-*S. typhimurium* y anti-EGFR humano.
 10 Así, a partir de minicélulas^{SARNip-KSP}, minicélulas^{SARNip-PIK1} y minicélulas (control) se generaron ^{EGFR} minicélulas^{SARNip-KSP}, ^{EGFR} minicélulas^{SARNip-PIK1} y ^{EGFR} minicélulas. Se sembraron células HCT116 en placas de seis pocillos, y los grupos experimental y de control se transinfectaron a razón de 5000 minicélulas:1 célula HCT116. Se incluyó un control adicional sólo de células.

15 Después de 2 horas de incubación con minicélulas, los pocillos se lavaron tres veces con PBS recién preparado. Las células se recogieron 4 horas, 8 horas, 16 horas, 24 horas, 32 horas y 48 horas post transinfección, se fijaron en etanol al 70% y se incubaron a 4 °C durante 30 minutos. Las células se lavaron 2 veces en tampón de fosfato-citrato (pH 7.8) y se trataron con 100 mg/ml de ARNasa, para asegurar que sólo se coloreaba el ADN. Las células se tiñeron con yoduro de propidio (colorante de ácido nucleico) y después se analizaron usando un citómetro de flujo
 20 FACSCalibur™, producto de Becton Dickinson (Franklin Lakes, Nuevas Jersey EE.UU.), en la universidad Macquarie (Sydney, Australia), y el software de adquisición y análisis CELL Quest , también producto de Becton Dickinson.

25 El análisis FACS de las células mostró que, a las 4 y 8 horas post transinfección (Figura 5A), las células tratadas con ^{EGFR} minicélulas^{SARNip-KSP}, o ^{EGFR} minicélulas^{SARNip-PIK1} se caracterizaron por una detención robusta del ciclo celular G2. Las células de control, solas o tratadas con ^{EGFR} minicélulas, no mostraron efectos adversos. Estas células mostraron fases G1, S y G2 del ciclo celular normales. A las 16 y 24 horas, las células experimentales mostraron no sólo una detención robusta de G2 sino también un gran número de células apoptóticas (Figura 6). A las 32 y 48 horas, la
 30 mayoría de las células de los grupos experimentales estaban apoptóticas y se habían vuelto desechos celulares (véase en particular los paréntesis en la figura 7).

Estos resultados demuestran que las minicélulas intactas dirigidas se empacaron con una cantidad terapéuticamente eficaz de ARN regulador, y que las minicélulas de la invención son sumamente eficientes y significativamente
 35 eficaces en el knockdown de una proteína que es la diana dentro de las células tumorales, provocando la muerte celular apoptótica.

CITED PUBLICATIONS

- 5 Barr, F.A., Sillje, H.H., and Nigg, E.A. Pololike kinases and the orchestration of cell division. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 5: 429-440 (2004).
- Batra, R.K., Wang-Johanning, F., Wagner, E., Garver, R.I. Jr., Curiel, D.T. Receptor-mediated gene delivery employing lectin-binding specificity. *Gene Ther.* 1: 255-260 (1994).
- 10 Becker, C.M., Farnebo, F.A., Iordanescu, I., Behonick, D.J., Shih, M.C., Dunning, P., Christofferson, R., Mulligan, R.C., Taylor, G.A., Kuo, C.J., Zetter, B.R. Gene therapy of prostate cancer with the soluble vascular endothelial growth factor receptor Flk1. *Cancer Biol. Ther.* 1: 548-553 (2002).
- Bertrand, J-R., Pottier, M., Vekris, A., Opolon, P., Maksimenko, A., Malvy, C. Comparison of antisense oligonucleotides and siRNAs in cell culture and *in vivo*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 296: 1000-1004 (2002).
- 15 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).
- Borst, P. and Elferink, R.O. Mammalian ABC transporters in health and disease. *Annu. Rev. Biochem.* 71: 537-592 (2002).
- Bredel, M. Anticancer drug resistance in primary human brain tumors. *Brain Res. Rev.* 35: 161-204 (2001).
- 20 Britton, R.A., Lin, D.C., Grossman, A.D. Characterization of a prokaryotic SMC protein involved in chromosome partitioning. *Genes Dev.* 12: 1254-1259 (1998).
- Caplen, N.J. RNAi as a gene therapy approach. *Expert Opin. Biol. Ther.* 3: 575-586 (2003).
- Carter, P. Improving the efficacy of antibody-based cancer therapies. *Nat. Rev. Cancer* 1: 118-129 (2001).
- Check, E. Gene therapy put on hold as third child develops cancer. *Nature*, 433: 561 (2005).
- 25 Chen, Z.S. *et al.* Reversal of drug resistance mediated by multidrug resistance protein (MRP) 1 by dual effects of agosterol A on MRP 1 function. *Int. J. Cancer* 93: 107-113 (2001).
- Chiu, Y-L., Rana, T.M. siRNA function in RNAi: a chemical modification analysis. *RNA* 9: 1034-1048 (2003).
- Choung, S., Kim, Y.J., Kim, S., Park, H.O., Choi, Y.C. Chemical modification of siRNAs to improve serum stability without loss of efficacy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 342: 919-927 (2006).
- Conner, S.D. and Schmid, S.L. Regulated portals of entry into the cell. *Nature* 422: 37-44 (2003).
- 30 Czauderna, F., Fechtner, M., Dames, S., Aygun, H., Klippel, A., Pronk, G.J., Giese, K., Kaufmann, J. Structural variations and stabilising modifications of synthetic siRNAs in mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* 31: 2705-2716 (2003).
- Dagenbach, E.M., and Endow, S.A. A new kinesin tree. *J. Cell Sci.* 117: 3-7 (2004).
- 35 Dash, P.R., Read, M.L., Barrett, L.B., Wolfert, M.A. Seymour, L.W. Factors affecting blood clearance and *in vivo* distribution of polyelectrolyte complexes for gene delivery. *Gene Ther.* 6: 643-650 (1999).
- de Boer, P.A., Crossley, R.E., Rothfield, L.I. Roles of MinC and MinD in the site-specific septation block mediated by the MinCDE system of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 174: 63-70 (1992).
- 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).
- 40 Devroe, E. and P.A. Silver Therapeutic potential of retroviral RNAi vectors. *Expert Opin. Biological Therapy* 4: 319 (2004).
- Doige, C.A. and Ames, G.F. ATP-dependent transport systems in bacteria and humans: relevance to cystic fibrosis and multidrug resistance. *Annu. Rev. Microbiol.* 47: 291-319 (1993).
- 45 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* 178: 201-209 (1995).
- Dykxhoorn, D.M. and Lieberman, J. The silent revolution: RNA interference as basic biology, research tool, and therapeutic. *Annu. Rev. Med.* 56: 401-423 (2005).
- Dykxhoorn, D.M., Palliser, D., Lieberman, J. The silent treatment: siRNAs as small molecule drugs. *Gene Ther.* 13: 541-552 (2006).
- 50 Elmén, J., Thonberg, H., Ljungberg, K., Frieden, M., Westergaard, M., Xu, Y., Wahren, B., Liang, Z., Ørum, H., Koch, T. and others. Locked nucleic acid (LNA) mediated improvements in siRNA stability and functionality. *Nucleic Acids Res.* 33: 439-447 (2005).
- Enos, A. P., and Morris, N.R. Mutation of a gene that encodes a kinesin-like protein blocks nuclear division in *A. nidulans*. *Cell* 60: 1019-1027 (1990).
- 55 Glennie, M.J., McBride, H.M., Worth, A.T., Stevenson, G.T. Preparation and performance of bispecific F(ab' gamma)2 antibody containing thioether-linked Fab' gamma fragments. *J. Immunol.* 39: 2367-2375 (1987).
- Glover, D. M., Hagan, I. M., and Tavares, A. A. Polo-like kinases: a team that plays throughout mitosis. *Genes Dev.* 12: 3777-3787 (1998).
- 60 Gosselin, M.A. and Lee, R.J. Folate receptor-targeted liposomes as vectors for therapeutic agents. *Biotechnol. Annu. Rev.* 8: 103-131 (2002).
- Gottesman, M., Fojo, T. and Bates, S. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nature Rev. Cancer* 2: 48-58 (2002).
- Griffiths, A.D. *et al.* Isolation of high affinity human antibodies directly from large synthetic repertoires. *EMBO J.* 13: 3245-3260 (1994).

- Grishok, A., Tabara, H., Mello, C.C. Genetic requirements for inheritance of RNAi in *C. elegans*. *Science* 287: 2494-2497 (2000).
- Guerrier-Takada, C., Gardiner, K., Marsh, T., Pace, N., Altman, S. The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. *Cell* 35: 849-857 (1983).
- 5 Hacein-Bey-Abina, S., Von Kalle, C., Schmidt, M., McCormack, M.P., Wulffraat, N., Leboulch, P., Lim, A., Osborne, C.S., Pawliuk, R., Morillon, E. *et al.* LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science*, 302: 415-419 (2003).
- Hampel, A. and Tritz, R. RNA catalytic properties of the minimum (-)sTRSV sequence. *Biochem.* 28: 4929-4933 (1989).
- 10 Hampel, A., Tritz, R., Hicks, M., Cruz, P. 'Hairpin' catalytic RNA model: evidence for helices and sequence requirement for substrate RNA. *Nucleic Acids Res.* 18: 299-304 (1990).
- Hanada, M., Aime-Sempe, C., Sato, T., Reed, J.C. Structure function analysis of Bcl-2 protein. Identification of conserved domains important for homodimerization with Bcl-2 and heterodimerization with Bax. *J. Biol. Chem.* 270: 11962-11969 (1995).
- 15 Harry, E.J. Bacterial cell division: Regulating Z-ring formation. *Mol. Microbiol.* 40: 795-803 (2001).
- Higgins, C.F. ABC transporters: physiology, structure and mechanism--an overview. *Res. Microbiol.* 152: 205-210 (2001).
- Hiraga, S., Niki, H., Ogura, T., Ichinose, C., Mori, H., Ezaki, B., Jaffe, A. Chromosome partitioning in *Escherichia coli*: novel mutants producing anucleate cells. *J. Bacteriol.* 171: 1496-1505 (1989).
- 20 Hoshida, T., Sunamura, M., Duda, D.G., 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 fit-1 vascular endothelial growth factor receptor. *Pancreas* 25: 111-121 (2002).
- Hu, Z. and Lutkenhaus, J. Topological regulation of cell division in *Escherichia coli* involves rapid pole to pole oscillation of the division inhibitor MinC under the control of MinD and MinE. *Mol. Microbiol.* 34: 82-90 (1999).
- 25 Hudson, P.J. and Souriau, C. Recombinant antibodies for cancer diagnosis and therapy. *Expert Opin. Biol. Ther.* 1: 845-855 (2001).
- Hung, M.C., Hortobagyi, G.N., Ueno, N.T. Development of clinical trial of E1A gene therapy targeting HER-2/neu-overexpressing breast and ovarian cancer. *Adv. Exp. Med. Biol.* 465: 171-180 (2000).
- Ireton, K., Gunther, N.W. 4th., Grossman, A.D. *spo0J* is required for normal chromosome segregation as well as the initiation of sporulation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 176: 5320-5329 (1994).
- 30 Karpovsky, B., Titus, J.A., Stephany, D.A., Segal, D.M. 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: 1686-1701 (1984).
- 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).
- Jones, P.T., Dear, P.H., Foote, J., Neuberger, M.S., Winter, G. Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature* 321: 522-525 (1986).
- Kaetzel, C.S., Blanch, V.J., Hempen, P.M., Phillips, K.M., Piskurich, J.F., Youngman, K.R. The polymeric immunoglobulin receptor: structure and synthesis. *Biochem. Soc. Trans.* 25: 475-480 (1997).
- 40 Kapoor, T.M., Caner, T.U., Coughlin, M.L., Mitchison, T.J. 2000. Probing spindle assembly mechanisms with monastrol, a small molecule inhibitor of the mitotic kinesin, Eg5. *J. Cell Biol.* 150: 975-988 (2000).
- Kleeff, J., Fukahi, K., Lopez, M.E., Friess, H., Buchler, M.W., Sosnowski, B.A., Korc, M. Targeting of suicide gene delivery in pancreatic cancer cells via FGF receptors. *Cancer Gene Ther.* 9: 522-532 (2002).
- Kootstra, N.A. and Verma, I.M. (2003) Gene therapy with viral vectors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 43: 413-439 (2003).
- 45 Kostelny, S.A., Cole, M.S., Tso, J.Y. Formation of a bispecific antibody by the use of leucine zippers. *J. Immunol.* 148: 1547-1553 (1992).
- Kruh, G.D. and Belinsky, M.G. The MRP family of drug efflux pumps. *Oncogene* 22: 7537-7552 (2003).
- Layzer, J.M., McCaffrey, A.P., Tanner, A.K., Huang, Z., Kay, M.A., Sullenger, B.A. *In vivo* activity of nuclease-resistant siRNAs. *RNA* 10: 766-771 (2004).
- 50 Lee, R. C., Feinbaum, R. L., Ambros, V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75: 843-854 (1993).
- Marshall, J. Carcinoembryonic antigen-based vaccines. *Semin. Oncol.* 30: 30-36 (2003).
- Caner, 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).
- 55 McManus, M. T. and Sharp, P. A. Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. *Nat. Rev. Genet.* 3: 737-747 (2002).
- Miller, J.F. Bacterial transformation by electroporation. *Methods Enzymol.* 235: 375-385 (1994).
- Modok, S., Mellor, H.R., Callaghan, R. Modulation of multidrug resistance efflux pump activity to overcome chemoresistance in cancer. *Curr. Open. Pharmacol.* 6: 350-354 (2006).
- 60 Monia, B.P., Johnston, J.F., Sasmor, H., Cummins, L.L. Nuclease resistance and antisense activity of modified oligonucleotides targeted to Ha-ras. *J. Biol. Chem.* 271: 14533-14540 (1996).
- Morrissey, D.V., Blanchard, K., Shaw, L., Jensen, K., Lockridge, J.A., Dickinson, B., McSwiggen, J.A., Vargeese, C., Bowman, K., Shaffer, C.S. and others. Activity of stabilized short interfering RNA in a mouse model of hepatitis B

- virus replication. *Hepatology* 41: 1349-1356 (2005).
- Nicholson, R.I., Gee, J.M., Harper, M.E. EGFR and cancer prognosis. *Eur. J. Cancer* 37: S9-S15 (2001).
- Nikaido, H. Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. *Science* 264: 382-388. (1994).
- 5 Okada, Y., Wachi, M., Hirata, A., Suzuki, K., Nagai, K., Matsushashi, M. Cytoplasmic axial filaments in *Escherichia coli* cells: possible function in the mechanism of chromosome segregation and cell division. *J. Bacteriol.* 176: 917-922 (1994).
- Opalinska, J.B. and Gewirtz, A.M. Nucleic-acid therapeutics: basic principles and recent applications. *Nat. Rev. Drug Discov.* 1: 503-514 (2002).
- 10 Osbourn, J., Jermutus, L., Duncan, A. Current methods for the generation of human antibodies for the treatment of autoimmune diseases. *Drug Del. Tech.* 8: 845-851 (2003).
- Pack, P. and Pluckthun, A. Miniantibodies: use of amphipathic helices to produce functional, flexibly linked dimeric Fv fragments with high avidity in *Escherichia coli*. *Biochemistry* 31: 1579-1584 (1992).
- Paddison, P.J., A. Caudy, E. Bernstein, G.J. Hannon, D.C. Conklin Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes & Development* 16: 948-958 (2002).
- 15 Perrotta, A.T. and Been, M.D. Cleavage of oligoribonucleotides by a ribozyme derived from the hepatitis delta virus RNA sequence. *Biochem.* 31: 16-21 (1992).
- Pikaar, J.C., Voorhout, W.F., van Golde, L.M., Verhoef, J., Van Strijp, J.A., van Iwaarden, J.F. Opsonic activities of surfactant proteins A and D in phagocytosis of gram-negative bacteria by alveolar macrophages. *J Infect. Dis.* 172: 481-489 (1995).
- 20 Raper, S.E., Chirmule, N., Lee, F.S., Wivel, N.A., Bagg, A., Gao, G.P., Wilson, J.M. and Batshaw, M.L. Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. *Mol. Genet. Metab.* 80: 148-158 (2003).
- Raskin, D.M. and de Boer, P.A. MinDE-dependent pole-to-pole oscillation of division inhibitor MinC in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 181: 6419-6424 (1999).
- 25 Reeve, J.N. and Cornett, J.B. Bacteriophage SPO1-induced macromolecular synthesis in minicells of *Bacillus subtilis*. *J. Virol.* 15: 1308-1316 (1975).
- Ridgway, J.B., Presta, L.G., Carter, P. 'Knobs-into-holes' engineering of antibody CH3 domains for heavy chain heterodimerization. *Protein Eng.* 9: 617-621 (1996).
- 30 Riechmann, L., Clark, M., Waldmann, H., Winter, G. Reshaping human antibodies for therapy. *Nature* 332: 323-327 (1988).
- Riezman, H. Three clathrin-dependent budding steps and cell polarity. *Trends in Cell Biol.* 3: 330-332 (1993).
- Rossi, J.J., Elkins, D., Zaia, J.A. Sullivan, S. Ribozymes as anti-HIV-1 therapeutic agents: principles, applications, and problems. *Aids Res. Human Retroviruses* 8: 183-189 (1992).
- 35 Salomon, D.S., Brandt, R., Ciardiello, F., Normanno, N. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 19: 183-232 (1995).
- Sandvig, K. and Deurs, B. Endocytosis without clathrin. *Trends in Cell Biol.* 4: 275-277 (1994).
- Sawin, K.E. and Mitchison, T.J. Mutations in the kinesin-like protein Eg5 disrupting localization to the mitotic spindle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 4289-4293 (1995).
- 40 Saville, B.J. and Collins, R.A. A site-specific self-cleavage reaction performed by a novel RNA in *Neurospora* mitochondria. *Cell* 61: 685-696 (1990).
- Saville, B.J. and Collins, R.A. RNA-mediated ligation of self-cleavage products of a *Neurospora* mitochondrial plasmid transcript. *PNAS (USA)* 88: 8826-8830 (1991).
- Sellers, W.R. and Fisher, D.E. Apoptosis in cancer drug targeting. *J. Clin. Invest.* 104: 1655-1661 (1999).
- 45 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).
- Singh, M. Transferrin As A targeting ligand for liposomes and anticancer drugs. *Curr. Pharm. Des.* 5: 443-451 (1999).
- Sioud, M. Therapeutic siRNAs. *Trends Pharmacol. Sci.* 25: 22-28 (2004).
- 50 Speert, D.P., Wright, S.D., Silverstein, S.C., Mah, B. Functional characterization of macrophage receptors for In-vitro phagocytosis of unopsonized *Pseudomonas-aeruginosa*. *J. Clin. Invest.* 82: 872-879 (1988).
- Stewart, P.S. and D'Ari, R. Genetic and morphological characterization of an *Escherichia coli* chromosome segregation mutant. *J. Bacteriol.* 174: 4513-4516 (1992).
- Stockert, R.J. The asialoglycoprotein receptor: relationships between structure, function, and expression. *Physiol. Rev.* 75: 591-609 (1995).
- 55 Strebhardt, K., and Ullrich, A. Targeting Pololike kinase 1 for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* 6: 321-330 (2006).
- Sun *et al.* Overexpression of Bcl-2 blocks TNF-related apoptosis- inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis in human lung cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 280: 788 (2001).
- 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).
- 60 Thurnher, M., Wagner, E., Clausen, H., Mechtler, K., Rusconi, S., Dinter, A., Bimstiel, M.L., Berger, E.G., Cotton, M. Carbohydrate receptor-mediated gene transfer to human T leukaemic cells. *Glycobiology* 4: 429-435 (1994).
- Todorovska, A. *et al.* Design and application of diabodies, triabodies and tetrabodies for cancer targeting. *J. Immunol. Methods* 248: 47-66 (2001).

- Tomlinson, 1. and Holliger, P. Methods for generating multivalent and bispecific antibody fragments. *Methods Enzymol.* 326: 461-479 (2000).
- van de Weerd, B. C., and Medema, R. H. Polo-like kinases: a team in control of the division. *Cell Cycle* 5: 853-864 (2006).
- 5 Vaughan, T.J., Osbourn, J.K., Tempest, P.R. Human antibodies by design. *Nature Biotechnol.* 16: 535-539 (1998).
- Verhoeyen, M., Milstein, C., Winter, G. Reshaping human antibodies: grafting an antilysozyme activity. *Science* 239: 1534-1536 (1988).
- Verma, I.M. and Weitzman, M.D. Gene therapy: twenty-first century medicine. *Annu. Rev. Biochem.* 74: 711-738 (2005).
- 10 Vickers, T. A., Koo, S., Bennett, C. F., Crooke, S. T., Dean, N. M., Baker, B. F. Efficient Reduction of Target RNAs by Small Interfering RNA and RNase H-dependent Antisense Agents. A COMPARATIVE ANALYSIS *J. Biol. Chem.* 278: 7108 - 7118 (2003).
- Wachi, M., Doi, M., Okada, Y., Matsubishi, M. New mre genes mreC and mreD, responsible for formation of the rod shape of *Escherichia coli* cells. *J. Bacteriol.* 171: 6511-6516 (1989).
- 15 Wang, C.Y., Cusack, J.C. Jr., Liu, R., Baldwin, A.S. Jr. Control of inducible chemoresistance: Enhanced anti-tumor therapy through increased apoptosis by inhibition of NF- κ B. *Nat. Med.* 5: 412-417 (1999).
- White, M.K., and McCubrey, J.A. Suppression of apoptosis: role in cell growth and neoplasia. *Leukemia* 15: 1011-1021 (2001).
- 20 Wright, S.D., Detmers, P.A., Jong, M.T., Meyer, B.C. Interferon-gamma depresses binding of ligand by c3b and c3bi receptors on cultured human monocytes, an effect reversed by fibronectin. *J. Exp. Med.* 163: 1245-1259 (1986).
- Wu, H., Hait, W.N., Yang, J.M. Small interfering RNA-induced suppression of MDR1 (P-glycoprotein) restores sensitivity to multidrug-resistant cancer cells. *Cancer Res.* 63: 1515-1519(2003).
- Yague, E., Higgins, C.F., Raguz, S. Complete reversal of multidrug resistance by stable expression of small interfering RNAs targeting MDR1. *Gene Ther.* 11: 1170-1174 (2004).
- 25 Zamore, P.D., Tuschl, T., Sharp, P.A., Bartel, D.P. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* 101: 25-33 (2000).
- Zamore, P.D. Ancient pathways programmed by small RNAs. *Science* 296: 1265-1269 (2002).
- Ziady, A.G., Perales, J.C., Ferkol, T., Gerken, T., Beegen, H., Perlmutter, D.H., Davis, P.B. Gene transfer into hepatoma cell lines via the serpin enzyme complex receptor. *Am. J. Physiol.* 273: G545-G552 (1997).
- 30

REIVINDICACIONES

1. Una composición que contiene (a) una pluralidad de minicélulas intactas de origen bacteriano, donde cada minicélula de dicha pluralidad contiene ARN regulador que está empacado en dicha minicélula y (b) un portador farmacéuticamente aceptable para ellas, donde hay una ausencia en dichas minicélulas de un constructo para la expresión *in situ* de dicho ARN regulador, donde dicho ARN regulador se elige del grupo que consiste en ARNip, ARNmi y ARNhc y donde dicha pluralidad contiene una cantidad terapéuticamente eficaz de dicho ARN regulador.
2. La composición de la reivindicación 1, donde dicho ARN regulador se dirige al transcrito de ARN que codifica una proteína que contribuye a la resistencia a los fármacos, la resistencia a la apoptosis o la neoplasticidad.
3. La composición de la reivindicación 1, donde dicho ARN regulador se dirige al transcrito de: la glucoproteína P, MDR-2 o MDR-3.
4. La composición de la reivindicación 1, donde dicho ARN regulador se dirige al transcrito de: MRP2, BCR-ABL, la proteína asociada a la resistencia a STI-571, una proteína relacionada a la resistencia pulmonar, la ciclooxigenasa-2, el factor nuclear kappa, XRCC1, ERCC1, GSTP1, la β -tubulina mutante, o un factor de crecimiento.
5. La composición de la reivindicación 1, donde dicho RNA regulador se dirige al transcrito de Bcl-2, Bcl-XL, A1/Bfl 1, la cinasa de adhesión focal o la proteína p53.
6. La composición de la reivindicación 1, donde dicho ARN regulador se dirige al transcrito de la β -Catenina, PKC- α , C-RAF, K-Ras, la ARN helicasa Dead box DP97, cdk1, DNMT1, FLIP, C-Sfc, 53BPI, la proteína del grupo Polycomb EZH2, ErbB1, HPV-16 E5 y E7, Fortilin & MCI1P, KSP, DIP13 α , MBD2, p21, KLF4, tpt/TCTP, SPK1 & SPK2, P300, PLK1, Trp53, Ras, ErbB1, VEGF o BAG-1.
7. La composición de la reivindicación 1, que contiene además un fármaco.
8. La composición de la reivindicación 7, donde dicho ARN regulador se dirige al transcrito que codifica una proteína que contribuye a la resistencia a dicho fármaco.
9. La composición de la reivindicación 8, donde dicho fármaco está empacado en una minicélula intacta de origen bacteriano.
10. La composición de la reivindicación 9, donde dicho ARN regulador y dicho fármaco están empacados en la misma minicélula.
11. La composición de la reivindicación 1, que contiene además un ligando biespecífico.
12. La composición de la reivindicación 11, donde dicho ligando biespecífico contiene un primer brazo que tiene especificidad por una estructura de superficie de una minicélula y un segundo brazo que tiene especificidad por un receptor de superficie de una célula de mamífero no fagocítica.
13. La composición de la reivindicación 1 o la reivindicación 12, donde dicho ARN regulador es ARNip.
14. La composición de la reivindicación 12, donde dicho receptor de la superficie de la célula de mamífero es capaz de activar la endocitosis mediada por receptor de dicha minicélula.
15. La composición de la reivindicación 11, donde dicho ligando biespecífico comprende un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo.
16. La composición de la reivindicación 1, donde dicha composición contiene menos de aproximadamente 1 célula bacteriana progenitora contaminante cada 10^9 minicélulas.
17. La composición de la reivindicación 1, donde dicha composición contiene menos de aproximadamente 1 célula bacteriana progenitora contaminante cada 10^{10} minicélulas.
18. La composición de la reivindicación 1, donde dicha composición contiene menos de aproximadamente 1 célula bacteriana progenitora contaminante cada 10^{11} minicélulas.
19. La composición de acuerdo con la reivindicación 1 para utilizar como un medicamento.
20. La composición de la reivindicación 19, donde dicho ARN regulador es ARNhc.

21. La composición de la reivindicación 19, donde dicho ARN regulador es ARNip.
22. La composición de la reivindicación 19 para utilizar en el tratamiento de la resistencia a los fármacos o la resistencia a la apoptosis.
- 5 23. La composición de la reivindicación 19 para usar en el tratamiento del cáncer o la neoplasticidad, que contiene además un ligando biespecífico, donde dicho ligando biespecífico contiene un primer brazo que tiene especificidad por una estructura de superficie de una minicélula y un segundo brazo que tiene especificidad por un receptor de superficie de una célula de mamífero no fagocítica.
- 10 24. La composición de la reivindicación 23, donde dicho cáncer se elige del grupo que consiste en cáncer de estómago, cáncer de vías urinarias, cáncer de vejiga, cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer de colon y cáncer epitelial colónico.
- 15 25. La composición de la reivindicación 19, donde dicho medicamento está destinado al uso en combinación con un fármaco donde dicho ARN regulador se dirige al transcrito de una proteína que contribuye a la resistencia a dicho fármaco.
- 20 26. La composición de la reivindicación 25, donde dicho fármaco se empaca en una minicélula intacta de origen bacteriano.
27. La composición de la reivindicación 26, donde dicho ARN regulador y dicho fármaco están empacados en la misma minicélula.
- 25 28. Un método para formular minicélulas de la composición de la reivindicación 1, que comprende coincubar en un tampón (A) una pluralidad de minicélulas intactas, de origen bacteriano con (B) ARN regulador exento de plásmido, obteniendo así minicélulas que contienen dicho ARN regulador, donde dicho ARN regulador se elige del grupo que consiste en ARNip, ARNmi y ARNhc.
- 30 29. El método de la reivindicación 28, donde dicho ARN regulador es ARNhc.
30. El método de la reivindicación 28, donde dicho ARN regulador es ARNip.
- 35 31. El método de la reivindicación 29, donde la cantidad de ARNip presente en dichas minicélulas que contienen dicho ARNip es tal que 10^{10} minicélulas empacan al menos aproximadamente 1.3 μg de ARNip.
32. El método de cualquiera de las reivindicaciones 28 a 31, donde dicha incubación se lleva a cabo en solución salina tamponada.

Figura 1

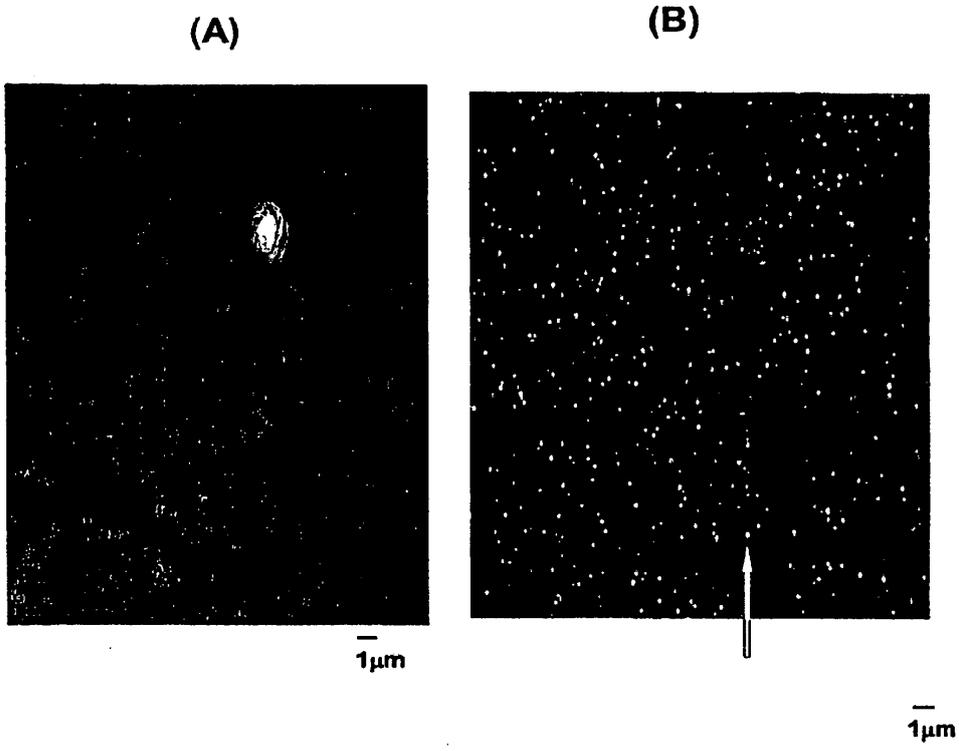


Figura 2

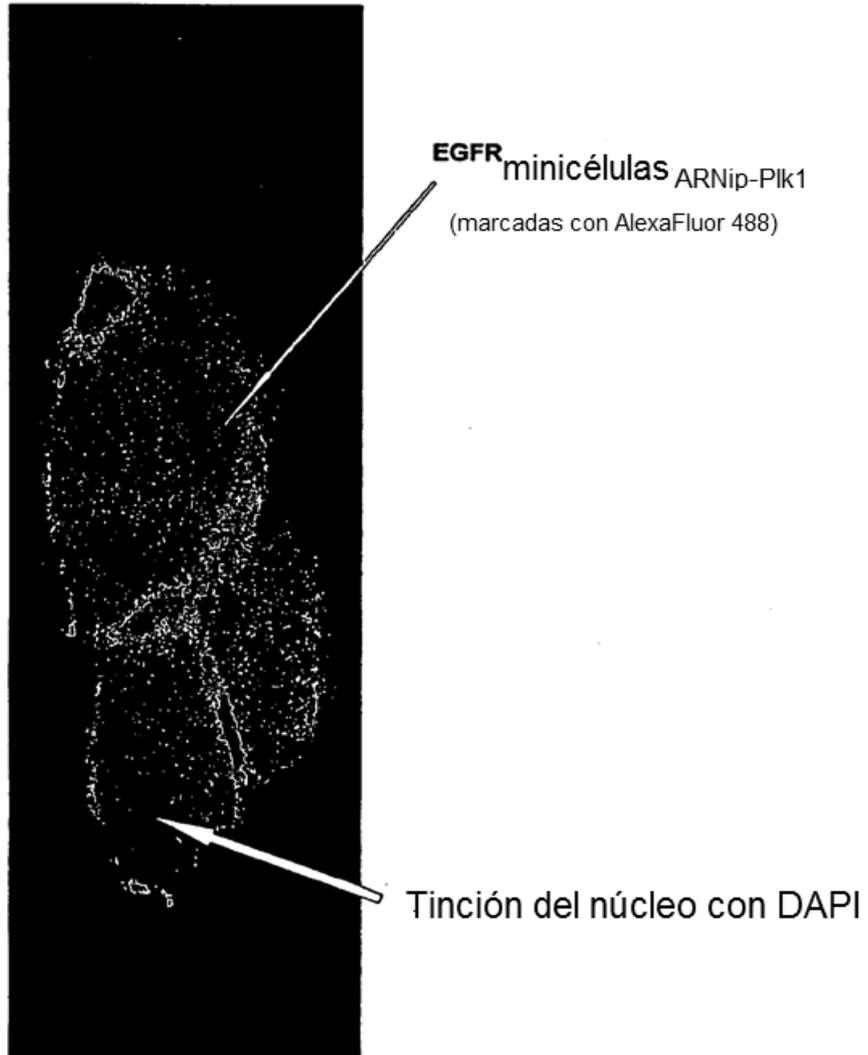


Figura 3

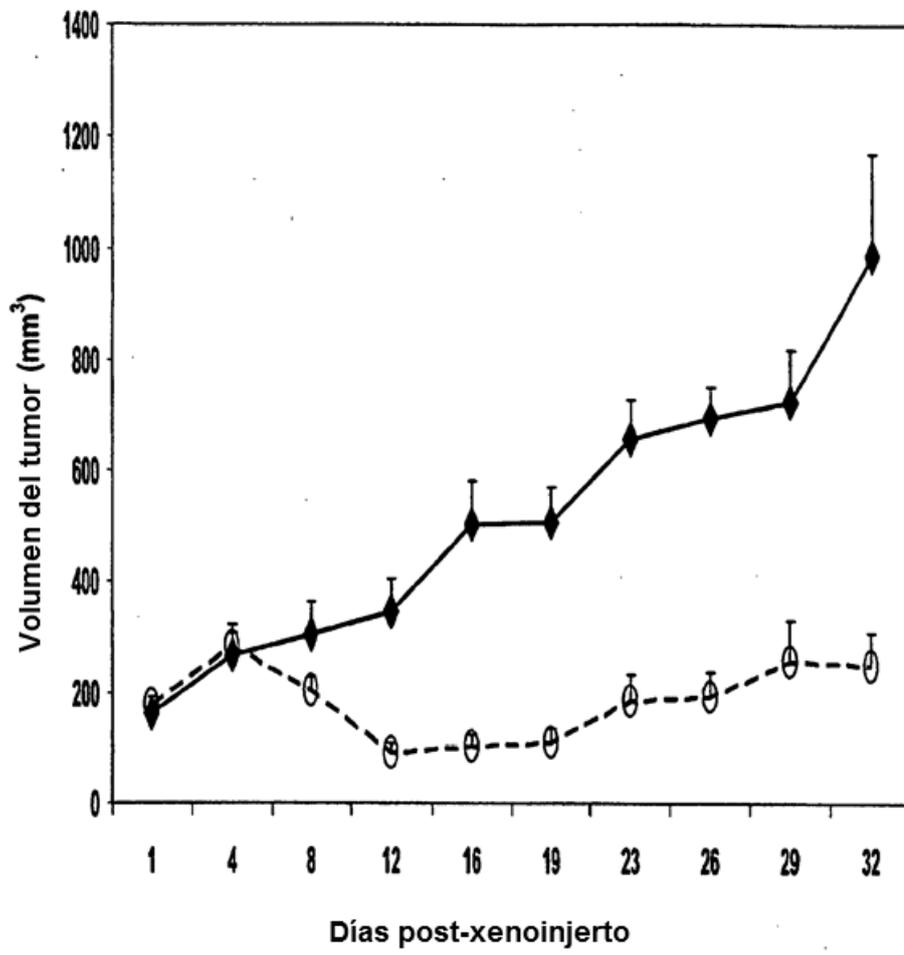


Figura 4

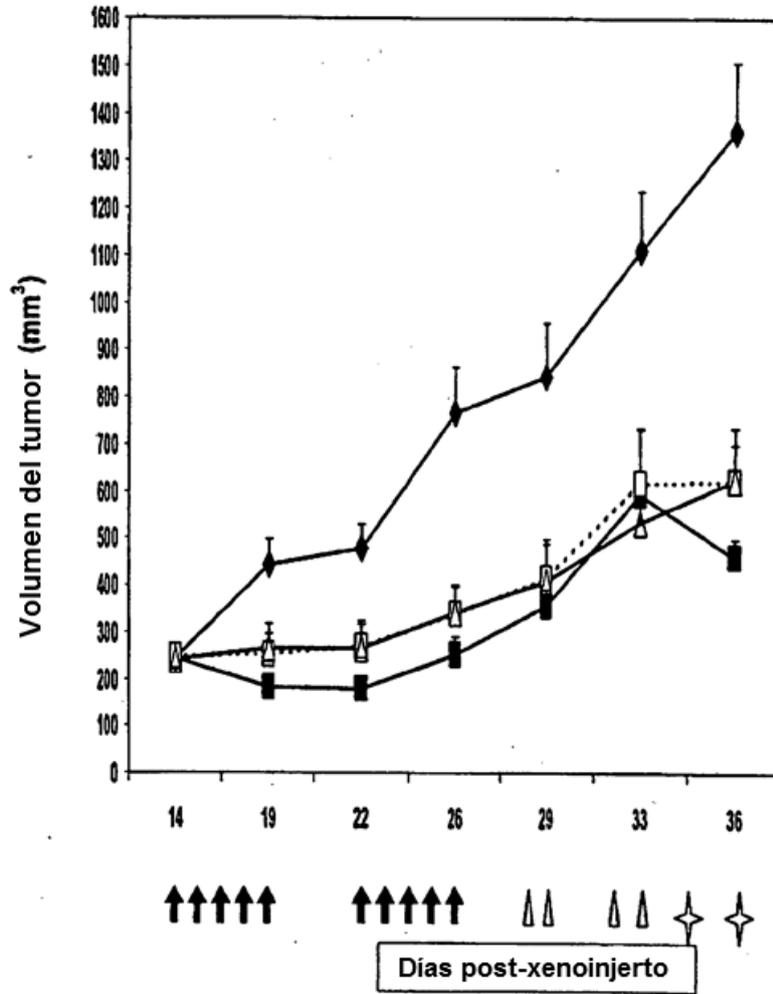


Figura 5

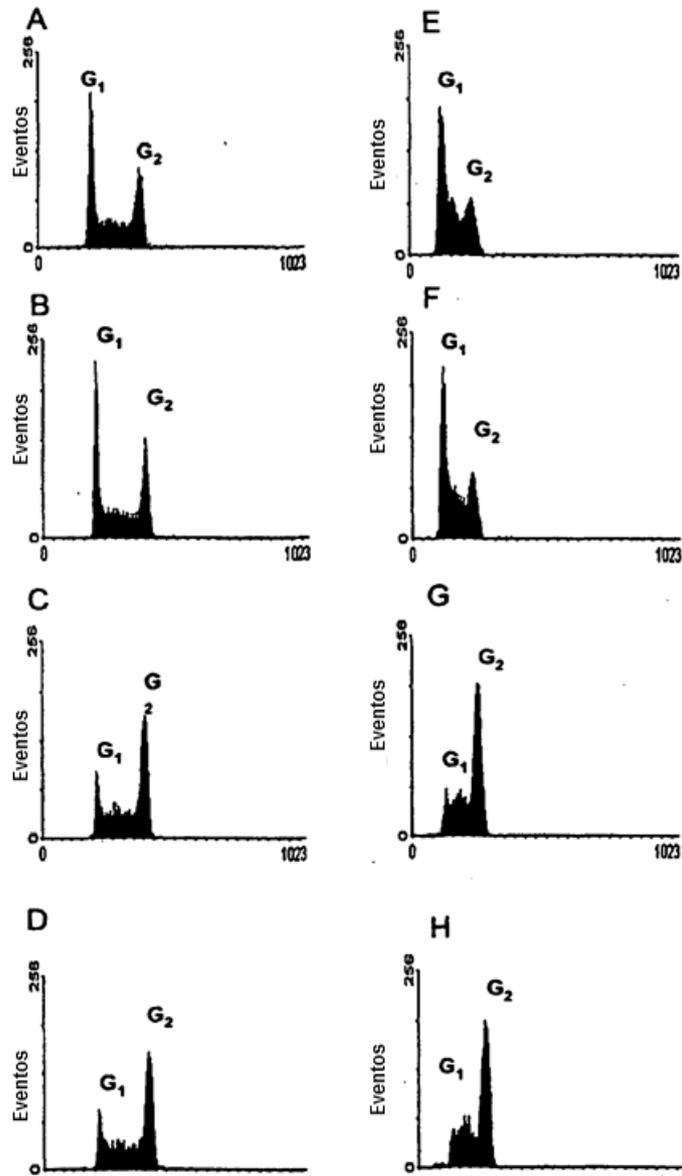


Figura 6

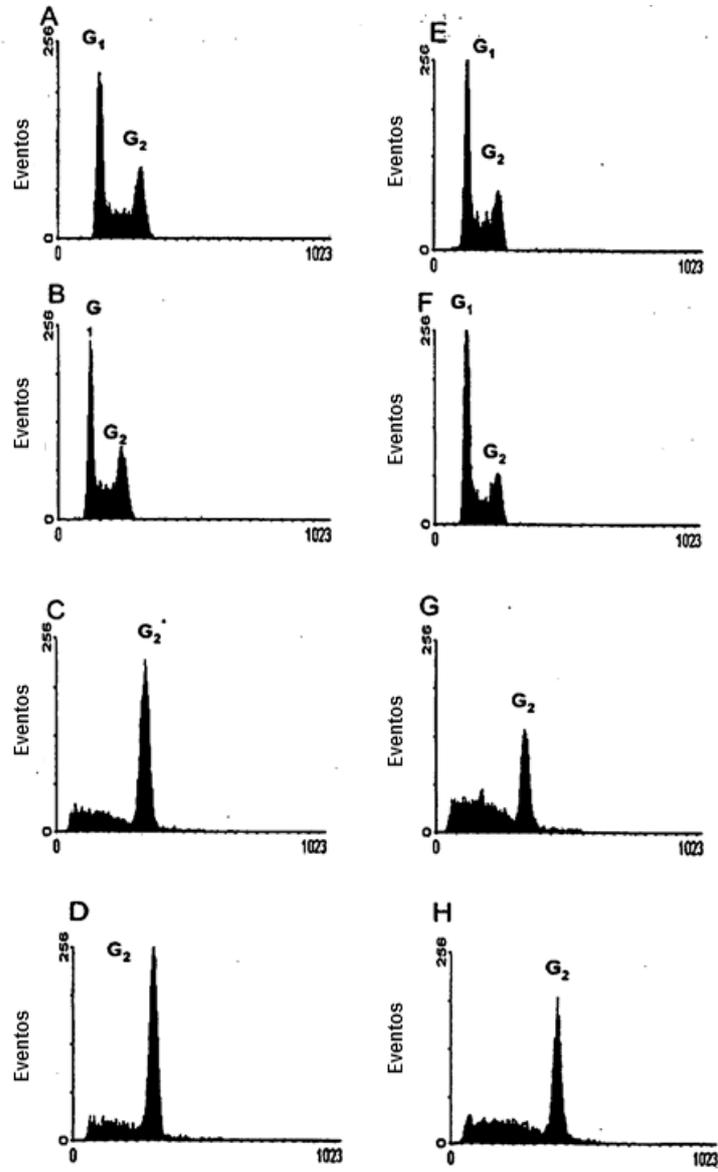


Figura 7

