

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 535 235**

51 Int. Cl.:

A61K 47/48 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.08.2005 E 11171410 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.01.2015 EP 2386640**

54 Título: **Administración de ácidos nucleicos funcionales a células de mamífero a través de minicélulas intactas obtenidas a partir de bacterias**

30 Prioridad:

26.08.2004 US 604433 P

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

07.05.2015

73 Titular/es:

**ENGINEIC MOLECULAR DELIVERY PTY LTD
(100.0%)
Building 2, 25 Sirius Road
Lane Cove West, NSW 2066 , AU**

72 Inventor/es:

**BRAHMBHATT, HIMANSHU y
MACDIARMID, JENNIFER**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 535 235 T3

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

DESCRIPCIÓN

Administración de ácidos nucleicos funcionales a células de mamífero a través de minicélulas intactas obtenidas a partir de bacterias

Antecedentes de la invención

5 La presente invención se refiere a iniciativas en curso para lograr una administración eficaz de ácidos nucleicos funcionales a células de mamíferos. Más específicamente, la invención se refiere al uso de vectores de minicélulas bacterianas para entregar ácidos nucleicos funcionales a células de mamífero. La invención es especialmente útil para eliminar la resistencia a los fármacos, principalmente en el contexto de una terapia contra el cáncer y el SIDA, para favorecer la apoptosis y para contrarrestar la neoplasia en células diana.

10 Avances recientes han puesto de manifiesto una variedad de técnicas para introducir ácidos nucleicos funcionales dentro de células. Por ejemplo, métodos de transfección basados en liposomas pueden entregar ácidos nucleicos producidos de forma exógena. Sin embargo, tal metodología exógena tiene el inconveniente de efectuar solo una inhibición transitoria de una diana. Además, los liposomas son inestables *in vivo*. Como alternativa a la administración de ácidos nucleicos producidos de forma exógena, los vectores pueden entregar plásmidos que codifican ácidos nucleicos funcionales, los cuales son producidos de forma endógena. Sin embargo, los vectores víricos útiles empleados actualmente para este propósito, plantean problemas graves de seguridad. Problemas a modo ilustrativo incluyen la recombinación con virus de tipo silvestre, un potencial de inserción y oncogénico, inmunosupresión inducida por el virus, capacidad limitada de los vectores víricos para transportar grandes segmentos de ADN, restablecimiento de la virulencia de virus atenuados, dificultades para preparar y distribuir virus recombinantes, una estabilidad reducida y reacciones adversas, tales como una respuesta inflamatoria, causada por una inmunidad existente. Una metodología que evitara estos problemas ofrecería un beneficio significativo para hacer la entrega de ácidos nucleicos funcionales más segura y eficaz.

25 Un método eficaz para la administración de ácidos nucleicos funcionales sería particularmente beneficioso para anular la resistencia a los fármacos. Las células de mamífero emplean una variedad de procesos biológicos para resistir a los fármacos, lo que plantea un obstáculo importante para el éxito del tratamiento del cáncer. Del mismo modo, la resistencia a los fármacos limita la eficacia del tratamiento del VIH, especialmente de una terapia anti-retrovírica de gran actividad (TARGA) que se basa en una combinación de inhibidores nucleósidos de la transcriptasa inversa (INTIs) e inhibidores de la proteasa (IPs) o un inhibidor no nucleósido de la transcriptasa inversa (INNTI).

30 La resistencia clínica a la quimioterapia de un tumor puede ser intrínseca o adquirida. Una resistencia intrínseca existe en el momento del diagnóstico en tumores que no responden a la quimioterapia de primera línea. La resistencia adquirida se produce en tumores que pueden responder bien al tratamiento inicial, pero que presentan un fenotipo resistente después de una recidiva. Tales tumores adquieren resistencia tanto frente a fármacos utilizados previamente como a nuevos fármacos, incluidos fármacos con estructuras y mecanismos de acción diferentes. El término MDR (resistencia a múltiples fármacos, del inglés "multidrug resistance") describe este fenómeno en el que las células tumorales se vuelven resistentes de forma cruzada a varios fármacos que no están relacionados estructuralmente, después de la exposición a un solo fármaco.

35 Los mecanismos de resistencia a múltiples fármacos son complejos y multifactoriales, debido en gran parte al alto nivel de inestabilidad genómica y a mutaciones en las células cancerosas. Ejemplos de mecanismos son la inactivación de fármacos, extrusión de fármacos por medio de bombas de la membrana celular, disminución de la entrada de fármacos, mutaciones de dianas de fármacos y fallo para iniciar la apoptosis (Bredel, 2001; Chen *et al.*, 2001; White and McCubrey, 2001; Sun *et al.*, 2001).

40 La extrusión de fármacos es particularmente común, y puede ser el resultado de la hiperexpresión de proteínas asociadas a la membrana que bombean fármacos desde el medio intracelular al extracelular. Tales bombas son frecuentemente miembros de la superfamilia de transportadores ABC (casete que se une a ATP) (Doige *et al.*, 1993). La glicoproteína P (Pgp) es un ejemplo de las mismas, y es un importante contribuyente a la MDR en una variedad de células cancerosas (Endicott *et al.*, 1989; Litman *et al.*, 2001). Otros ejemplos incluyen la proteína asociada a la MDR (MRP; Cole *et al.*, 1992), la proteína de resistencia del cáncer de mama (BCRP; Litman *et al.*, 2000) y la proteína relacionada con la resistencia pulmonar (LRP; una proteína principal de bóveda; Scheffer *et al.*, 2000). Otras proteínas transportadoras de múltiples fármacos también se han identificado en las células cancerosas (Gottesman *et al.*, 2002) y en microorganismos patógenos (Van Bambeke *et al.*, 2000).

45 La resistencia a la apoptosis (muerte celular programada) de las células tumorales inducida por agentes citotóxicos y radiación (Sellers y Fisher, 1999), es otro mecanismo común. Este mecanismo implica con frecuencia la hiperexpresión de proteínas anti-apoptóticas, como la proteína 2 de leucemia de linfocitos B (Bcl-2), Bcl-X_L, Bcl-W, A1/Bf11, Mcl-1 y las mutaciones en la proteína p53. Aunque sigue siendo difícil comprender con precisión cómo proteínas del tipo Bcl-2 ejercen sus efectos anti-apoptóticos, las proteínas se hiperexpresan en muchos tipos de cáncer incluyendo el cáncer colorrectal, de próstata y de mama (Hanada, *et al.*, 1995; Bakhshi *et al.*, 1985; Wang *et al.*, 1996). El aumento de la expresión del factor de transcripción del factor nuclear kappa B (NF-κB) también es un mecanismo importante de las células tumorales para adquirir resistencia a la quimioterapia (Wang *et al.*, 1999).

Se han identificado fármacos para contrarrestar la MDR, tales como fármacos que bloquean la acción de la glicoproteína P (List *et al.*, 1993; Miller *et al.*, 1991; Wishart *et al.*, 1992). Muchos de estos fármacos eran ineficaces en ensayos clínicos, sin embargo, debido a que se unen al plasma de pacientes, no podían llegar a su destino (Ayesh *et al.*, 1996a; Broxterman *et al.*, 1987; Lehnert *et al.*, 1996) y eran tóxicos para las células normales. El uso de ácidos nucleicos funcionales para contrarrestar la MDR también se ha intentado. Sin embargo, como se ha señalado anteriormente, los vectores existentes para este propósito son inestables o tóxicos, o plantean otros problemas graves de seguridad que impiden su uso en seres humanos (Sioud, 2004).

El documento WO 02/17852 A da a conocer una composición farmacéutica que comprende un nucleótido antisentido que se dirige a bcl-2 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

El documento US 2003/203481 A1 da a conocer minicélulas obtenidas a partir de bacterias para la entrega de compuestos a células de mamífero, y sugiere el uso de las minicélulas para el tratamiento del cáncer, incluyendo la entrega de oligonucleótidos antisentido, ribozimas o fármacos de molécula pequeña, y sugiere además el uso de un resto de direccionamiento para la entrega específica a las células diana.

El documento WO 03/033519 A da a conocer minicélulas obtenidas a partir de bacterias para la entrega de compuestos a células de mamífero.

Por consiguiente, existe una necesidad actual de herramientas y métodos para la entrega de ácidos nucleicos funcionales que reduzcan la resistencia a los fármacos, favorezcan la apoptosis y contrarresten la neoplasia en células diana.

Compendio de la invención

Para hacer frente a estas y otras necesidades, la presente invención proporciona, en un aspecto, una composición que comprende (a) una minicélula intacta obtenida a partir de bacterias que contiene una molécula de ácido nucleico funcional o un plásmido que comprende un segmento que codifica una molécula de ácido nucleico funcional, comprendiendo además dicha minicélula un ligando biespecífico, en donde dicho ligando biespecífico tiene especificidad tanto hacia un componente de la superficie en la minicélula como hacia un componente de la superficie en una célula de mamífero no fagocítica; y (b) un vehículo farmacéuticamente aceptable para la misma, en donde dicha molécula de ácido nucleico funcional se dirige al gen o al transcrito de una proteína que contribuye a la resistencia a un fármaco quimioterapéutico.

En otro aspecto, la invención proporciona una minicélula intacta obtenida a partir de bacterias que contiene una molécula de ácido nucleico funcional o un plásmido que comprende un segmento que codifica una molécula de ácido nucleico funcional, en donde la molécula de ácido nucleico funcional se dirige a un gen o a un transcrito de una proteína que favorece la resistencia a un fármaco quimioterapéutico, en donde dicha minicélula comprende además un ligando biespecífico, teniendo dicho ligando biespecífico especificidad hacia un componente de la superficie en la minicélula y un componente de la superficie en una célula de mamífero no fagocítica; para uso como un medicamento.

En un aspecto adicional, la invención proporciona una minicélula intacta obtenida a partir de bacterias que contiene una molécula de ácido nucleico funcional o un plásmido que comprende un segmento que codifica una molécula de ácido nucleico funcional, en donde la molécula de ácido nucleico funcional se dirige al gen o al transcrito de una proteína que favorece la resistencia a un fármaco quimioterapéutico, en donde dicha minicélula comprende además un ligando biespecífico, teniendo dicho ligando biespecífico especificidad hacia un componente de la superficie en la minicélula y un componente de la superficie en una célula de mamífero no fagocítica; para uso en el tratamiento de una enfermedad resistente a dicho fármaco quimioterapéutico, en donde dicha minicélula intacta se administra de forma simultánea o consecutiva a dicho fármaco quimioterapéutico para permitir que el ácido nucleico funcional disminuya la resistencia a dicho fármaco quimioterapéutico.

En otro aspecto, la invención proporciona un fármaco quimioterapéutico para uso en el tratamiento de un cáncer resistente a los fármacos, en donde una minicélula intacta obtenida a partir de bacterias que contiene una molécula de ácido nucleico funcional o un plásmido que comprende un segmento que codifica una molécula de ácido nucleico funcional, en donde la molécula de ácido nucleico funcional se dirige al gen o al transcrito de una proteína que favorece la resistencia a dicho fármaco quimioterapéutico, en donde dicha minicélula comprende además un ligando biespecífico, teniendo dicho ligando biespecífico especificidad hacia un componente de la superficie en la minicélula y un componente de la superficie en una célula de mamífero no fagocítica, que se administra de forma simultánea o consecutiva a dicho fármaco quimioterapéutico para permitir que el ácido nucleico funcional disminuya la resistencia a dicho fármaco quimioterapéutico.

La presente invención permite un método para administrar un ácido nucleico funcional, que comprende (a) proporcionar una minicélula intacta que contiene una molécula de ácido nucleico funcional o que contiene un plásmido que comprende un segmento que codifica una molécula de ácido nucleico funcional, a continuación, (b) poner en contacto la minicélula con una célula de mamífero diana, de manera que la célula de mamífero envuelve a la minicélula. Después de quedar envuelta la minicélula, la molécula de ácido nucleico funcional se libera en el citoplasma, se transporta al núcleo y se expresa en la célula diana. El plásmido mencionado anteriormente también puede contener

un elemento regulador, tal como un promotor, un terminador, un potenciador o una secuencia señal que está ligado funcionalmente con el segmento que codifica una molécula de ácido nucleico funcional. Es particularmente ventajoso para el plásmido comprender un promotor que depende de la ARN polimerasa (pol) II o pol III, tal como los promotores de la ARN polimerasa III humana 7SK, H1 y U6. Además, el plásmido puede contener un elemento informador, tal como un segmento de ácido nucleico que codifica una proteína fluorescente verde. El contacto entre la minicélula y la célula de mamífero puede ser *in vitro* o *in vivo*.

En relación con esta invención, la categoría de "ácidos nucleicos funcionales" incluye: moléculas de ARNsi que incluyen moléculas de ARNsh; moléculas de ARNmi, moléculas antisentido; y moléculas de ribozima. Preferiblemente, la molécula de ácido nucleico funcional se dirige al gen o al transcrito de una proteína que favorece la resistencia a los fármacos, inhibe la apoptosis o contribuye a un fenotipo neoplásico. Las dianas particularmente útiles que contribuyen a la resistencia a los fármacos incluyen transportadores de una casete que se une a ATP tales como glicoproteína P, MDR-2, MDR-3, BCRP, APT11a y LRP. Las dianas particularmente útiles que contribuyen a la resistencia a la apoptosis incluyen Bcl-2 (leucemia/linfoma de linfocitos B), Bcl-X_L, Al/Bfl 1, cinasa de adhesión focal y proteína p53 mutante. Otras dianas útiles son proteínas oncogénicas y proteínas supresoras de tumores mutantes.

La invención permite, además, un método para superar la resistencia a los fármacos o la resistencia a la apoptosis y para el tratamiento de un tumor maligno en un sujeto. El método comprende (a) proporcionar una minicélula intacta que contiene una molécula de ácido nucleico funcional o un plásmido que comprende un segmento que codifica una molécula de ácido nucleico funcional, en donde la molécula de ácido nucleico funcional se dirige al transcrito de una proteína que favorece la resistencia a los fármacos, (b) poner en contacto la minicélula con una célula de mamífero diana, de manera que la célula de mamífero envuelve la minicélula y (c) administrar un fármaco quimioterapéutico a la célula de mamífero diana. Preferiblemente, la etapa (c) se lleva a cabo después de las etapas (a) y (b), para permitir que el ácido nucleico funcional disminuya la resistencia al fármaco antes de la administración del fármaco. El fármaco se puede administrar por cualquier medio convencional, pero se administra preferiblemente a través de una minicélula intacta.

Como se ha indicado anteriormente, el ligando biespecífico tiene especificidad hacia un componente de la superficie en la minicélula y un componente de la superficie en la célula de mamífero, tal como un receptor. Como resultado, el ligando provoca que la minicélula se una a la célula de mamífero, la minicélula queda envuelta por la célula de mamífero y la carga útil de la minicélula se libera en el citoplasma de la célula de mamífero. En otras realizaciones de la invención, la minicélula se pone en contacto con una célula de mamífero diana que es competente para la fagocitosis o la endocitosis. El uso de ligandos biespecíficos es opcional cuando una célula diana es competente para la fagocitosis.

En la composición de la invención, la molécula de ácido nucleico funcional puede ser un ARNsh o ARNmi u otra molécula de ARNsi, una molécula antisentido o una molécula de ribozima. Preferiblemente, la molécula de ácido nucleico funcional se dirige al gen o al transcrito de una proteína que favorece la resistencia a los fármacos, inhibe la apoptosis o contribuye a un fenotipo neoplásico. Las dianas particularmente útiles que contribuyen a la resistencia a los fármacos incluyen transportadores de casete que se une a ATP, tales como glicoproteína P, MDR-2 y MDR-3. Las dianas particularmente útiles que contribuyen a la resistencia a la apoptosis incluyen Bcl-2 (leucemia/linfoma de linfocitos B), Bcl-X_L, Al/Bfl 1, cinasa de adhesión focal y proteína p53 mutante. Otras dianas útiles son proteínas oncogénicas y proteínas supresoras de tumores mutantes. El plásmido puede contener un elemento regulador, tal como un promotor, un terminador, un potenciador o una secuencia señal que está ligada funcionalmente con el segmento que codifica una molécula de ácido nucleico funcional. Además, el plásmido puede contener un elemento informador. La molécula de ácido nucleico funcional puede comprender múltiples secuencias de ARN de interferencia tales como ARNmi o ARNsh y éstas pueden ser cocistrónicas o estar expresadas por promotores distintos para permitir un silenciamiento génico simultáneo de múltiples dianas asociadas con la resistencia a los fármacos. En realizaciones preferidas, la composición contiene menos de una célula progenitora contaminante por 10⁷, 10⁸, 10⁹, 10¹⁰, 10¹¹ o 10¹² minicélulas.

La invención permite además un uso de minicélulas intactas en la preparación de un medicamento para uso en un método para superar la resistencia a los fármacos o para favorecer la apoptosis, mediante la administración del medicamento a una célula, un tejido o un órgano. En el medicamento, las minicélulas contienen una molécula de ácido nucleico funcional o un plásmido que codifica una molécula de ácido nucleico funcional, en donde la molécula de ácido nucleico funcional se dirige al transcrito de una proteína que favorece la resistencia a los fármacos o inhibe la apoptosis. La enfermedad tratada en este contexto puede ser un cáncer, por ejemplo, o una enfermedad adquirida, como SIDA y tuberculosis.

La invención ofrece mejoras significativas sobre métodos y formulaciones convencionales para la administración de ácidos nucleicos funcionales en el contexto del cáncer y el VIH (i) proporcionando vehículos seguros y estables para la administración de ácidos nucleicos funcionales, (ii) contrarrestando los mecanismos principales de resistencia a los fármacos en células enfermas, (iii) reduciendo los efectos secundarios tóxicos asociados con la superación de la resistencia a los fármacos y (iv) proporcionando vehículos dirigidos y cargados con el fármaco para tratar la enfermedad.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra el efecto de diversos tratamientos sobre la viabilidad de la línea celular de cáncer de colon humano Caco-2. Los tratamientos se muestran en el eje x (las minicélulas se designan con "M") y el porcentaje de viabilidad celular se muestra por las barras. Cada barra es la media de seis mediciones independientes y se muestra la desviación estándar de la media.

5 La Figura 2 muestra la remisión de xenoinjertos de cáncer de colon humano (Caco-2) en ratones sin pelaje (11 ratones por grupo) después de un tratamiento doble con (1) minicélulas recombinantes dirigidas que son portadoras de plásmidos que codifican ARNsh (anti-bcl2 o anti-Mdr1) y (2) minicélulas dirigidas cargadas con el fármaco quimioterapéutico irinotecán. El anticuerpo biespecífico utilizado para dirigir a la diana de células de cáncer de colon es portador de especificidad contra el antígeno O de *S. typhimurium* en un brazo y el receptor del factor de crecimiento epidérmico humano (EGFR) en el otro brazo. Las minicélulas recombinantes dirigidas se inyectaron por vía intravenosa los días 9 y 23, y las minicélulas dirigidas cargadas con irinotecán se administraron por vía intravenosa los días 15, 18, 29 y 32. Otros tratamientos de control administrados por vía intravenosa incluyen: Grupo 1 - solo tumor, Grupo 2 - irinotecán libre, Grupo 3 - ^{EGFR} minicélulas_{Iri}, Grupo 4 - ^{EGFR} minicélulas_{ARNsh-MDR-1}, Grupo 5 - ^{EGFR} minicélulas_{ARNsh-bcl-2} y Grupo 6 - ^{EGFR} minicélulas_{ARNsh-MDR-1} seguido de irino libre. El volumen del tumor se muestra en el eje y. El EEM (error estándar de la media) se muestra para cada medición.

La Figura 3 muestra la remisión de xenoinjertos de cáncer de colon humano (Caco-2) en ratones sin pelaje (11 ratones por grupo) después de un tratamiento doble con (1) minicélulas recombinantes dirigidas que son portadoras de plásmidos que codifican ARNsh (anti-bcl2 o anti-Mdr1) y (2) minicélulas dirigidas cargadas con el fármaco quimioterapéutico 5-FU. El anticuerpo biespecífico utilizado para dirigir a la diana de células de cáncer de colon es portador de especificidad contra el antígeno O de *S. typhimurium* en un brazo y el receptor del factor de crecimiento epidérmico humano (EGFR) en el otro brazo. Las minicélulas recombinantes dirigidas se inyectaron por vía intravenosa los días 9 y 23, y las minicélulas dirigidas cargadas con 5-FU los días 15, 18, 29 y 32. Otros tratamientos de control administrados por vía intravenosa incluyen: G1 - solo tumor, G2 (control), 5-FU libre (5×10^4 ng/g de peso corporal del ratón $\sim 1 \times 10^6$ ng por ratón), G3 (control), ^{EGFR} minicélulas_{5-FU}, G4 (control), ^{EGFR} minicélulas_{ARNsh-MDR-1}, G5 (control), ^{EGFR} minicélulas_{ARNsh-bcl-2}, G6 (control), ^{EGFR} minicélulas_{ARNsh-MDR-1} seguidas por ^{CMV} minicélulas_{5-FU}, G7 (control), ^{EGFR} minicélulas_{ARNsh-antisentido} seguidas de ^{EGFR} minicélulas_{5-FU}, G8 (control), ^{EGFR} minicélulas_{ARNsh-MDR-1} seguidas de 5-FU libre, G9 (expt), ^{EGFR} minicélulas_{ARNsh-MDR-1} seguidas de ^{EGFR} minicélulas_{5-FU} y G-10 (expt), ^{EGFR} minicélulas_{ARNsh-bcl-2}, seguidas de ^{EGFR} minicélulas_{5-FU}. El volumen del tumor se muestra en el eje y. El EEM se muestra para cada medición.

30 La Figura 4 muestra la remisión de xenoinjertos de cáncer de mama humano (MDA-MB-468) en ratones sin pelaje (11 ratones por grupo) después de un tratamiento doble con (1) minicélulas recombinantes dirigidas que son portadoras de plásmidos que codifican ARNsh (anti-MDR-1) y (2) minicélulas dirigidas cargadas con doxorubicina, un fármaco quimioterapéutico. El anticuerpo biespecífico utilizado para dirigir a la diana de células de cáncer de mama es portador de especificidad hacia el antígeno O de *S. typhimurium* en un brazo y EGFR humano en el otro brazo. Las minicélulas recombinantes dirigidas se inyectaron por vía intravenosa el día 21 y las minicélulas dirigidas cargadas con Dox se administraron por vía intravenosa los días 27, 34 y 41. Los tratamientos administrados por vía intravenosa incluyen: G1 - solo tumor, G2 (control), ^{EGFR} minicélulas_{Dox} y G3 (expt), ^{EGFR} minicélulas_{ARNsh-MDR-1} seguidas de ^{EGFR} minicélulas_{Dox}. El volumen del tumor se muestra en el eje y. El EEM se muestra para cada medición.

La Figura 5 muestra el efecto de las pautas de dosificación sobre la anulación de la resistencia a los fármacos y el efecto terapéutico. Los xenoinjertos de cáncer de colon humano (Caco-2) se establecieron en ratones sin pelaje y se administraron los siguientes tratamientos intravenosos: G1 - solo tumor, G2 (control), irinotecán libre, G3 (expt), ^{EGFR} minicélulas_{ARNsh-MDR-1} seguidas 96 h después por ^{EGFR} minicélulas_{Iri}, G4 (expt), ^{EGFR} minicélulas_{ARNsh-MDR-1} seguidas 120 h después por ^{EGFR} minicélulas_{Iri} y G5 (expt), ^{EGFR} minicélulas_{ARNsh-MDR-1} seguidas 144 h después por ^{EGFR} minicélulas_{Iri}. El anticuerpo biespecífico utilizado para dirigir a la diana de células de cáncer de mama era portador de especificidad contra el antígeno O de *S. typhimurium* en un brazo y EGFR humano en el otro brazo. El volumen del tumor se muestra en el eje y. El EEM se muestra para cada medición.

La Figura 6 muestra el efecto de las pautas de dosificación sobre la anulación de la resistencia a los fármacos y el efecto terapéutico. Los xenoinjertos de cáncer de colon humano (Caco-2) se establecieron en ratones sin pelaje y se administraron los siguientes tratamientos intravenosos: G1 - solo tumor, G2 (control), 5-FU libre, G3 (expt), ^{EGFR} minicélulas_{ARNsh-MDR-1} seguidas 96 h más tarde por ^{EGFR} minicélulas_{5-FU}, G4 (expt), ^{EGFR} minicélulas_{ARNsh-MDR-1} seguidas 120 h más tarde por ^{EGFR} minicélulas_{5-FU} y G5 (expt), ^{EGFR} minicélulas_{ARNsh-MDR-1} seguidas 144 h más tarde por ^{EGFR} minicélulas_{5-FU}. El anticuerpo biespecífico utilizado para dirigir a la diana de células de cáncer de mama era portador de especificidad contra el antígeno O de *S. typhimurium* en un brazo y EGFR humano en el otro brazo. El volumen del tumor se muestra en el eje y. El EEM se muestra para cada medición.

55 Descripción detallada de las realizaciones preferidas

Los inventores han descubierto que minicélulas intactas obtenidas a partir de bacterias pueden introducir con seguridad y eficacia en células de mamífero diana, cualquiera entre una variedad de ácidos nucleicos funcionales, tales como una molécula de ARNsi, una molécula de ARNmi, una ribozima o un ácido nucleico antisentido. En el contexto particular del cáncer y la infección por VIH, los inventores han encontrado que la introducción de ácidos nucleicos funcionales en las células diana, a través de minicélulas intactas, puede disminuir la resistencia a los fármacos o la

resistencia a la apoptosis en las células diana.

Los inventores también han descubierto que las minicélulas pueden transfectar secuencialmente las mismas células de mamífero diana, en particular *in vivo*, y que las minicélulas pueden administrar secuencialmente una gama de cargas útiles diferentes a las mismas células de mamífero diana. Estos descubrimientos son los primeros para cualquier vehículo de entrega macroparticulado y proporcionan, por primera vez, un método para el tratamiento de enfermedades multifactoriales complejas como el cáncer y el VIH, en donde se tienen que administrar diferentes cargas útiles terapéuticas a la misma célula antes de que se logre un efecto terapéutico. Del mismo modo, los inventores han descubierto que el complejo problema de la resistencia a los fármacos, asociado con múltiples mutaciones en diferentes genes, se puede tratar con minicélulas que introducen múltiples secuencias de ARNi en una célula hospedadora para contrarrestar la multitud de defectos genéticos y que, después de la entrega del ARNi mediada por las minicélulas, y con tiempo suficiente para silenciar génicamente las proteínas diana que median en la resistencia a los fármacos, las células cancerosas antes resistentes a los fármacos quimioterapéuticos específicos se pueden tratar eficazmente con minicélulas cargadas con los mismos fármacos. Esta es la primera demostración *in vivo* de un tratamiento eficaz contra un cáncer que no responde a todos los demás métodos de tratamiento. Se ha descubierto que la concentración de fármacos quimioterapéuticos, administrados a través de minicélulas, necesaria para tratar eficazmente las células cancerosas resistentes a los fármacos, es más de 1.000 veces menor que la del tratamiento con fármacos libres. Este es un descubrimiento sorprendente, ya que todos los métodos anteriores para anular la resistencia a los fármacos utilizando ARNi o inhibidores de las proteínas que median en la resistencia de los fármacos, todavía requerían concentraciones de fármaco que podían causar una toxicidad grave a un sujeto mamífero. Por tanto, los métodos de la invención, es decir, la administración de ARNi mediada por minicélulas seguida por la de un fármaco quimioterapéutico mediada por minicélulas, tienen capacidad para tratar el cáncer con eficacia sin una toxicidad grave.

Además, los inventores han descubierto que el serotipo de las minicélulas se puede adaptar para superar una respuesta inmune del hospedador contra las minicélulas.

La siguiente descripción resume la invención relacionada con estos descubrimientos, sin limitar la invención a las realizaciones, metodología, protocolos o reactivos descritos particulares. Del mismo modo, la terminología utilizada en esta memoria describe solamente realizaciones particulares y no limita el alcance de la invención.

I. Definiciones

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en esta descripción tienen el mismo significado que el comúnmente entendido por los expertos en la técnica relevante.

Para mayor comodidad, el significado de ciertos términos y expresiones empleadas en la memoria descriptiva, los ejemplos y las reivindicaciones adjuntas se proporcionan a continuación. Otros términos y expresiones se definen a lo largo de la memoria.

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

"Oligonucleótido antisentido" se refiere a una molécula de ácido nucleico complementaria a una porción de un transcrito génico particular que se puede hibridar con el transcrito y bloquear su traducción. Un oligonucleótido antisentido puede comprender ARN o ADN.

"Secuencia biomolecular" o "secuencia" se refiere a toda o a una porción de una secuencia polinucleotídica o polipeptídica.

"Cáncer", "neoplasia", "tumor", "malignidad" y "carcinoma", usadas de forma intercambiable en esta memoria, se refieren a células o tejidos que muestran 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 células precancerosas, malignas, premetastásicas, metastásicas y células no metastásicas.

"Complementaria" se refiere a la compatibilidad topológica o el emparejamiento de las superficies de interacción entre dos moléculas, tal como una molécula de ácido nucleico funcional y su diana. Las moléculas se pueden describir como complementarias y, además, las características de la superficie de contacto son complementarias entre sí.

"Corresponde a" o "representa" cuando se utiliza en el contexto, por ejemplo, de un polinucleótido o una secuencia que "corresponde a" o "representa" un gen, significa que una secuencia del polinucleótido está presente en el gen o en el producto génico de ácido nucleico, por ejemplo, ARNm. El polinucleótido puede estar totalmente presente dentro de un exón de una secuencia genómica del gen, o porciones diferentes de la secuencia del polinucleótido pueden estar presentes en diferentes exones, por ejemplo, de tal manera que la secuencia de polinucleótidos continua está presente en un ARNm, ya sea antes o después del corte y empalme, que es un producto de expresión del gen.

"Citocina" es un término genérico para proteínas liberadas por una población de células que actúa sobre otra población de células como mediadores intercelulares.

"Fármaco" se refiere a cualquier sustancia fisiológica o farmacológicamente activa que produce un efecto local o sistémico en animales, en particular mamíferos y seres humanos.

5 "Expresión" se refiere generalmente al proceso mediante el cual una secuencia de polinucleótidos se somete a una transcripción y traducción con éxito, de tal manera que se expresan niveles detectables de la secuencia de aminoácidos o de la proteína. En ciertos contextos en la presente memoria, la expresión se refiere a la producción de ARNm. En otros contextos, la expresión se refiere a la producción de proteína.

10 "Ácido nucleico funcional" se refiere a una molécula de ácido nucleico que, después de la introducción en una célula hospedadora, interfiere específicamente con la expresión de una proteína. En general, las moléculas de ácidos nucleicos funcionales tienen la capacidad de reducir la expresión de una proteína mediante la interacción directa con un transcrito que codifica la proteína. Las ribozimas, los ácidos nucleicos antisentido y las moléculas de ARNs, incluyendo las moléculas de ARNsh, los ARNs cortos (típicamente con menos de 400 bases de longitud) y los micro-ARNs (ARNmi) constituyen ácidos nucleicos funcionales a modo de ejemplo.

15 "Gen" se refiere a una secuencia de polinucleótidos que comprende secuencias de control y codificadoras, necesarias para la producción de un polipéptido o un precursor. El polipéptido puede estar codificado por una secuencia codificante de longitud completa o por cualquier porción de la secuencia codificante. Un gen puede constituir una secuencia codificante ininterrumpida o puede incluir uno o varios intrones, unidos por las uniones de corte y empalme apropiadas. Por otra parte, un gen puede contener una o varias modificaciones tanto en la región codificadora como en las regiones no traducidas que podrían afectar a la actividad biológica o a la estructura química del producto de expresión, a la tasa de expresión o a la forma de control de la expresión. Tales modificaciones incluyen, pero no se limitan a, mutaciones, inserciones, deleciones y sustituciones de uno o varios nucleótidos. En este sentido, tales genes modificados se pueden denominar "variantes" del gen "natural".

25 "Célula hospedadora" se refiere a una célula que se puede utilizar, o se ha utilizado, como receptor de un vector recombinante u otra transferencia de polinucleótidos, e incluye la progenie de la célula original que ha sido transfectada. La progenie de una sola célula no tiene que ser necesariamente completamente idéntica en la morfología o en el complemento de ADN genómico o total, a la progenitora original debido a una mutación natural, accidental o deliberada.

30 "Hibridación" se refiere a cualquier procedimiento a través del cual una secuencia de polinucleótido se une a una secuencia complementaria a través de un apareamiento de las bases.

"Individuo", "sujeto", "hospedador" y "paciente" utilizados indistintamente en este documento, se refieren a cualquier sujeto mamífero para el que se desea un diagnóstico, un tratamiento o una terapia. En una realización preferida, el individuo, el sujeto, el hospedador o el paciente es un ser humano. Otros sujetos pueden incluir, pero no se limitan a, ganado vacuno, caballos, perros, gatos, cobayas, conejos, ratas, primates y ratones.

35 "Marcador" se refiere a agentes que son capaces de proporcionar una señal detectable, ya sea directamente o mediante la interacción con uno o varios miembros de un sistema de producción de señales. Los marcadores que son detectables directamente y que se pueden emplear 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 radiactivos, tales como ³⁵S, ³²P, ³H, y similares, como marcadores. Los marcadores colorimétricos tales como oro coloidal o perlas de vidrio o de plástico coloreadas (por ejemplo, poliestireno, polipropileno, látex) también se pueden utilizar. Por ejemplo, véanse los documentos de patente de EE.UU. 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.

45 "Oligonucleótido" se refiere a un polinucleótido que comprende, por ejemplo, desde aproximadamente 10 nucleótidos (nt) a aproximadamente 1000 nt. Los oligonucleótidos para uso en la invención tienen preferiblemente desde aproximadamente 10 nt a aproximadamente 150 nt. El oligonucleótido puede ser un oligonucleótido de origen natural o un oligonucleótido sintético. Los oligonucleótidos se pueden modificar.

50 "Minicélula" se refiere a formas sin núcleo de células bacterianas, creadas mediante una alteración en la coordinación durante la fisión binaria, de la división celular con segregación del ADN. Las minicélulas son distintas de otras vesículas pequeñas que se generan y se liberan espontáneamente en ciertas situaciones y que, en contraste con las minicélulas, no se deben a reordenamientos genéticos específicos o a una expresión génica episódica. Para la puesta en práctica de la presente invención, es deseable que las minicélulas tengan las paredes celulares intactas ("minicélulas intactas").

55 "Oligonucleótido modificado" y "polinucleótido modificado" se refieren a oligonucleótidos o polinucleótidos con una o varias modificaciones químicas a nivel molecular de las estructuras moleculares naturales de la totalidad o de cualquiera de las bases, restos de azúcar, enlaces fosfato entre los nucleósidos, así como a moléculas que tienen sustituciones añadidas o una combinación de modificaciones en estos sitios. Los enlaces fosfato entre nucleósidos pueden ser enlaces fosfodiéster, fosfotriéster, fosforamidato, siloxano, carbonato, carboximetiléster, acetamidato, car-

bamato, tioéter, fosforamidato puenteado, fosfonato de metileno puenteado, fosforotioato, metilfosfonato, fosforoditioato, fosforotioato puenteado o enlaces sulfona internucleotídicos, o enlaces 3'-3', 5'-3', 5'-5', y combinaciones de tales enlaces similares. El enlace fosfodiéster puede estar reemplazado con un enlace sustituto, tal como fosforotioato, metilamino, metilfosfonato, fosforamidato y guanidina, y la subunidad ribosa de los polinucleótidos también puede estar sustituida (por ejemplo, fosfodiéster hexosa; ácidos nucleicos peptídicos). Las modificaciones pueden ser internas (única o repetida) o en el(los) extremo(s) de la molécula de oligonucleótido, y pueden incluir adiciones a la molécula de los enlaces fosfato entre nucleósidos, tales como modificaciones desoxirribosa y fosfato que escinden o reticulan las cadenas opuestas o las enzimas asociadas u otras proteínas. Las expresiones "oligonucleótidos modificados" y "polinucleótidos modificados" también incluyen oligonucleótidos o polinucleótidos que comprenden modificaciones en los restos de azúcar (por ejemplo, ribonucleótidos sustituidos en 3' o monómeros de desoxirribonucleótidos), cualquiera de los cuales está unido a través de enlaces 5' a 3'.

La expresión "moléculas de ácido nucleico" y el término "polinucleótidos" indican formas poliméricas de nucleótidos de cualquier longitud, tanto ribonucleótidos como desoxinucleótidos. Incluyen ADN o ARN monocatenario, bicatenario o multicatenario, ADN genómico, ADNc, híbridos de ADN-ARN o un polímero que comprende bases púricas y pirimidínicas u otras bases naturales, modificadas química o bioquímicamente, bases de nucleótidos no naturales o derivatizadas. La estructura principal de un polinucleótido puede comprender grupos de azúcar y fosfato (como se puede encontrar típicamente en el ARN o ADN), o grupos de azúcar o fosfato modificados o sustituidos. Alternativamente, la estructura principal del polinucleótido puede comprender un polímero de subunidades sintéticas tales como fosforamiditas y, por tanto, puede ser un fosforamidato de oligodeoxinucleósido o una mezcla de oligómero de fosforamidato-fosfodiéster. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y análogos de nucleótidos, uracilo, otros azúcares y grupos enlazantes, tales como fluororribosa y tioato, y ramificaciones de nucleótidos. Un polinucleótido se puede modificar adicionalmente, tal como mediante la conjugación con un componente marcador. Otros tipos de modificaciones incluyen casquetes, sustitución de uno o varios de los nucleótidos naturales con un análogo, y la introducción de medios para fijar el polinucleótido a proteínas, iones metálicos, componentes de marcado, otros polinucleótidos o un soporte sólido.

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

"Polipéptido" y "proteína", usados de forma intercambiable en esta memoria, se refieren a una forma polimérica de aminoácidos de cualquier longitud, que puede incluir aminoácidos traducidos, sin traducir, modificados químicamente, modificados bioquímicamente y derivatizados. Un polipéptido o una proteína puede ser de origen natural, recombinante o sintética, o cualquier combinación de los mismos. Además, un polipéptido o una proteína puede comprender un fragmento de una proteína o un péptido de origen natural. Un polipéptido o una proteína puede ser una sola molécula o puede ser un complejo multimolecular. Además, tales polipéptidos o proteínas pueden tener estructuras principales peptídicas modificadas. Los términos incluyen proteínas de fusión que incluyen proteínas de fusión con una secuencia de aminoácidos heteróloga, fusiones con secuencias líder heterólogas y homólogas, con o sin residuos de metionina N-terminal, proteínas marcadas inmunológicamente y similares.

"Purificado" se refiere a un compuesto que se retira de su entorno natural y al menos está exento aproximadamente en un 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,9% o 99,99% de otros componentes con los que está asociado de forma natural.

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

"ARN de interferencia" (ARNi) se refiere a la supresión específica de una secuencia o específica de un gen, de la expresión génica (síntesis de proteínas) que está mediada por ARN corto de interferencia (ARNsi), ARN de horquilla corta, ARN corto o micro-ARN.

"Identidad de secuencia" se refiere a un grado de similitud o complementariedad. Es posible que haya identidad parcial o identidad completa. Una secuencia parcialmente complementaria es una que inhibe al menos parcialmente una secuencia idéntica para hibridarse con un polinucleótido diana; se refiere al uso de la expresión funcional "sustancialmente idéntica". La inhibición de la hibridación de la secuencia completamente complementaria con la secuencia diana se puede examinar usando un ensayo de hibridación (transferencia Southern o Northern, hibridación en solución y similares) en condiciones poco rigurosas. Una secuencia o una sonda sustancialmente idéntica competirá e inhibirá la unión (es decir, la hibridación) de una secuencia o una sonda completamente idéntica con la secuencia diana, en condiciones poco rigurosas. Esto no quiere decir que las condiciones poco rigurosas son de tal modo que se permite una unión no específica; las condiciones poco rigurosas requieren que la unión de dos secuencias entre sí sea una interacción específica (es decir, selectiva). La ausencia de unión no específica se puede someter a ensayo mediante el uso de una segunda secuencia diana que carece incluso de un grado parcial de complementariedad (por ejemplo, menos de aproximadamente un 30% de identidad); en ausencia de unión no específica, la sonda no se hibridará con la segunda secuencia diana no complementaria.

Otra forma de visualizar la identidad de secuencia, en el contexto de dos secuencias de ácidos nucleicos o de po-

lipéptidos, implica residuos de referencia en las dos secuencias que son iguales cuando se alinean con una correspondencia máxima en una región determinada. Tal como se utiliza en esta memoria, "porcentaje de identidad de secuencia" significa el valor determinado al comparar dos secuencias alineadas óptimamente sobre una ventana de comparación, en donde la porción de la secuencia de polinucleótidos en la ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (es decir, huecos), en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o deleciones) para una alineación óptima de las dos secuencias. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en las que aparece la base de ácido nucleico idéntica en ambas secuencias, para proporcionar el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes por el número total de posiciones en la ventana de comparación y multiplicando el resultado por 100, para proporcionar el porcentaje de identidad de la secuencia.

"ARN corto de interferencia" (ARNsi) se refiere a moléculas de ARN bicatenario, en general, desde aproximadamente 10 a aproximadamente 30 nucleótidos de longitud, que son capaces de mediar en la interferencia por ARN (ARNi). Tal como se utiliza en esta memoria, el término ARNsi incluye ARNs de horquilla corta, también conocidos como ARNsh.

Los términos "tratamiento", "tratando", "tratar" y similares se refieren a la obtención de un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado. El efecto puede ser profiláctico en términos de prevenir completa o parcialmente una enfermedad o un síntoma de la misma y/o puede ser terapéutico en términos de una estabilización o curación parcial o completa de una enfermedad y/o un efecto adverso atribuible a la enfermedad. "Tratamiento" incluye cualquier tratamiento de una enfermedad en un mamífero, particularmente un ser humano, e incluye: (a) evitar que la enfermedad o el síntoma aparezca en un sujeto que puede estar predispuesto a la enfermedad o al síntoma pero que todavía no se ha diagnosticado que lo tenga; (b) inhibir el síntoma de la enfermedad, es decir, detener su desarrollo; o (c) aliviar el síntoma de la enfermedad, es decir, provocar la remisión de la enfermedad o del síntoma.

II. Administración de ácidos nucleicos funcionales a través de minicélulas

Como se ha indicado anteriormente, la invención permite un método para administrar un ácido nucleico funcional a una célula diana, que comprende (a) proporcionar una minicélula intacta que contiene una molécula de ácido nucleico funcional o un plásmido que comprende un segmento que codifica una molécula de ácido nucleico funcional, después, (b) poner en contacto la minicélula con una célula de mamífero diana, de manera que la célula de mamífero envuelve a la minicélula. Después de envolver la minicélula, la molécula de ácido nucleico funcional se libera en el citoplasma de la célula diana o es expresada por la célula diana. Las minicélulas se pueden poner en contacto con las células de mamífero diana a través de ligandos biespecíficos, como se describe en el documento WO 2005/056749. El contacto entre la minicélula y la célula de mamífero diana puede ser *in vitro* o *in vivo*.

A. Minicélulas

Las minicélulas de la invención son formas sin núcleo de *E. coli* o de otras células bacterianas, creadas mediante una alteración en la coordinación, durante la fisión binaria, de la división celular con segregación del ADN. La replicación cromosómica procariota está ligada a la fisión binaria normal, lo que implica la formación de un tabique celular medio. 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 celulares durante la división celular, lo que da como resultado la producción de una célula hija normal y una minicélula anucleada. Véase de Boer *et al.*, 1992; Raskin & de Boer, 1999; Hu y Lutkenhaus, 1999; Harry, 2001. Las minicélulas son distintas de otras vesículas pequeñas que se generan y se liberan espontáneamente en ciertas situaciones y, en contraste con las minicélulas, no se deben a reordenamientos genéticos específicos o a expresión génica episódica. Para la puesta en práctica de la presente invención, es deseable que las minicélulas tengan las paredes celulares intactas ("minicélulas intactas").

Además de mutaciones del operón *min*, las minicélulas anucleadas también se generan después de una serie de otros reordenamientos genéticos o mutaciones que afectan a la formación del tabique, por ejemplo, en el *divIVB1* en *B. subtilis*. Véase Reeve y Cornett, 1975; Levin *et al.*, 1992. Las minicélulas también se pueden formar después de una alteración de los niveles de expresión génica de proteínas implicadas en la división celular/segregación cromosómica. Por ejemplo, la hiperexpresión de *minE* produce una división polar y la producción de minicélulas. Del mismo modo, minicélulas sin cromosomas pueden ser el resultado de defectos en la segregación cromosómica, por ejemplo, la mutación *smc* en *Bacillus subtilis* (Britton *et al.*, 1998), la deleción *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 proporcionar *en trans*. Cuando se hiperexpresa a partir de un plásmido con un número elevado de copias, por ejemplo, *CafA* se puede aumentar la tasa de la división celular y/o inhibir la partición de cromosomas después de la replicación (Okada *et al.*, 1994), dando como resultado la formación de células encadenadas y minicélulas anucleadas (Wachi *et al.*, 1989; Okada *et al.*, 1993). Las minicélulas se pueden preparar a partir de cualquier célula bacteriana de origen Gram positivo o Gram negativo.

De acuerdo con la invención, las minicélulas contienen un ácido nucleico funcional o un plásmido que codifica un ácido nucleico funcional, que se desea administrar. Las moléculas de ácidos nucleicos "funcionales" de la invención tienen la capacidad de reducir la expresión de una proteína mediante la interacción directa con un transcrito que codifica la proteína. Moléculas de ARNsi, ribozimas y ácidos nucleicos antisentido constituyen ácidos nucleicos fun-

cionales a modo de ejemplo.

B. Moléculas de ARNsi

Las moléculas de ARN de interferencia corto (ARNsi) son útiles para la realización de la interferencia mediante ARN (ARNi), un mecanismo de silenciamiento génico post-transcripcional. El ARNsi generalmente se refiere a moléculas de ARN bicatenario de aproximadamente 10 a aproximadamente 30 nucleótidos de longitud que reciben su nombre por su capacidad para interferir específicamente con la expresión de una proteína. Preferiblemente, las moléculas de ARNsi tienen 12-28 nucleótidos de longitud, más preferiblemente 15-25 nucleótidos de longitud, aún más preferiblemente 19-23 nucleótidos de longitud y lo más preferiblemente 21-23 nucleótidos de longitud. Por lo tanto, las moléculas de ARNsi preferidas tienen 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 28 o 29 nucleótidos de longitud.

La longitud de una cadena se refiere a la longitud de una molécula de ARNsi. Por ejemplo, un ARNsi que se describe con una longitud de 21 ribonucleótidos (un 21-mero) podría comprender dos hebras opuestas de ARN que se aparean entre sí con 19 pares de bases contiguas. Los dos ribonucleótidos restantes en cada hebra formarían un "saliente". Cuando un ARNsi contiene dos cadenas de longitudes diferentes, la cadena más larga especifica la longitud del ARNsi. Por ejemplo, un ARNds que contiene una cadena que tiene 21 nucleótidos de longitud y una segunda cadena que tiene 20 nucleótidos de longitud, constituye un 21-mero.

Los ARNsi que comprenden un saliente son deseables. El saliente puede estar en el extremo 5' o el extremo 3' de una cadena. Preferiblemente, está en el extremo 3' de la cadena de ARN. La longitud de un saliente puede variar, pero preferiblemente es de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 bases, y más preferiblemente tiene una longitud de aproximadamente 2 nucleótidos. Preferiblemente, el ARNsi de la presente invención comprenderá un saliente 3' de aproximadamente 2 a 4 bases. Más preferiblemente, el saliente 3' tiene una longitud de 2 ribonucleótidos. Incluso más preferiblemente, los 2 ribonucleótidos que comprenden el saliente 3' son uridina (U).

De acuerdo con la invención, el término ARNsi incluye ARNs de horquilla corta (ARNsh). Los ARNsh comprenden una sola hebra de ARN que forma una estructura de tallo-bucle, en donde el tallo consiste en las cadenas codificadoras y no codificadoras (antisentido) complementarias que comprenden un ARNsi bicatenario, y el bucle es un enlazador de tamaño variable. La estructura del tallo de los ARNsh tiene generalmente una longitud de aproximadamente 10 a aproximadamente 30 nucleótidos. Preferiblemente, el tallo de moléculas de ARNsh tiene una longitud de 12-28 nucleótidos, más preferiblemente de 15-25 nucleótidos, aún más preferiblemente de 19-23 nucleótidos y lo más preferiblemente de 21-23 nucleótidos. Por lo tanto, las moléculas de ARNsh preferidas comprenden tallos que tienen una longitud de 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 o 29 nucleótidos.

Los ARNsi de la invención están diseñados para interactuar con una secuencia de ribonucleótidos diana, lo que significa que se complementan lo suficiente con una secuencia diana para hibridarse con la secuencia diana. En una realización, la invención proporciona una molécula de ARNsi que comprende una secuencia de ribonucleótidos que tiene una identidad de al menos 70%, 75%, 80%, 85% o 90% con una secuencia de ribonucleótidos diana o el complemento de una secuencia de ribonucleótidos diana. Preferiblemente, la molécula de ARNsi tiene una identidad de al menos 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% con la secuencia de ribonucleótidos diana o el complemento de la secuencia de ribonucleótidos diana. Lo más preferiblemente, un ARNsi será idéntico en un 100% a la secuencia de nucleótidos diana o al complemento de la secuencia de ribonucleótidos. Sin embargo, las moléculas de ARNsi con inserciones, deleciones o mutaciones puntuales aisladas, en relación con una diana también pueden ser eficaces.

Las herramientas para facilitar el diseño de ARNsi están disponibles al público. Por ejemplo, una herramienta de diseño de ARNsi por ordenador, se encuentra disponible en internet en www.dharmacon.com.

C. Ribozimas

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

En la actualidad se conocen seis variedades básicas de ARNs enzimáticos de origen natural. Cada uno puede catalizar la hidrólisis de enlaces fosfodiéster de ARN en trans (y por ello, puede escindir otras moléculas de ARN) en condiciones fisiológicas. En general, los polinucleótidos enzimáticos actúan en primer lugar uniéndose a un ARN diana. Tal unión se produce a través de la porción que se une a la diana de un polinucleótido enzimático que se conserva muy próximo a una porción enzimática de la molécula que actúa para escindir el ARN diana. Por lo tanto, el polinucleótido enzimático primero reconoce y después se une a un ARN diana a través de un apareamiento de bases complementarias, y una vez que se ha unido en el sitio correcto, actúa enzimáticamente para cortar el ARN diana. La escisión estratégica de un ARN diana de este tipo destruirá su capacidad para dirigir la síntesis de una proteína codificada. Después de que un polinucleótido enzimático se ha unido y ha escindido su ARN diana, se libera de ese ARN para buscar otra diana y se puede unir repetidamente y escindir nuevas dianas.

La naturaleza enzimática de una ribozima es ventajosa. Debido a que una única molécula de ribozima es capaz de

escindir muchas moléculas de ARN diana, las concentraciones eficaces de ribozima pueden ser bastante bajas.

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

- 5
- 10 Las ribozimas de la invención pueden comprender oligonucleótidos modificados (por ejemplo, para mejorar la estabilidad, el direccionamiento, etc.). Las secuencias de ácido nucleico que codifican las ribozimas pueden estar bajo el control de un promotor constitutivo fuerte, tal como, por ejemplo, el promotor de la ARN polimerasa II o la ARN polimerasa III, de modo que las células transfectadas producirán cantidades suficientes de ribozima para destruir mensajeros endógenos diana e inhibir la traducción.

15 **D. Oligonucleótidos antisentido**

Los oligonucleótidos antisentido de la invención se hibridan específicamente con un ácido nucleico que codifica una proteína, e interfieren con la transcripción o la traducción de la proteína. En una realización, un oligonucleótido antisentido se dirige al ADN e interfiere con su replicación y/o transcripción. En otra realización, un oligonucleótido antisentido se hibrida específicamente con ARN, incluyendo pre-ARNm y ARNm. Tales oligonucleótidos antisentido pueden afectar, por ejemplo, a la translocación del ARN al sitio de traducción de proteínas, a la traducción de la proteína a partir del ARN, al corte y empalme del ARN para producir una o varias especies de ARNm y a la actividad catalítica que puede estar implicada o facilitada por el ARN. El efecto global de tal interferencia es modular, disminuir o inhibir la expresión de la proteína diana.

- 20

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

- 25

Otro sitio para que se produzca la interacción antisentido es el codón de terminación del marco de lectura abierto. Las expresiones "región de codón de detención" y "región de codón de terminación de la traducción" se refieren en general a una porción de un ARNm o gen de este tipo que incluye desde al menos aproximadamente 25 nucleótidos hasta al menos aproximadamente 50 nucleótidos contiguos en cualquier dirección a partir de un codón de terminación de la traducción.

- 30

El marco de lectura abierto o la región codificadora también puede ser una diana a la que se dirige con eficacia. El marco de lectura abierto se entiende generalmente que se refiere a la región entre el codón de iniciación de la traducción y el codón de terminación de la traducción. Otra región diana es la región 5' no traducida, que es la porción de un ARNm en dirección 5' desde el codón de iniciación de la traducción. Incluye los nucleótidos entre el sitio 5' del casquete y el codón de iniciación de la traducción de un ARNm o los nucleótidos correspondientes en el gen.

- 35

De manera similar, la región 3' no traducida se puede usar como diana para oligonucleótidos antisentido. La región 3' no traducida es la porción del ARNm en dirección 3' desde el codón de terminación de la traducción, y por lo tanto incluye los nucleótidos entre el codón de terminación de la traducción y el extremo 3' de un ARNm o los nucleótidos correspondientes del gen.

- 40

Un oligonucleótido antisentido también se puede dirigir a la región 5' del casquete de un ARNm. El casquete 5' comprende un residuo de guanosina metilada en N7 unido al residuo más 5' del ARNm a través del enlace 5'-5' trifosfato. La región 5' del casquete se considera que incluye la estructura del casquete 5', así como los primeros 50 nucleótidos adyacentes al casquete.

- 45

Aunque algunos transcritos de ARNm eucariotas se traducen directamente, muchos contienen una o varias regiones de intrones, que se escinden de un transcrito antes de que se traduzca. Las regiones de exones restantes (y por lo tanto traducidas) se empalman entre sí para formar una secuencia de ARNm continua. Los sitios de empalme del ARNm, es decir, las uniones intrón-exón, representan posibles regiones diana, y son particularmente útiles en situaciones en las que un corte y empalme aberrante está implicado en una enfermedad, o cuando una producción en exceso de un producto de corte y empalme de ARNm particular, está implicada en una enfermedad. Además, uniones de fusiones aberrantes debido a reordenamientos o deleciones, son también posibles dianas para oligonucleótidos antisentido.

- 50
- 55

Con estos diversos sitios diana en mente, se deben seleccionar los oligonucleótidos antisentido que sean suficientemente complementarios a los polinucleótidos diana. Tiene que haber un grado suficiente de complementariedad o

de apareamiento preciso, de tal manera que se produzca una unión estable y específica entre el oligonucleótido y la diana polinucleotídica. Es importante destacar que la secuencia de un oligonucleótido antisentido no tiene que ser complementaria en un 100% a la de su polinucleótido diana para que se pueda hibridar específicamente. Un oligonucleótido antisentido se puede hibridar específicamente cuando la unión del oligonucleótido antisentido con la diana polinucleotídica interfiere con la función normal del polinucleótido diana para provocar una pérdida de utilidad, y existe un grado de complementariedad suficiente para evitar una unión no específica del oligonucleótido antisentido a secuencias que no sean diana, en condiciones en las que se desea una unión específica, es decir, condiciones fisiológicas en el caso de ensayos *in vivo* o un tratamiento terapéutico, y en el caso de ensayos *in vitro*, en condiciones en las que se realizan los ensayos.

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

Los oligonucleótidos antisentido usados de acuerdo con esta invención se pueden preparar convenientemente y de forma rutinaria mediante la técnica bien conocida de síntesis en fase sólida. El equipamiento para esa síntesis lo venden varios comerciantes incluyendo, por ejemplo, Applied Biosystems (Foster City, CA). Cualquier otro medio para una síntesis de este tipo conocido en la técnica se puede emplear adicional o alternativamente. Es bien conocido el uso de técnicas similares para preparar oligonucleótidos tales como los fosforotioatos y derivados alquilados.

E. Ácidos nucleicos que codifican ácidos nucleicos funcionales

En realizaciones preferidas de la invención, las minicélulas comprenden ácidos nucleicos que codifican ácidos nucleicos funcionales. Por ejemplo, un plásmido puede codificar un ácido nucleico funcional que se expresa en el interior de células de mamífero diana. Esto hace posible la entrega endógena de ácidos nucleicos funcionales, lo que tiene ventajas con respecto a la naturaleza transitoria de la entrega exógena.

Por lo tanto, las minicélulas intactas recombinantes pueden ser portadoras de ADN plasmídico que codifica una o varias secuencias de ARNsi con el fin de silenciar genes de resistencia a los fármacos o de resistencia a la apoptosis. Con el uso de minicélulas que codifican múltiples ácidos nucleicos funcionales, es posible tratar células que expresan múltiples mecanismos de resistencia a los fármacos. Diferentes secuencias de ARNsi se pueden expresar individualmente a partir de diferentes promotores. Por ejemplo, un ARNsi dirigido al ARNm de Pgp, se puede expresar a partir del promotor U6 y un ARNsi dirigido al ARNm de Bcl-2 se puede expresar a partir del promotor H1. Preferiblemente un único plásmido es portador de estas casetes de expresión múltiple, pero también pueden estar sobre diferentes plásmidos. Diferentes secuencias de ARNsi también se pueden expresar a partir de un único promotor, en donde el plásmido recombinante es portador de una casete de expresión que consta de múltiples secuencias que codifican ARNsi, que están unidas entre sí a través de secuencias de polinucleótidos no codificantes. Un único terminador de la transcripción génica se puede colocar aguas abajo de la casete de expresión completa.

En una estrategia, un plásmido codifica las cadenas sentido y antisentido de un ARNsi como dos transcritos independientes que, después de la expresión dentro de una célula diana, se hibridan para formar dúplex de ARNsi funcionales. En una segunda estrategia preferida, un plásmido codifica uno o varios ARNsi en donde cada uno se expresa como un solo transcrito que forma una estructura de tallo-bucle de ARN de horquilla corta. La estructura de horquilla se puede procesar en ARNsi funcional a través de una enzima Dicer.

F. Elementos informadores

Una molécula de ácido nucleico que se va a introducir a través de la metodología de la presente invención puede incluir un elemento informador. Un elemento informador confiere a su hospedador recombinante un fenotipo fácilmente detectable o característico, típicamente mediante la codificación de un polipéptido, que no es producido de otro modo por el hospedador, el cual se puede detectar después de la expresión mediante un análisis histológico o *in situ*, tal como mediante técnicas de formación de imágenes *in vivo*. Por ejemplo, un elemento informador entregado por una minicélula intacta de acuerdo con la presente invención, podría codificar una proteína que produjera, en la célula hospedadora que envuelve, un cambio colorimétrico o fluorométrico que fuera detectable mediante un análisis *in situ* y que fuera una función cuantitativa o semicuantitativa de la activación transcripcional. Son ilustrativas de estas proteínas las esterases, fosfatasas, proteasas y otras enzimas, cuya actividad genera un cromóforo o un fluoróforo detectable.

Los ejemplos preferidos son β -galactosidasa de *E. coli* que efectúa un cambio de color mediante la escisión de un sustrato indigogénico, indolil- β -D-galactósido y una luciferasa que oxida un aldehído de cadena larga (luciferasa bacteriana) o un ácido carboxílico heterocíclico (luciferina), con la liberación simultánea de luz. También es útil en este contexto un elemento informador que codifica la proteína fluorescente verde (GFP) de la medusa, *Aequorea victoria*, según lo descrito por Prasher *et al.* (1995). El campo de la tecnología relacionada con la GFP se ilustra en dos documentos de solicitudes PCT publicadas, WO 095/21191 (describe una secuencia de polinucleótidos que codifica una apoproteína de GFP de 238 aminoácidos, que contiene un cromóforo formado a partir de los aminoácidos 65 a 67) y WO 095/21191 (describe una modificación del ADNc para el apopéptido de la GFP de *A. victoria*, proporcionando un péptido que tiene las propiedades fluorescentes modificadas), y por un informe de Heim *et al.*

(1994) sobre una GFP mutante, caracterizada por un incremento de 4 a 6 veces de la amplitud de la excitación.

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

Otros genes para emplear como un elemento informador incluyen aquellos que pueden transformar una minicélula hospedadora para expresar antígenos de diferenciación de la superficie celular, por ejemplo, proteínas de la envuelta vírica tales como gp120 del VIH o gD del virus del herpes, que son fácilmente detectables mediante inmunoensayos.

10 **G. Elementos reguladores**

Una molécula de ácido nucleico que se va a introducir a través de la metodología de la presente invención, también puede tener un segmento codificador deseado ligado funcionalmente a un elemento regulador, tal como un promotor, un terminator, un potenciador y/o una secuencia señal. Un promotor adecuado puede ser específico de un tejido o incluso específico de un tumor, tal como determina el contexto terapéutico.

15 Un promotor es "específico de un tejido" cuando se activa preferentemente en un tejido dado y, por lo tanto, es eficaz para dirigir la expresión en el tejido diana de una secuencia estructural ligada funcionalmente. La categoría de los promotores específicos de un tejido incluye, por ejemplo: el promotor específico de hepatocitos para la albúmina y la antitripsina α_1 , respectivamente; la región de control del gen de la elastasa I, que es activa en células acinares pancreáticas; la región de control del gen de la insulina, activa en células beta pancreáticas; la región de control del virus del tumor mamario de ratón, que es activa en células testiculares, de mama, linfoides y mastocitos; la región de control del gen de la proteína básica de la mielina, activa en oligodendrocitos en el cerebro; y la región de control del gen de la hormona de liberación gonadotrópica, que es activa en células del hipotálamo. Véase Frain *et al.* (1990), Ciliberto *et al.* (1985), Pinkert *et al.* (1987), Kelsey *et al.* (1987), Swift *et al.* (1984), MacDonald (1987), Hanahan (1985), Leder *et al.* (1986), Readhead *et al.* (1987) y Mason *et al.* (1986).

25 También hay promotores que se expresan preferentemente en ciertas células tumorales o en células tumorales *per se*, y que son útiles para tratar diferentes tipos de cáncer, de acuerdo con la presente invención. La clase de promotores que son específicos de células cancerosas se ilustra con: el promotor de tirosinasa, para dirigir a la diana de melanomas; el promotor MUC1/Df3, para dirigir a la diana de carcinoma de mama; el potenciador *myoD*/promotor SV40 híbrido, que se dirige a la expresión de rhabdomyosarcoma (RMS); el promotor del antígeno carcinoembrionario (CEA), que es específico de células que expresan CEA, tales como células de cáncer de colon, y el promotor del gen de la hexocinasa de tipo II, para dirigir a la diana de carcinomas de pulmón de células no pequeñas. Véanse Hart (1996), Morton y Potter (1998), Kurane *et al.* (1998) y Katabi *et al.* (1999).

Los promotores que son dependientes de la ARN polimerasa (pol) II o pol III son promotores preferidos. Los promotores muy preferidos son los promotores de la ARN polimerasa III H1 y U6.

35 Se puede utilizar una secuencia señal, de acuerdo con la presente invención, para efectuar la secreción de un producto de expresión o la localización de un producto de expresión en un compartimento celular particular. Por lo tanto, una molécula de polinucleótido terapéutica que se entrega a través de minicélulas intactas puede incluir una secuencia señal, en un marco de lectura apropiado, de modo que el producto de expresión de interés es secretado por una célula que envuelve o su progenie, para influir de este modo sobre las células circundantes, de acuerdo con el paradigma del tratamiento seleccionado. Secuencias señal ilustrativas incluyen la secuencia de secreción de hemolisina C-terminal, descrita en el documento de patente de EE.UU. n° 5.143.830, la secuencia de secreción BAR1, descrita en el documento de patente de EE.UU. n° 5.037.743 y la porción de la secuencia señal del polipéptido zsig32, descrita en el documento de patente de EE.UU. n° 6.025.197.

40 **H. Dianas de ácidos nucleicos funcionales**

45 Los ácidos nucleicos funcionales de la invención se dirigen al gen o al transcrito de una proteína que favorece la resistencia a los fármacos, inhibe la apoptosis o favorece un fenotipo neoplásico. La aplicación exitosa de las estrategias de ácidos nucleicos funcionales en estos contextos se han logrado en la técnica, pero sin los beneficios de vectores de minicélulas. Véase, por ejemplo, Sioud (2004), Caplen (2003), Wu *et al.* (2003), Nieth *et al.* (2003), Caplen y Mousses (2003), Duxbury *et al.* (2004), Yagüe *et al.* (2004), Duan *et al.* (2004),

50 Las proteínas que contribuyen a la resistencia a los fármacos constituyen dianas preferidas de los ácidos nucleicos funcionales. Las proteínas pueden contribuir a la resistencia a los fármacos adquirida o a la resistencia a los fármacos intrínseca. Cuando las células enfermas, tales como células tumorales, responden inicialmente a los fármacos, pero se vuelven refractarias en ciclos de tratamiento posteriores, se adquiere el fenotipo resistente. Las dianas útiles implicadas en la resistencia a los fármacos adquirida incluyen transportadores de casete de unión a ATP como glicoproteína P (P-gp, P-170, PGY1, MDR1, ABCB1, proteína asociada a MDR, proteína de resistencia a múltiples fármacos 1, MDR-2 y MDR-3. MRP2 (proteína asociada a la resistencia a múltiples fármacos), BCR-ABL (región de la agrupación de puntos de ruptura - protooncogén de Abelson), proteína asociada a la resistencia STI-571, proteína

55

relacionada con la resistencia en el pulmón, ciclooxigenasa 2, factor nuclear kappa, XRCC1 (grupo 1 de complementación cruzada por rayos X), ERCC1 (gen de complementación cruzada por escisión), GSTP1 (glutación S-transferasa), β -tubulina mutante y factores de crecimiento tales como IL-6, son dianas adicionales implicadas en la resistencia a los fármacos adquirida. Cuando las células que no se han tratado previamente no responden a uno o varios fármacos, el fenotipo resistente es intrínseco. Un ejemplo de una proteína que contribuye a la resistencia intrínseca es LRP (proteína relacionada con la resistencia en pulmón).

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, A1/Bfl 1, cinasa de adhesión focal y proteína p53 mutante.

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

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

Debido a la heterogeneidad de las células tumorales, una variedad de diferentes vías de resistencia a los fármacos o de resistencia a la apoptosis puede ser operativa en las células diana. Por lo tanto, los ácidos nucleicos funcionales utilizados en los métodos de la invención pueden requerir cambios a lo largo del tiempo. Por ejemplo, si las muestras de una biopsia revelan nuevas mutaciones que dan como resultado una resistencia a los fármacos adquirida, se pueden diseñar y codificar ARNs_i específicos en un plásmido de expresión adecuado, que se transforman en una cepa bacteriana productora de minicélulas, la cual se utiliza para producir minicélulas recombinantes que se administran para hacer frente a la resistencia a los fármacos adquirida.

III. Método para superar la resistencia a los fármacos y tratamiento de enfermedades

En otro aspecto, la invención permite un método para superar la resistencia a los fármacos y el tratamiento de una enfermedad, tal como cáncer o SIDA, en un sujeto. El método comprende (a) proporcionar una minicélula intacta que contiene una molécula de ácido nucleico funcional o un plásmido que comprende un segmento que codifica una molécula de ácido nucleico funcional, en donde la molécula de ácido nucleico funcional se dirige al gen o al transcrito de una proteína que favorece la resistencia a los fármacos, (b) poner en contacto la minicélula con una célula de mamífero diana, de manera que la célula de mamífero envuelve la minicélula y (c) administrar un fármaco a la célula de mamífero diana. Preferiblemente, la etapa (c) se lleva a cabo después de las etapas (a) y (b), para permitir que el ácido nucleico funcional reduzca la resistencia a los fármacos antes de la administración del fármaco. La administración del fármaco y la introducción del ácido nucleico funcional puede tener lugar consecutivamente, en cualquier orden o simultáneamente.

De acuerdo con la invención, los fármacos se pueden administrar a través de cualquier medio convencional. Por ejemplo, los fármacos se pueden administrar por vía oral, parenteral (incluyendo la vía subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal y por infusión), tópica, transdérmica o por inhalación. El modo apropiado de administración y la dosificación de cada fármaco pueden ser determinadas fácilmente por los expertos en las técnicas médicas.

A. Administración de fármacos a través de minicélulas

A pesar de que la administración de fármacos puede ocurrir a través de medios convencionales, se prefiere la administración a través de minicélulas. En este sentido, los inventores han descubierto que las mismas células de mamífero se pueden transfectar de nuevo con éxito a través de minicélulas intactas dirigidas que se cargan con diferentes cargas útiles. Por ejemplo, minicélulas cargadas con plásmido que codifica ARNs_i pueden transfectar una célula de mamífero, después de lo cual las minicélulas cargadas con los fármacos pueden entregar los fármacos a la misma célula de mamífero. Este descubrimiento fue una sorpresa, e indica que los procesos intracelulares asociados con una ruptura de la minicélula, la liberación endosómica de una carga útil y la salida de la carga útil en dianas intracelulares sigue siendo completamente funcional después de la primera ronda de transfección y entrega de la carga útil.

El fármaco se puede cargar en una minicélula distinta que el ácido nucleico o plásmido funcional que codifica el ácido nucleico funcional. Alternativamente, el fármaco se puede cargar en la misma minicélula que la molécula de ácido nucleico funcional o el plásmido que codifica la molécula de ácido nucleico funcional. Ciertos fármacos pueden interactuar con ácidos nucleicos y evitar la carga conjunta del fármaco y el ácido nucleico en la misma minicélula. Por ejemplo, se sabe que la doxorrubicina interacciona con el ADN.

Preferiblemente, las minicélulas de la invención contienen una cantidad suficiente de fármaco para ejercer un efecto fisiológico o farmacológico del fármaco sobre una célula diana. También preferiblemente, los fármacos contenidos

dentro de las minicélulas son heterólogos o ajenos a las minicélulas, lo que significa que las células bacterianas progenitoras de las minicélulas normalmente no producen el fármaco.

Los fármacos hidrófilos e hidrófobos se pueden cargar en minicélulas mediante la creación de un gradiente de concentración del fármaco entre un medio extracelular que contiene las minicélulas y el citoplasma de las minicélulas. Cuando el medio extracelular contiene una concentración de fármaco mayor que el citoplasma de las minicélulas, el fármaco se desplaza de forma natural con este gradiente de concentración, dentro del citoplasma de las minicélulas. Sin embargo, cuando el gradiente de concentración se invierte, el fármaco no se desplaza hacia el exterior de las minicélulas.

Para cargar las minicélulas con fármacos que normalmente no son solubles en agua, inicialmente los fármacos se pueden disolver en un disolvente apropiado. Por ejemplo, el paclitaxel se puede disolver en una mezcla 1:1 de etanol y cremofor EL (aceite de ricino polietoxilado), seguido de una dilución en PBS para obtener una solución de paclitaxel que se diluye parcialmente en medios acuosos y es portadora de cantidades mínimas del disolvente orgánico para asegurar que el fármaco permanece en solución. Las minicélulas se pueden incubar en este medio final para cargar el fármaco. Por lo tanto, los inventores han descubierto que incluso los fármacos hidrófobos pueden difundir dentro del citoplasma de las minicélulas para lograr una carga de fármacos elevada y terapéuticamente significativa en el citoplasma. Esto es inesperado porque la membrana de las minicélulas está compuesta por una bicapa fosfolípida hidrófoba, de la cual se esperaría que evitara la difusión de moléculas hidrófobas en el citoplasma.

Otro método para cargar las minicélulas con un fármaco implica cultivar una célula bacteriana progenitora recombinante en condiciones en las que la célula bacteriana progenitora transcribe y traduce un ácido nucleico que codifica el fármaco, de tal manera que el fármaco se libera en el citoplasma de la célula bacteriana progenitora. Por ejemplo, una agrupación de genes que codifica la ruta biosintética celular de un fármaco deseado se puede clonar y transferir a una cepa bacteriana progenitora que es capaz de producir minicélulas. La transcripción y la traducción genética de la agrupación de genes da como resultado la biosíntesis del fármaco dentro del citoplasma de las células bacterianas progenitoras, llenando con el fármaco el citoplasma bacteriano. Cuando la célula bacteriana progenitora se divide y forma minicélulas en la progenie, las minicélulas también contienen el fármaco en su citoplasma. Las minicélulas cargadas previamente se pueden purificar mediante cualquiera de los procesos de purificación de minicélulas conocidos en la técnica y descritos anteriormente.

De forma similar, otro método para cargar las minicélulas con un fármaco implica cultivar una minicélula recombinante que contiene un plásmido de expresión que codifica el fármaco, en condiciones tales que el gen que codifica el fármaco se transcribe y se traduce en la minicélula.

B. Fármacos

Los fármacos útiles en la invención pueden ser cualquier sustancia fisiológica o farmacológicamente activa que produce un efecto local o sistémico deseado en animales, particularmente mamíferos y seres humanos. Los fármacos pueden ser compuestos inorgánicos u orgánicos, sin limitación, incluyendo péptidos, proteínas, ácidos nucleicos y pequeñas moléculas, cualquiera de los cuales puede estar caracterizado o no caracterizado. Pueden presentarse en diversas formas, tales como moléculas sin cambios, complejos moleculares, sales farmacológicamente aceptables, tales como clorhidrato, bromhidrato, sulfato, laurato, palmitato, fosfato, nitrito, nitrato, borato, acetato, maleato, tartrato, oleato, salicilato y similares. Para los fármacos ácidos se pueden utilizar sales de metales, aminas o cationes orgánicos, por ejemplo, amonio cuaternario. También se pueden usar derivados de fármacos, tales como bases, ésteres y amidas. Un fármaco que es insoluble en agua se puede utilizar en una forma que sea un derivado soluble en agua del mismo, o como una base derivada del mismo, que en cualquier caso o debido a su administración, se convierte por medio de enzimas, se hidroliza por el pH corporal o por otros procesos metabólicos, en la forma terapéuticamente activa original.

Los fármacos útiles incluyen agentes quimioterapéuticos, agentes inmunosupresores, citocinas, agentes citotóxicos, compuestos nucleolíticos, isótopos radiactivos, receptores y enzimas activadoras de profármacos, que pueden ser de origen natural o estar producidos por métodos recombinantes.

Los fármacos que se ven afectados por la resistencia clásica a múltiples fármacos tienen una utilidad particular en la invención, tales como alcaloides de la vinca (por ejemplo, vinblastina y vincristina), las antraciclinas (por ejemplo, doxorubicina y daunorrubicina), inhibidores de la transcripción de ARN (por ejemplo, actinomomicina-D) y fármacos estabilizantes de microtúbulos (por ejemplo, paclitaxel). (Ambudkar *et al.*, 1999)

En general, los agentes para la quimioterapia contra el cáncer son fármacos preferidos. Los fármacos para la quimioterapia contra el cáncer útiles incluyen mostazas de nitrógeno, nitrosorueas, etilenimina, alcanosulfonatos, tetrazina, compuestos de platino, análogos de pirimidina, análogos de purina, antimetabolitos, análogos de folato, antraciclinas, taxanos, alcaloides de la vinca, inhibidores de la topoisomerasa y agentes hormonales. Fármacos para la quimioterapia a modo de ejemplo son actinomomicina-D, alkerán, Ara-C, anastrozol, asparaginasa, BiCNU, bicalutamida, bleomicina, busulfán, capecitabina, carboplatino, carboplatino, carmustina, CCNU, clorambucilo, cisplatino, claudribina, CPT-11, ciclofosfamida, citarabina, citosina arabinósido, citoxán, dacarbazina, dactinomomicina, daunorrubicina, dexrazoxano, docetaxel, doxorubicina, DTIC, epirubicina, etilenimina, etopósido, floxuridina, fludarabina, fluo-

5 rouracilo, flutamida, fotemustina, gemcitabina, herceptin, hexametilamina, hidroxurea, idarrubicina, ifosfamida, irinotecán, lomustina, mecloretamina, melfalán, mercaptopurina, metotrexato, mitomicina, mitotano, mitoxantrona, oxaliplatino, paclitaxel, pamidronato, pentostatina, plicamicina, procarbazona, rituximab, esteroides, estreptozocina, STI-571, estreptozocina, tamoxifeno, temozolomida, tenipósido, tetrazina, tioguanina, tiotepa, tomudex, topotecán, treosulfán, trimetrexato, vinblastina, vincristina, vindesina, vinorelbina, VP-16 y Xeloda.

10 Los fármacos útiles para la quimioterapia contra el cáncer también incluyen agentes alquilantes tales como tiotepa y ciclofosfamida; alquil sulfonatos como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas tales como benzodopa, carboquona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamelaminas que incluyen altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilentiofosforamida y trimetilolomelamina; mostazas nitrogenadas tales como clorambucil, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembiehin, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitroureas como canustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina y ranimustina; antibióticos tales como aclacinomisininas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, caliqueamicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromoinicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina, epirubicina, esorrubicina, idambicina, marcelomicina, mitomicinas, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina y zorrubicina; antimetabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina y trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina y tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxiluridina, encitabina, floxuridina y 5-FU; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestanol, mepitioestano y testolactona; antiadrenales tales como aminoglutetimida, mitotano y trilostano; reforzador de ácido fólico tal como ácido frolinico; aceglatona; aldofosfamida glicósido; ácido aminolevulínico; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquona; elfornitina; acetato de eliptinio; etoglucido; nitrato de galio; hidroxurea; lentinán; lonidamina; mitoguazona; mitoxantrona; mopidamol; nitracrina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procarbazona; PSK[®]; razoxano; sizofrán; espirogermanio; ácido tenuazónico; triaziquona; 2,2',2"-triclorotrietilamina; uretano; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxoides, por ejemplo, paclitaxel (TAXOL[®], Bristol-Myers Squibb Oncología, Princeton, NJ) y doxetaxel (Taxotere[®], Rhone-Poulenc Rorer, Antony, Francia); clorambucil; gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina, metotrexato, análogos de platino tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina; platino, etopósido (VP-16); ifosfamida; mitomicina C; mitoxantrona; vincristina, vinorelbina; navelbina; novantrona; tenipósido; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; CPT-11; inhibidor de la topoisomerasa 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 hormonal sobre tumores tales como antiestrógenos que incluyen, por ejemplo, tamoxifeno, raloxifeno, 4(5)-imidazoles que inhiben la aromatasas, 4 hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, onapristona y toremifeno (Fareston); y antiandrógenos como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida y goserelina; y sales, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores farmacéuticamente aceptables.

40 Los fármacos útiles también incluyen citocinas. Ejemplos de tales citocinas son lincinas, monocinas y hormonas polipeptídicas tradicionales. Entre las citocinas se encuentran las hormonas de crecimiento tales como la hormona de crecimiento humano, N-metionil-hormona de crecimiento humano y hormona de crecimiento bovina; hormona paratiroidea; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; prorelaxina; hormonas de glicoproteínas, tales como hormona estimulante del folículo (FSH), hormona estimulante del tiroides (TSH) y hormona luteinizante (LH); factor de crecimiento hepático; factor de crecimiento de fibroblastos; prolactina; lactógeno placentario; factor de necrosis tumoral α y β ; sustancia inhibidora mulleriana; péptido asociado a la gonadotropina de ratón; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular; integrina; trombopoyetina (TPO); factores de crecimiento nervioso, tales como NGF- β ; factor de crecimiento plaquetario; factores de crecimiento transformante (TGFs) tales como TGF- α y TGF- β ; factor de crecimiento similar a insulina I y II; eritropoyetina (EPO); factores osteoinductores; interferones tales como interferón- α , β y γ ; factores estimulantes de colonias (CSFs) tales como CSF de macrófagos (M-CSF); granulocito-macrófago-CSF (GM-CSF); y CSF de granulocitos (G-CSF); interleucinas (IL) tales como IL-1, IL-1a, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12, IL-15; un factor de necrosis tumoral tal como TNF- α o TNF- β ; y otros factores polipeptídicos que incluyen LIF y el ligando kit (KL). Tal y como se usa en esta memoria, la citocina tern incluye proteínas procedentes de fuentes naturales o de cultivos celulares recombinantes y equivalentes biológicamente activos de las citocinas de secuencia natural.

55 Los fármacos pueden ser profármacos, activados posteriormente a través de una enzima activadora de profármaco que convierte un profármaco tal como un agente quimioterapéutico peptídico, a un fármaco anticancerígeno activo. Véanse, por ejemplo, los documentos WO 88/07378; WO 81/01145; Patente de EE.UU: n° 4.975.278. En general, el componente enzimático incluye cualquier enzima capaz de actuar sobre un profármaco de tal forma que lo convierte en su forma citotóxica más activa.

60 **IV. Dirigir minicélulas a células de mamífero específicas**

De acuerdo con la invención, una minicélula se dirige a una célula de mamífero diana a través de un ligando biespecífico, tal y como se describe en el documento WO 2005/056749. El ligando biespecífico, que tiene especificidad

tanto hacia los componentes de la minicélula como los de las células de mamífero, hace que la minicélula se una a la célula de mamífero, de modo que la minicélula queda envuelta por la célula de mamífero, y la célula de mamífero produce la molécula de ácido nucleico funcional. Este método de administración dirigida se puede realizar *in vivo* o *in vitro*, o ambos, *in vivo* e *in vitro*.

5 La puesta en contacto del ligando biespecífico, la minicélula y la célula de mamífero se puede producir a través de una variedad de maneras diferentes. Para la administración *in vivo*, es preferible administrar una minicélula que ya tiene el ligando biespecífico fijado a ella. Por lo tanto, la minicélula, el ligando biespecífico y la célula diana se ponen todos ellos en contacto cuando el ligando biespecífico-minicélula dirigida alcanza la célula diana *in vivo*. Como alternativa, el ligando biespecífico y la minicélula se pueden administrar por separado *in vivo*.

10 El contacto entre los ligandos biespecíficos, las minicélulas y las células de mamífero también puede tener lugar durante una o varias incubaciones *in vitro*. En una realización, los tres elementos se incuban juntos a la vez. Alternativamente, se pueden realizar incubaciones escalonadas. En un ejemplo de una metodología escalonada, las minicélulas y los ligandos biespecíficos se incuban juntos primero para formar ligando biespecífico-minicélulas dirigidas, que luego se incuban con las células diana. En otro ejemplo, los ligandos biespecíficos se incuban primero con las células diana, seguido de una incubación con las minicélulas. Una combinación de una o varias incubaciones *in vitro* y administraciones *in vivo* también puede poner en contacto los ligandos biespecíficos, las minicélulas y las células de mamífero diana.

Los inventores encontraron que la metodología de administración dirigida se puede aplicar ampliamente a una amplia gama de células de mamífero, incluyendo células que normalmente son refractarias a una adhesión y endocitosis específica de minicélulas. Por ejemplo, los ligandos de anticuerpos biespecíficos con especificidad antipolisacárido O en un brazo y especificidad anti-receptor de HER2, anti-receptor de EGF o anti-receptor de andrógenos en el otro brazo, unen de manera eficaz las minicélulas a los respectivos receptores en una serie de células diana no fagocíticas. Estas células incluyen las células de cáncer de pulmón, ovario, cerebro, mama, próstata y piel. Además, la unión eficaz precede a una endocitosis rápida de las minicélulas por cada una de las células no fagocíticas.

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

Los ligandos útiles en los métodos de administración dirigida de esta invención incluyen cualquier agente que se une a un componente de la superficie en una célula diana y a un componente de la superficie en una minicélula. Preferiblemente, el componente de la superficie en una célula diana es un receptor, especialmente un receptor capaz de mediar en la endocitosis. Los ligandos pueden comprender un componente de polipéptido y/o de carbohidrato. Los anticuerpos son ligandos preferidos. Por ejemplo, un anticuerpo biespecífico que es portador de especificidades dobles hacia un componente de la superficie en minicélulas intactas obtenidas a partir de bacterias y hacia un componente de la superficie en células de mamífero diana, se puede utilizar de manera eficaz para dirigir las minicélulas a las células de mamífero diana *in vitro* e *in vivo*. Los ligandos útiles también incluyen receptores, enzimas, péptidos de unión, proteínas de fusión/quiméricas y moléculas pequeñas.

La selección de un ligando particular se realiza basándose en dos criterios principales: (i) la unión específica a uno o a varios dominios en la superficie de minicélulas intactas y (ii) la unión específica a uno o varios dominios en la superficie de las células diana. Por lo tanto, los ligandos tienen preferiblemente un primer brazo que es portador de especificidad hacia una estructura de la superficie de minicélulas intactas obtenidas a partir de bacterias y un segundo brazo que es portador de especificidad hacia una estructura de la superficie de células de mamíferos. Cada uno de los brazos primero y segundo puede ser multivalente. Preferiblemente, cada brazo es monoespecífico, incluso si es multivalente.

Para la unión a minicélulas obtenidas a partir de bacterias, es deseable que un brazo del ligando sea específico del componente polisacárido O de un lipopolisacárido que se encuentra en la célula bacteriana progenitora. Otras estructuras de la superficie de minicélulas que se pueden aprovechar para la unión de un ligando incluyen polipéptidos e hidratos de carbono expuestos en la superficie celular sobre las membranas externas, tales como segmentos peptídicos expuestos en los pili, fimbrias y flagelos de la superficie celular.

Para la unión a las células diana, un brazo del ligando es específico de un componente de la superficie de una célula de mamífero. Tales componentes incluyen proteínas, péptidos y carbohidratos de la superficie celular, caracterizados o sin caracterizar. Los receptores de la superficie celular, especialmente aquellos capaces de activar la endocitosis mediada por el receptor, son componentes deseables de la superficie celular para alcanzar la diana. Tales receptores, si se hiperexpresan en la superficie de la célula diana, confieren una selectividad adicional para dirigirse a las células que se van a tratar, reduciendo de este modo la posibilidad de una entrega a células que no son diana.

A modo de ejemplo, se puede dirigir a una diana de células tumorales, células metastásicas, células vasculares,

tales como células endoteliales y células del músculo liso, células de pulmón, células de riñón, células sanguíneas, células de la médula ósea, células cerebrales, células del hígado y etc., o de precursores de cualquier célula seleccionada mediante la selección de un ligando que se une específicamente a un motivo receptor de la superficie celular en las células deseadas. Ejemplos de receptores de la superficie celular incluyen el antígeno carcinoembrionario (CEA), que se hiperexpresa en la mayoría de los carcinomas de colon, recto, mama, pulmón, páncreas y tracto gastrointestinal (Marshall, 2003); los receptores de heregulina (HER-2, *neu* o *c-erbB-2*), que se hiperexpresan frecuentemente en los cánceres de mama, ovario, colon, pulmón, próstata y cuello uterino (Hung *et al.*, 2000); el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), que está muy expresado en una variedad de tumores sólidos, incluyendo los de mama, cabeza y cuello, pulmón de células no pequeñas y próstata (Salomon *et al.*, 1995); el receptor de la asialoglicoproteína (Stockert, 1995); el receptor de transferrina (Singh, 1999); el receptor del complejo de la enzima serpina, que se expresa en hepatocitos (Ziady *et al.*, 1997); el receptor del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR), que se hiperexpresa en las células de adenocarcinoma pancreático ductal (Kleeff *et al.*, 2002); el receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR), para la terapia génica antiangiogénesis (Becker *et al.*, 2002 y Hoshida *et al.*, 2002); el receptor de folato, que se hiperexpresa selectivamente en el 90% de los carcinomas de ovario no mucinoso (Gosselin y Lee, 2002); el glicocáliz de la superficie celular (Batra *et al.*, 1994); los receptores de hidratos de carbono (Thurnher *et al.*, 1994); y el receptor de inmunoglobulinas poliméricas que es útil para la administración de genes a las células epiteliales respiratorias y es deseable para el tratamiento de enfermedades pulmonares tales como la fibrosis quística (Kaetzel *et al.*, 1997).

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

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

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

Cuando los anticuerpos, incluyendo fragmentos de anticuerpo, constituyen parte o la totalidad de los ligandos, son preferiblemente de origen humano o están modificados para ser adecuados para el uso en seres humanos. Los llamados "anticuerpos humanizados" son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Osbourn *et al.*, 2003. Se han modificado mediante manipulación genética y/o tratamiento *in vitro* para reducir su antigenicidad en un ser humano. Los métodos para humanizar anticuerpos se describen, por ejemplo, en los documentos de patente de EE.UU. n° 6.639.055, n° 5.585.089 y n° 5.530.101. En el caso más simple, los anticuerpos humanizados se forman injertando los bucles de unión a antígeno, conocidos como regiones determinantes de complementariedad (CDRs), de un AcMo de ratón en una IgG humana. Véase Jones *et al.*, 1986; Riechmann *et al.*, 1988; y Verhoeyen *et al.*, 1988. Sin embargo, la generación de anticuerpos humanizados de alta afinidad, requiere generalmente la transferencia de uno o varios residuos adicionales procedentes de las denominadas regiones estructurales (FRs) del AcMo progenitor de ratón. También se han desarrollado diversas variantes de tecnología de humanización. Véase Vaughan *et al.*, 1998.

Los anticuerpos humanos, más que los "anticuerpos humanizados", también se pueden emplear en la invención. Tienen una alta afinidad hacia sus respectivos antígenos y se obtienen de forma rutinaria a partir de fragmentos variables muy grandes de cadena sencilla (scFvs) o de genotecas de presentación en fagos de Fab. Véase Griffiths *et al.*, 1994; Vaughan *et al.*, 1996; Sheets *et al.*, 1998; de Haard y *col.*, 1999; y Knappik *et al.*, 2000.

Los ligandos útiles también incluyen anticuerpos biespecíficos de cadena sencilla, que típicamente son polipéptidos recombinantes que consisten en una porción de cadena ligera variable unida covalentemente, a través de una molécula enlazadora, a una porción de cadena pesada variable correspondiente. Véanse los documentos de patente de EE.UU. n° 5.455.030, n° 5.260.203 y n° 4.496.778. Los anticuerpos biespecíficos también se pueden preparar a través de otros métodos. Por ejemplo, se pueden crear heteroconjugados químicos mediante la unión química de anticuerpos intactos o fragmentos de anticuerpo de diferentes especificidades. Véase Karpovsky *et al.*, 1984. Sin

embargo, tales heteroconjugados son difíciles de preparar de una manera reproducible y son al menos dos veces más grandes que los anticuerpos monoclonales normales. Los anticuerpos biespecíficos también se pueden crear mediante intercambio de disulfuro, lo que implica una escisión enzimática y una reasociación de los fragmentos de anticuerpo. Véase Glennie *et al.*, 1987.

5 Debido a que los fragmentos Fab y scFv son monovalentes, tienen frecuentemente baja afinidad hacia las estructuras diana. Por lo tanto, los ligandos preferidos preparados a partir de estos componentes se preparan mediante modificación genética en forma de conjugados dímeros, trímeros o tetrámeros para aumentar la afinidad funcional. Véanse Tomlinson y Holliger, 2000; Carter, 2001; Hudson y Souriau, 2001; y Todorovska *et al.*, 2001. Tales estructuras conjugadas se pueden crear mediante entrecruzamiento químico y/o genético.

10 Los ligandos biespecíficos de la invención son preferiblemente mono-específicos en cada extremo, es decir, específicos para un solo componente sobre las minicélulas, en un extremo y específicos para un solo componente sobre las células diana, en el otro extremo. Los ligandos pueden ser multivalentes en uno o ambos extremos, por ejemplo, en 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 a Fv. 15 Asimismo, un triacuerpo es el resultado de la formación de un trímero trivalente de tres scFvs, que produce tres sitios de unión, y un tetracuerpo es el resultado de la formación de un tetrámero tetravalente de cuatro scFvs, que produce cuatro sitios de unión.

Diversos anticuerpos monoclonales humanizados, humanos y de ratón, y fragmentos de los mismos que tienen especificidad hacia receptores sobre las células de mamífero, han sido aprobados para uso terapéutico en humanos, y la lista sigue creciendo rápidamente. Véase Hudson y Souriau, 2003. Un ejemplo de un anticuerpo de este tipo que se puede utilizar para formar un brazo de un ligando biespecífico, tiene especificidad hacia HER2: Herceptin[®]; 20 Trastuzumab.

Las regiones variables de anticuerpos también se pueden fusionar con una amplia gama de dominios de proteínas. La fusión con dominios de inmunoglobulina humana tales como IgG1 CH3, añade masa y favorece la dimerización. Véase Hu *et al.*, 1996. La fusión a regiones bisagra-Fc de Ig humanas puede añadir funciones efectoras. También, la fusión a dominios proteicos heterólogos procedentes de proteínas multiméricas favorece la multimerización. Por ejemplo, la fusión de un scFv corto con hélices anfipáticas cortas se ha utilizado para producir minianticuerpos. Véase 25 Pack y Pluckthun, 1992. Los dominios procedentes de proteínas que forman heterodímeros, tales como fos/jun, se pueden utilizar para producir moléculas biespecíficas (Kostelny *et al.*, 1992) y, alternativamente, los dominios de homodimerización se pueden modificar genéticamente para formar heterodímeros a través de estrategias de ingeniería genética tales como "botón en ojal" (Ridgway *et al.*, 1996). Finalmente, las parejas de proteínas de fusión se pueden seleccionar de modo que proporcionen tanto una multimerización como una función adicional, por ejemplo, estreptavidina. Véase Dubel *et al.*, 1995. 30

V. Entrega a células competentes para fagocitosis o endocitosis

35 La invención permite además la entrega por medio de la puesta en contacto de minicélulas obtenidas a partir de bacterias con células de mamíferos que son competentes para la fagocitosis o la endocitosis. Tales células de mamífero, que son capaces de envolver células bacterianas progenitoras como a los agentes patógenos bacterianos intracelulares, envuelven del mismo modo las minicélulas, que liberan su carga útil en el citoplasma de las células de mamífero. Esta metodología de entrega se puede efectuar sin el uso de ligandos dirigidos.

40 Para envolver las minicélulas pueden estar implicados una variedad de mecanismos en un determinado tipo de célula, y la presente invención no depende de ningún mecanismo particular en este sentido. Por ejemplo, la fagocitosis es un proceso bien documentado en el que macrófagos y otras células fagocíticas, tales como neutrófilos, ingieren partículas mediante la extensión de pseudópodos sobre la superficie de la partícula hasta que la partícula está totalmente envuelta. Aunque se describe como una fagocitosis "no específica", se ha demostrado que receptores 45 específicos están implicados en el proceso. Véase Wright & Jong (1986); Speert *et al.* (1988).

Por lo tanto, una forma de fagocitosis implica la interacción entre ligandos de la superficie y receptores de ligandos localizados en las membranas de los pseudópodos (Shaw y Griffin, 1981). Esta etapa de fijación, mediada por los receptores específicos, se cree que es dependiente de las adhesinas bacterianas superficiales. Con respecto a las bacterias menos virulentas, como *E. coli* no enterotoxigénica, la fagocitosis también puede tener lugar en ausencia de 50 ligandos de superficie para los receptores de fagocitos. Véase Pikaar *et al.* (1995), por ejemplo. Por tanto, la presente invención incluye pero no se limita al uso de minicélulas que o bien poseen o carecen de adhesinas de superficie, de acuerdo con la naturaleza de sus células bacterianas progenitoras, y quedan envueltas por fagocitos (es decir, células hospedadoras "competentes para la fagocitosis"), entre los cuales los neutrófilos y los macrófagos son los tipos principales en mamíferos.

55 Otro proceso para envolver es la endocitosis, mediante la cual agentes patógenos intracelulares ejemplificados por especies del tipo *Salmonella*, *Escherichia*, *Shigella*, *Helicobacter*, *Pseudomonas* y *Lactobacilli* pueden conseguir entrar en las células epiteliales de mamífero y se replican allí. Dos mecanismos básicos a este respecto son la endocitosis dependiente de clatrina mediada por receptores, también conocida como "endocitosis con pozo revestido"

(Riezman, 1993), y la endocitosis independiente de clatrina (Sandvig y Deurs, 1994). Uno o ambos pueden estar involucrados cuando una célula competente para envolver que actúa mediante endocitosis (es decir, una célula hospedadora "competente para la endocitosis") envuelve las minicélulas de acuerdo con la invención. Las células competentes para la endocitosis, representativas son células epiteliales de la mama, enterocitos en el tracto gastrointestinal, células epiteliales del estómago, células epiteliales del pulmón y células epiteliales del tracto urinario y la vejiga.

Cuando se efectúa la entrega a una célula de mamífero competente para envolver, sin el uso de un ligando dirigido, 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 en la endocitosis sobre los enterocitos en el tracto gastrointestinal, y pueden ser adecuadas para administrar un fármaco que sea eficaz en las células de cáncer de colon. Del mismo modo, minicélulas obtenidas a partir de *Helicobacter pylori*, que son portadoras de adhesinas específicas para las células epiteliales del estómago, podrían ser adecuadas para la administración dirigida a células de cáncer de estómago. La inhalación o la insuflación puede ser ideal para administrar minicélulas intactas obtenidas a partir de especies de *Pseudomonas* que son portadoras de adhesinas reconocidas por receptores sobre las células epiteliales del pulmón. Las minicélulas obtenidas a partir de bacterias *Lactobacilli*, que son portadoras de adhesinas específicas para las células epiteliales del tracto urinario y de la vejiga, pueden ser muy adecuadas para la administración intrauretral de un fármaco contra un cáncer del tracto urinario o de la vejiga.

VI. Formulaciones

La invención incluye dentro de su alcance composiciones o formulaciones tal y como se han definido anteriormente. El ácido nucleico funcional puede ser cualquiera entre los ARNs, ribozimas o moléculas antisentido descritas en este documento. El ácido nucleico funcional también puede estar codificado por otro ácido nucleico, tal como un plásmido, como se describe en el presente documento. El ácido nucleico que codifica el ácido nucleico funcional puede tener cualquiera de los elementos reguladores o elementos informadores, tal y como se ha descrito en el presente documento.

La formulación comprende opcionalmente un fármaco, como se ha descrito en esta memoria. Preferiblemente, la minicélula de la formulación contiene el fármaco. Alternativamente, la minicélula puede contener una molécula de ácido nucleico, tal como un plásmido, que codifica el fármaco.

Las formulaciones que contienen minicélulas contienen preferiblemente menos de aproximadamente 1 célula bacteriana progenitora contaminante por 10^7 minicélulas, más preferiblemente contienen menos de aproximadamente 1 célula bacteriana progenitora contaminante por 10^8 minicélulas, incluso más preferiblemente contienen menos de aproximadamente 1 célula bacteriana progenitora contaminante por 10^9 minicélulas, todavía más preferiblemente contienen menos de aproximadamente 1 célula bacteriana progenitora contaminante por 10^{10} minicélulas y lo más preferiblemente contienen menos de aproximadamente 1 célula bacteriana progenitora contaminante por 10^{11} minicélulas.

Tal y como se ha definido anteriormente, las formulaciones también contienen un ligando biespecífico para dirigir la minicélula a una célula diana. La minicélula y el ligando pueden ser cualquiera de los descritos en este documento. Por lo tanto, la minicélula contiene un ácido nucleico que codifica un ácido nucleico funcional y el ligando biespecífico es capaz de unirse a un componente de la superficie de la minicélula y a un componente de la superficie de una célula de mamífero diana.

Una formulación que consiste esencialmente en minicélulas y, opcionalmente fármacos, de la presente invención (es decir, una formulación que incluye tales minicélulas, fármacos y ligandos con otros constituyentes que no interfieren indebidamente con el ácido nucleico o en la calidad de la composición que administra el fármaco) se puede formular de manera convencional, usando uno o varios vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables.

Las formulaciones se pueden presentar en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, ampollas o viales, o en recipientes de dosis múltiples, con o sin un conservante añadido. La formulación puede ser una solución, una suspensión o una emulsión en vehículos oleosos o acuosos, y puede contener agentes de formulación, tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Una solución adecuada es isotónica con la sangre del receptor y a modo de ejemplo es solución salina, solución de Ringer y solución de dextrosa. Alternativamente, las formulaciones pueden estar en forma de polvo liofilizado, para reconstituir con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua estéril, exenta de pirógenos o solución salina fisiológica. Las formulaciones también pueden estar en forma de una preparación de depósito. Tales formulaciones de acción prolongada se pueden administrar mediante implantación (por ejemplo, por vía subcutánea o intramuscular) o mediante inyección intramuscular.

A. Vías de administración

Las formulaciones de la invención se pueden administrar a través de diversas vías y a diversos sitios en el cuerpo de un mamífero, para lograr el(los) efecto(s) terapéutico(s) deseado(s), ya sea de forma local o sistémica. La entrega se puede realizar, por ejemplo, mediante administración oral, aplicando la formulación en una cavidad corporal, mediante inhalación o insuflación, o aplicando por vía parenteral, intramuscular, intravenosa, intraportal, intrahepática, peri-

toneal, subcutánea, intratumoral o intradérmica. El modo y el sitio de la administración depende de la localización de las células diana. Por ejemplo, se puede alcanzar la diana de células de fibrosis de manera eficaz mediante la administración inhalada de las minicélulas dirigidas. Del mismo modo, una metástasis tumoral puede ser tratada de manera más eficaz a través de una administración intravenosa de minicélulas dirigidas. El cáncer de ovario primario se puede tratar a través de la administración intraperitoneal de minicélulas dirigidas.

B. Pureza

Las minicélulas de la invención están sustancialmente exentas de células bacterianas contaminantes progenitoras. Por lo tanto, las formulaciones que contienen minicélulas de la invención contienen preferiblemente menos de aproximadamente 1 célula bacteriana progenitora contaminante por 10^7 minicélulas, contienen más preferiblemente menos de aproximadamente 1 célula bacteriana progenitora contaminante por 10^8 minicélulas, incluso más preferiblemente contienen menos de aproximadamente 1 célula bacteriana progenitora contaminante por 10^9 minicélulas, todavía más preferiblemente contienen menos de aproximadamente 1 célula bacteriana progenitora contaminante por 10^{10} minicélulas y los más preferiblemente contienen menos de aproximadamente 1 célula bacteriana progenitora contaminante por 10^{11} minicélulas.

Los métodos de purificación de minicélulas son conocidos en la técnica y se describen en el documento WO 03/033519. Uno de tales métodos combina la filtración tangencial (el flujo de alimentación es paralelo a una superficie de la membrana; Forbes, 1987) y la filtración frontal (el flujo de alimentación es perpendicular a la superficie de la membrana). Opcionalmente, la combinación de filtraciones puede estar precedida por una centrifugación diferencial, con fuerza centrífuga reducida, para retirar alguna porción de las células bacterianas y de ese modo enriquecer el sobrenadante de minicélulas.

Otro método de purificación emplea la centrifugación en gradiente de densidad en un medio biológicamente compatible. Después de la centrifugación, una banda de minicélulas se recoge del gradiente y, opcionalmente, las minicélulas se someten a nuevas series de centrifugación en gradiente de densidad para aumentar la pureza. El método puede incluir además una etapa preliminar en la que se realiza una centrifugación diferencial de la muestra que contiene las minicélulas. Cuando se realiza con fuerza centrífuga reducida, la centrifugación diferencial retirará alguna porción de las células bacterianas progenitoras, enriqueciendo de este modo el sobrenadante de minicélulas.

Los métodos de purificación particularmente eficaces explotan la filamentación bacteriana para aumentar la pureza de las minicélulas. Un método de purificación de minicélulas de este tipo puede incluir las etapas de (a) someter una muestra que contiene minicélulas a una condición que induce las células bacterianas progenitoras a adoptar una forma filamentosa, seguida de (b) filtrar la muestra para obtener una preparación de minicélulas purificada.

Los métodos de purificación de minicélulas conocidos también se pueden combinar. Una combinación muy eficaz de los métodos es la siguiente:

Etapa A: centrifugación diferencial de un cultivo de células bacterianas que produce minicélulas. Esta etapa, que se puede realizar a 2000 g durante aproximadamente 20 minutos, retira la mayoría de las células bacterianas progenitoras, dejando las minicélulas en el sobrenadante.

Etapa B: centrifugación en gradiente de densidad usando un medio de gradiente de densidad isotónico y no tóxico. Esta etapa separa las minicélulas de muchos contaminantes, incluyendo las células bacterianas progenitoras, con una pérdida mínima de minicélulas. Preferiblemente, esta etapa se repite en un método de purificación.

Etapa C: filtración tangencial a través de un filtro de $0,45 \mu\text{m}$ para reducir aún más la contaminación por células bacteriana progenitoras.

Etapa D: filamentación inducida por estrés de las células bacterianas progenitoras residuales. Esto se puede lograr sometiendo la suspensión de minicélulas a cualquiera entre varias condiciones ambientales que inducen estrés.

Etapa E: tratamiento con antibióticos para destruir las células bacterianas progenitoras.

Etapa F: filtración tangencial para eliminar contaminantes pequeños, tales como vesículas de membrana, fragmentos de membrana, residuos bacterianos, ácidos nucleicos, componentes de los medios, etc., y para concentrar las minicélulas. Se puede emplear un filtro de $0,2 \mu\text{m}$ para separar las minicélulas de contaminantes pequeños, y se puede emplear un filtro de $0,1 \mu\text{m}$ para concentrar las minicélulas.

Etapa G: filtración frontal para eliminar las células bacterianas filamentosas muertas. Un filtro de $0,45 \mu\text{m}$ se puede ser emplear en esta etapa.

Etapa H: eliminación de endotoxinas de la preparación de minicélulas. Se pueden emplear perlas magnéticas recubiertas con anti-lípido A en esta etapa.

C. Pautas de administración

En general, las formulaciones descritas en este documento se pueden usar en dosificaciones apropiadas definidas por pruebas de rutina, para obtener un efecto fisiológico óptimo, a la vez que minimizan cualquier toxicidad potencial. El régimen de dosificación se puede seleccionar de acuerdo con una variedad de factores que incluyen la edad, el peso, el sexo, el estado médico del paciente; la gravedad de la afección que se va a tratar, la vía de administración y la función renal y hepática del paciente.

Una precisión óptima para lograr concentraciones de minicélulas y fármaco dentro del intervalo que produce una eficacia máxima, con efectos secundarios mínimos, puede requerir un régimen basado en la cinética de la disponibilidad de las minicélulas y los fármacos en los sitios diana y las células diana. Una distribución, equilibrio y eliminación de una minicélula o un fármaco se puede considerar al determinar la concentración óptima para un régimen de tratamiento. Las dosificaciones de las minicélulas y los fármacos se pueden ajustar cuando se utilizan en combinación, para lograr los efectos deseados.

Además, la administración de la dosificación de las formulaciones se puede optimizar utilizando un sistema de modelo farmacocinético/farmacodinámico. Por ejemplo, se puede seleccionar uno o varios regímenes de dosificación y un modelo farmacocinético/farmacodinámico se puede utilizar para determinar el perfil farmacocinético/farmacodinámico de uno o varios regímenes de dosificación. A continuación, uno de los regímenes de dosificación para la administración se puede seleccionar de modo que logre la respuesta farmacocinética/farmacodinámica deseada, basándose en el perfil farmacocinético/farmacodinámico particular. Véase, por ejemplo, el documento WO 00/67776.

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

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 una vez al día, 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.

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

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

Las formulaciones se pueden administrar en una sola dosis diaria, o la dosificación diaria total se puede administrar en dosis divididas dos, tres o cuatro veces al día.

En un método en el que las minicélulas se administran antes de 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.

Más específicamente, 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 o 24 horas antes del 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 de la administración del fármaco. 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 del fármaco. Las minicélulas se pueden administrar al menos aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 meses antes del fármaco.

En otra opción, la minicélula se administra después del fármaco. La administración de la minicélula puede tener lugar en cualquier momento, desde varios minutos hasta varias horas después de la administración del fármaco. Alternativamente, la minicélula se puede administrar en cualquier momento, desde varias horas hasta varios días, posiblemente varias semanas hasta varios meses después del fármaco.

Los siguientes ejemplos son únicamente ilustrativos, más que limitantes, y proporcionan una comprensión más completa de la invención. Los ejemplos muestran que células tumorales resistentes a los fármacos se pueden tratar eficazmente *in vivo* mediante (1) la administración de minicélulas recombinantes dirigidas que son portadoras de secuencias de ARNi diseñado para reducir o eliminar la expresión del gen(es) que codifica la resistencia a los fármacos y (2) la administración de minicélulas dirigidas cargadas con fármacos que son portadoras del fármaco frente al cual las células cancerosas se han vuelto sensibles.

Ejemplo 1. Plásmidos de expresión de ARNsh anti-MDR1 y anti-bcl-2 y purificación de minicélulas recombinantes.

Minicélulas recombinantes que eran portadoras de plásmidos que codificaban secuencias de ARNsh (Mdr1 o bcl-2) se generaron del modo siguiente. La secuencia de ARNsh para Mdr1 utilizada en este estudio ha sido descrita por Wu *et al.*, 2003 (5'-TCGA AAGAAACCAACTGTGACTGTA gactactg TACTGACAGTTGGTTTCTT TTTT-3') (SEQ ID NO: 1) y la secuencia de ARNsh para bcl-2 utilizada ha sido descrita por Wachek *et al.*, 2003 (5' TCGATGTGGATGACTGAGTACCTGA gactactg TCAGGTACTCAGTCATCCACATTTTT-3') (SEQ ID NO: 2). Las secuencias de ARNsh respectivas se sintetizaron y se subclonaron individualmente en el plásmido IMG-800 (Imgenex Corp., San Diego, CA, EE.UU.) de modo que las secuencias se podían expresar desde el promotor U6 plasmídico. El plásmido es portador del origen de replicación de pUC que permite un número elevado de copias del plásmido en células bacterianas. Los plásmidos recombinantes se secuenciaron para asegurar que las secuencias de ARNsh eran correctas y estaban en marco para la expresión desde el promotor U6. Los plásmidos recombinantes se transformaron en la cepa *minCDE* mutante de *S. typhimurium* y las minicélulas que eran portadoras de los plásmidos se purificaron tal y como se describe en el documento US7611885. Las minicélulas recombinantes se denominaron minicélulas_{ARNsh-MDR1} y minicélulas_{ARNsh-bcl2} respectivamente.

Ejemplo 2. Demostración de la entrega del plásmido con ARNsh mediada por minicélulas recombinantes dirigidas al receptor, a células cancerosas resistentes a los fármacos y anulación de la resistencia a los fármacos *in vitro*.

Aunque los ARNsi dirigidos contra una gama de diferentes transcritos que codifican la resistencia a los fármacos han demostrado anular la resistencia a los fármacos en células cancerosas *in vitro*, el obstáculo decisivo es la entrega dirigida de los ARNsi a células cancerosas, particularmente *in vivo*. Minicélulas recombinantes que eran portadoras de plásmido con ARNsh anti-MDR1 (minicélulas_{ARNsh-MDR1}) y ARNsh control contra una secuencia de ARN sin sentido (minicélulas_{ARNsh-sin sentido}) se purificaron y se preparó un anticuerpo biespecífico que era portador de especificidades anti-antígeno O de *S. typhimurium* y anti-EGFR humano y se fijaron a las minicélulas recombinantes, tal y como se describe en el documento de solicitud de patente WO 2005/056749. Las minicélulas recombinantes dirigidas se denominaron ^{EGFR}minicélulas_{ARNsh-MDR-1} y ^{EGFR}minicélulas_{ARNsh-sin sentido}. Minicélulas cargadas con fármacos quimioterapéuticos 5-FU e irinotecán también se prepararon y se dirigieron como antes y se denominaron ^{EGFR}minicélulas_{5-FU} y ^{EGFR}minicélulas_{Irinotecán}, respectivamente.

Se seleccionó para este estudio *in vitro* la línea celular humana de cáncer de colon Caco-2 (ATCC), que es altamente resistente a irinotecán y a 5-FU, para determinar en primer lugar, si las minicélulas recombinantes dirigidas a EGFR podían entregar con éxito los plásmidos con ARNsh a las células cancerosas y en segundo lugar, si la expresión del ARNsi anti-MDR-1 podía anular la resistencia a los fármacos y hacer que las células Caco-2 fueran sensibles a minicélulas cargadas con fármaco y dirigidas a EGFR. Las células Caco-2 se sembraron a 3×10^6 células/matraz en medio esencial mínimo con 10% de suero de ternera cósmico y se incubaron durante 3 horas a 37°C, 5% de CO₂.

Las células se trataron con (a) ^{EGFR}minicélulas_{ARNsh-MDR-1} y (b) ^{EGFR}minicélulas_{ARNsh-sin sentido}. Se incluyó un matraz de control que no había recibido ningún tratamiento. Las minicélulas se añadieron con una concentración de 10^{10} por matraz y todos los matraces se incubaron durante 72 h. Las células procedentes de cada tratamiento se tripsinizaron y se sembraron a 1×10^4 células/ml/pocillo en placas de 24 pocillos y se incubaron durante 3 horas a 37°C, 5% de CO₂. Las células control sin tratar se incubaron con (6 pocillos/tratamiento) (a) irinotecán libre (25 µM), (b) 5-FU libre (25 µM), (c) ^{EGFR}minicélulas_{Irinotecán} y (d) ^{EGFR}minicélulas_{5-FU}.

Las células Caco-2 tratadas con ^{EGFR}minicélulas_{ARNsh-MDR-1} se incubaron (6 pocillos/tratamiento) con (a) ^{CMV}minicélulas_{5-FU} (no dirigidas específicamente ya que el anticuerpo biespecífico está dirigido a una proteína de la superficie de citomegalovirus), (b) irinotecán libre, (c) 5-FU libre, (d) ^{EGFR}minicélulas_{Irinotecán} y (e) ^{EGFR}minicélulas_{5-FU}. Las células Caco-2 tratadas con ^{EGFR}minicélulas_{ARNsh-sin sentido} se trataron luego con ^{EGFR}minicélulas_{5-FU}.

Todas las células se incubaron durante 72 h adicionales seguido por el ensayo colorimétrico de proliferación celular MTT (Cory *et al.*, 1991) utilizando el ensayo de proliferación celular CellTiter 96 AQueous One Solution (Promega Corp., Madison, WI, EE.UU.), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las mediciones colorimétricas se leyeron a 490 nm.

Los resultados mostraron (Fig. 1) que las células Caco-2 eran muy resistentes a los fármacos de quimioterapia de primera línea contra el cáncer de colon, es decir, irinotecán y 5-FU. Además, las células siguieron siendo resistentes después de tratamientos sucesivos con ^{EGFR}minicélulas_{Irinotecán}, ^{EGFR}minicélulas_{5-FU} y ^{EGFR}minicélulas_{ARNsh-MDR-1}. Las células que recibieron el tratamiento doble, es decir, ^{EGFR}minicélulas_{ARNsh-MDR-1} seguido de ^{EGFR}minicélulas_{Irinotecán} o ^{EGFR}minicélulas_{5-FU} mostraron que este tratamiento tenía gran éxito en la anulación de la resistencia a los fármacos y después de un tratamiento de combinación aislado, se observó > 50% de muerte celular. Por el contrario, un tratamiento doble con ^{EGFR}minicélulas_{ARNsh-sin sentido} seguido de ^{EGFR}minicélulas_{5-FU} no tuvo ningún efecto sobre la resistencia a los fármacos, lo que sugiere que la expresión del ARNsh anti-MDR-1 en las células Caco-2 era específicamente responsable de la anulación de la resistencia a los fármacos. El tratamiento de combinación de ^{EGFR}minicélulas_{ARNsh-MDR-1} seguido de irinotecán o 5-FU libre, también era eficaz para la anulación de la resistencia a los fármacos, pero en menor medida, proporcionando ~30% de reducción en la supervivencia celular. Estos datos también sugieren que con la administración de fármacos quimioterapéuticos a través de minicélulas dirigidas a receptores y cargadas con fármacos, se puede administrar de forma intracelular una concentración de fármaco más potente que en compara-

ción con el fármaco libre proporcionado en el medio extracelular.

Este resultado muestra que (a) los ARNsh se pueden administrar con eficacia a células de mamífero no fagocíticas a través de minicélulas recombinantes dirigidas a los receptores, (b) los plásmidos que codifican el ácido nucleico funcional (ARNsh) evitan los orgánulos intracelulares en donde se degradan las minicélulas, (c) el plásmido se transporta al núcleo de la célula de mamífero en donde se expresa el ARNsh, (d) el ARNsh es eficaz en la degradación del ARNm que codifica la proteína de resistencia a múltiples fármacos, MDR-1, (e) las mismas células de mamífero son receptivas a la siguiente oleada de minicélulas dirigidas a los receptores que ahora son portadoras de un fármaco en lugar de un plásmido, (f) el protocolo del tratamiento doble, es decir, la administración de ARNsh mediada por minicélulas dirigidas a los receptores seguida por la administración de fármacos quimioterapéuticos mediada por minicélulas dirigidas a los receptores es muy eficaz en la anulación de la resistencia a los fármacos en células de mamífero no fagocíticas.

Ejemplo 3. Demostración *in vivo* de una regresión tumoral lograda utilizando el método de la invención, es decir, el tratamiento doble de administración de ARNsh mediada por minicélulas dirigidas a los receptores seguida por la administración de fármacos mediada por minicélulas dirigidas a los receptores.

Este ejemplo muestra que se pueden utilizar minicélulas dirigidas a receptores para anular la resistencia a los fármacos en células cancerígenas *in vivo*.

Minicélulas obtenidas a partir de *minCDE* de *S. typhimurium* se purificaron y se cargaron con irinotecán, un fármaco quimioterapéutico. Se centrifugaron 7 x 10 minicélulas en solución BSG, el sobrenadante se retiró y las minicélulas se resuspendieron en 940 µl de BSG y 60 µl de solución de irinotecán (1 mg/ml; disuelto en agua destilada estéril). La suspensión se incubó durante una noche a 37°C con rotación para permitir que el irinotecán difundiera en el citoplasma de las minicélulas. El exceso de irinotecán fijado no específicamente a la superficie exterior de las minicélulas, se eliminó mediante lavado por ultrafiltración de las células agitadas del modo siguiente. Una celda de ultrafiltración agitada de Amicon Modelo 8010 (Millipore, Billerica, MA, EE.UU.) se montó de acuerdo con las instrucciones del fabricante con un disco de membrana de ultrafiltración (polietersulfona; corte de peso molecular 300 kDa; Millipore). La celda se lavó tres veces con agua destilada estéril, seguido por otros tres lavados con BSG. A continuación, la celda se llenó con 9 ml de BSG de nuevo aporte y se añadió la solución de 1 ml de minicélulas cargadas con irinotecán. La celda se mantuvo a una presión de 10 psi, se agitó hasta que el volumen se redujo a 5 ml y se completó con 5 ml de BSG. La ultrafiltración continuó hasta que el volumen se redujo de nuevo a 5 ml. Este procedimiento de rellenado/ultrafiltración se realizó 6 veces para permitir un lavado a fondo de las superficies exteriores de las minicélulas cargadas con irinotecán. Durante la última ultrafiltración, el volumen se redujo a 1 ml y la muestra se transfirió a un tubo de centrifuga Eppendorf estéril, seguido de centrifugación a 13.200 rpm durante 10 minutos para sedimentar las minicélulas cargadas con irinotecán.

Un anticuerpo biespecífico se construyó tal y como se ha descrito anteriormente y en el documento de solicitud de patente de EE.UU. publicada nº 2004-0265994. Resumiendo, anticuerpos monoclonales de ratón antilipopolisacárido de *S. typhimurium* (Biodesign, Saco, Maine, EE.UU.) y anti-receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) humano (Oncogene Research Products, Cambridge, MA, EE.UU.) se enlazaron con la proteína recombinante purificada A/G a través de los fragmentos Fc de cada anticuerpo monoclonal. Se seleccionó un anticuerpo monoclonal anti-EGFR porque las células xenoinjertadas eran células de cáncer de colon humano (Caco-2) que se sabe que hiperexpresan el EGFR en la superficie celular (Nyati et al., 2004).

La proteína purificada recombinante A/G (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, EE.UU.) se diluyó hasta tener una concentración final de 100 µg/ml en tampón de unión Immunopure (Pierce Biotechnology) y 0,5 ml de la solución se incubaron durante una noche a 4°C con una solución mezclada previamente que contenía 20 µg/ml de cada uno de los anticuerpos monoclonales anti-LPS de *S. typhimurium* y anti-EGFR humano. El exceso de anticuerpos no unidos a la proteína A/G se retiró después de la siguiente manera. Solución de proteínas G de Dynabeads® (Dynabeads® [2,8 µm] recubiertas con proteína G recombinante acoplada covalentemente a la superficie de las partículas magnéticas; Dynal Biotech, Oslo, Noruega) se mezcló suavemente y 100 µl de la solución se transfirieron a un tubo de centrifuga de Eppendorf. El tubo se colocó en un Dynal MPC-S (concentrador de partículas magnéticas, tipo S) para inmovilizar las perlas y el sobrenadante se eliminó. Las perlas se resuspendieron en 0,5 ml de solución de lavado que contenía tampón Na-fosfato 0,1 M (pH 5,0). La inmovilización de las perlas y las etapas de lavado se repitieron tres veces. La solución que contenía la mezcla de proteína A/G-anticuerpo biespecífico se añadió a las perlas y se incubó con agitación suave a temperatura ambiente durante 40 min. El tubo se colocó en un soporte de MPC-S para inmovilizar las perlas y la proteína A/G-anticuerpo biespecífico se retiró con una pipeta. Esta etapa eliminaba el exceso de anticuerpos monoclonales no unidos y proporcionaba una solución que era portadora del anticuerpo biespecífico ligado a la proteína A/G a través de sus fragmentos Fc. Las minicélulas recombinantes se incubaron con la proteína A/G-anticuerpo biespecífico durante 1 hora a temperatura ambiente, para recubrir las minicélulas con el anticuerpo a través de su región Fab anti-LPS.

Los ratones empleados en este ejemplo fueron adquiridos en el Centro de Recursos Animales, Perth, WA, Australia, y todos los experimentos con animales se realizaron de acuerdo con la guía de cuidado y uso de animales de laboratorio y con la aprobación del Comité de Ética Animal. Los experimentos se llevaron a cabo en la instalación para animales pequeños acreditada por NSW Agriculture en EnGeneIC Pty Ltd (Sydney, NSW, Australia). Las células de

cáncer de colon humano (Caco-2, ATCC) crecieron en cultivo de tejidos en medio RPMI 1640 complementado con 5% de suero de ternera bovino (Gibco-BRL Life Technologies, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EE.UU.) y glutamina (Invitrogen) en una atmósfera humidificada con 95% de aire y 5% de CO₂ a 37°C. Se inyectaron 1 x 10⁶ células por vía subcutánea en 50 µl de medio exento de suero junto con 50 µl de factor de crecimiento reducido Matrigel (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, EE.UU.) entre los omóplatos de cada ratón, utilizando una aguja de calibre 23. Los tumores se midieron dos veces a la semana usando un calibrador digital electrónico (Mitutoyo, Japón, precisión de 0,001) y el volumen medio del tumor se calculó utilizando la fórmula, longitud (mm) x ancho² (mm) X 0,5 = volumen (mm³). Los diferentes tratamientos se iniciaron una vez que los tumores habían alcanzado volúmenes entre 50 mm³ y 80 mm³, y los ratones fueron asignados aleatoriamente a ocho grupos diferentes de 11 ratones por grupo.

Los diversos grupos recibieron los siguientes tratamientos: **Grupo 1 (control)** no recibió tratamiento. **Grupo 2 (control)**, irinotecán libre (1,2 x 10⁴ ng/g de peso corporal del ratón ~ 2,4 x 10⁵ ng por ratón) por vía intravenosa. Este control se incluyó para confirmar los resultados *in vitro* en los que las células tumorales eran resistentes al fármaco. **Grupo 3 (control)**, minicélulas cargadas con irinotecán, dirigidas a EGFR (denominadas ^{EGFR}minicélulas_{Iri}). **Grupo 4 (control)**, ^{EGFR}minicélulas_{ARNsh-MDR-1}. **Grupo 5 (control)**, ^{EGFR}minicélulas_{ARNsh-bcl-2}. **Grupo 6 (control)**, ^{EGFR}minicélulas_{ARNsh-MDR-1} seguidas de irinotecán libre. **Grupo 7 (experimental)**, ^{EGFR}minicélulas_{ARNsh-MDR-1} seguidas de ^{EGFR}minicélulas_{Iri}. **Grupo 8 (expt.)**, ^{EGFR}minicélulas_{ARNsh-bcl-2} seguidas de ^{EGFR}minicélulas_{Iri}. Los estudios de cuantificación de irinotecán mediante HPLC mostraron que en 5 x 10⁸ minicélulas se cargaban ~ 80 ng del fármaco. Todos los tratamientos con minicélulas recibieron 5 x 10⁸ minicélulas y los tratamientos con ARNsh se administraron los días 9 y 23. Todos los tratamientos con fármacos se administraron los días 15, 18, 29 y 32. Esto permitió un intervalo de seis días entre el tratamiento con ARNsh y el tratamiento con fármaco para asegurar que había pasado suficiente tiempo para la administración intracelular y nuclear de ARNsh, la expresión génica y la supresión de la expresión de la proteína que mediaba en la resistencia a los fármacos, es decir, MDR-1 o bcl-2.

Los resultados revelaron (Fig. 2) un contraste llamativo entre los volúmenes medios tumorales en los grupos control (G 1 a 6) y los grupos experimentales (G 7 y 8). Los volúmenes de los tumores en los grupos experimentales se estabilizaron rápidamente y mostraban una estabilización significativa en la mayoría de los 11 animales en cada grupo. Por el contrario, los volúmenes medios tumorales en todos los grupos de control diferentes siguieron aumentando y 36 días después de establecer los xenoinjertos, el experimento se terminó debido a que los animales control estaban demasiado enfermos. Los animales experimentales, por el contrario, estaban sanos y no mostraron ningún efecto secundario tóxico por el tratamiento. Un análisis estadístico de los datos empleando ANOVA unidireccional mostró que los grupos experimentales (7 y 8) eran altamente significativos en comparación con los grupos de control 1 a 6 ($p = 0,0004$). Este resultado es una primera demostración de la administración dirigida *in vivo* de ARNsh para abordar el grave problema de la resistencia a los fármacos en el cáncer. El resultado también demostró que la invención tiene una aplicación general, porque dos métodos mecánicamente diferentes de resistencia a los fármacos, es decir, una bomba de proteínas hiperexpresada asociada a la membrana (MDR-1) y una proteína citoplásmica anti-apoptosis (bcl-2), pueden estar reguladas a la baja en células cancerosas resistentes a los fármacos *in vivo*. El tratamiento de las mismas células con otra oleada de minicélulas cargadas con fármacos quimioterapéuticos dirigidas a los receptores, podía tratar con eficacia este tipo de tumor.

Ejemplo 4. Segunda demostración *in vivo* de la eficacia de la regresión tumoral conseguida utilizando el método de la invención, es decir, el tratamiento doble de administración de ARNsh mediada por minicélulas seguido por la administración de fármacos mediada por minicélulas.

Las células de cáncer colorrectal también son conocidas por ser muy resistentes a otro fármaco quimioterapéutico de primera línea, 5-fluorouracilo (5-FU), y este ejemplo muestra que los métodos de la invención permiten no solo la anulación de la resistencia a los fármacos *in vivo*, sino que también permite una estabilización / remisión del tumor.

Como se ha descrito anteriormente, las minicélulas se obtuvieron a partir de una cepa mutante *minCDE* de *S. typhimurium* y se purificaron usando el procedimiento de gradiente de centrifugación / filamentación / filtración / eliminación de endotoxinas. Del mismo modo, se obtuvieron minicélulas recombinantes que eran portadoras de plásmidos con ARNsh, ARNsh-MDR-1, ARNsh-bcl-2 y ARNsh-sin sentido y se purificaron a partir de las respectivas cepas recombinantes *minCDE* de *S. typhimurium*. Las minicélulas vacías purificadas se cargaron con fármaco quimioterapéutico 5-FU como se ha descrito para irinotecán en el Ejemplo 3. El análisis por HPLC se utilizó para determinar la concentración de 5-FU cargado en las minicélulas.

Un anticuerpo biespecífico que comprendía especificidades dobles anti-EGFR humano y anti-antígeno O de *S. typhimurium* se construyó tal y como se ha descrito en el Ejemplo 3. Las minicélulas recombinantes (10¹⁰) se incubaron con el anticuerpo biespecífico durante 1 hora a temperatura ambiente, para recubrir las minicélulas con el anticuerpo a través de su región Fab anti-antígeno O.

Xenoinjertos de células cancerígenas Caco-2 se establecieron en ratones Balb/c sin pelaje y una vez que los tumores alcanzaron un volumen entre 50 mm³ y 80 mm³, los ratones fueron asignados al azar en 10 grupos ($n = 11$ ratones por grupo). Los 10 tratamientos intravenosos incluían: (a) **G1** - solo tumor control. **G2 (control)**, 5-FU libre (5 x 10⁴ ng/g de peso corporal del ratón ~ 1 x 10⁶ ng por ratón). Este control se incluyó para confirmar los resultados *in vitro* de que las células tumorales eran resistentes al fármaco. **G3 (control)**, minicélulas cargadas con 5-FU dirigidas a EGFR (denominadas ^{EGFR}minicélulas_{5-FU}). **G4 (control)**, ^{EGFR}minicélulas_{ARNsh-MDR-1}. **G5 (control)**, ^{EGFR}minicélula-

- 5 ^SARNsh-bcl-2- **G6 (control)**, ^{EGFR}minicélulas^{ARNsh-MDR-1} seguidas por ^{CMV}minicélulas^{5-FU}. El anticuerpo CMV está dirigido a una proteína de la superficie de citomegalovirus y esto sirvió como un control dirigido no específicamente. **G7 (control)**, ^{EGFR}minicélulas^{ARNsh-sin sentido} seguidas de ^{EGFR}minicélulas^{5-FU}. **G8 (control)**, ^{EGFR}minicélulas^{ARNsh-MDR-1} seguidas de 5-FU libre. **G9 (expt)**, ^{EGFR}minicélulas^{ARNsh-MDR-1} seguidas de ^{EGFR}minicélulas^{5-FU}. **G10 (expt)**, ^{EGFR}minicélulas^{ARNsh-bcl-2}, seguidas de ^{EGFR}minicélulas^{5-FU}. Los tratamientos con ARNsh se administraron los días 9 y 23 y los tratamientos con fármacos se administraron los días 15, 18, 29 y 32. Esto permitió un intervalo de seis días entre los tratamientos con ARNsh y los tratamientos con fármaco para asegurar que había transcurrido el tiempo suficiente para la entrega intracelular y nuclear de ARNsh, la expresión génica y la supresión de la expresión de la proteína que media en la resistencia a los fármacos, es decir, MDR-1 o bcl-2.
- 10 Los resultados revelaron (Fig. 3) un contraste llamativo entre los volúmenes tumorales medios en los grupos de control (G 1 a 8) y los grupos experimentales (G 9 y 10). Los volúmenes de los tumores en los grupos experimentales mostraron una estabilización significativa en la mayoría de los 11 animales en cada grupo. Por el contrario, los volúmenes tumorales medios en todos los diferentes grupos de control siguieron aumentando y 36 días después de establecer los xenoinjertos, el experimento se terminó debido a que los animales control estaban demasiado enfermos. Los animales experimentales, por el contrario, estaban sanos y no mostraron ningún efecto secundario tóxico por el tratamiento. Un análisis estadístico de los datos empleando ANOVA unidireccional mostró que los grupos experimentales (9 y 10) eran altamente significativos en comparación con los grupos de control 1 a 8 ($\rho = 0,0008$).

Ejemplo 5. Demostración *in vivo* de la regresión tumoral lograda en células de cáncer de mama humano resistentes a la doxorubicina utilizando el método de la invención.

- 20 Los inventores han mostrado que la línea celular de adenocarcinoma de mama humano, MDA-MB-468 es muy sensible a la doxorubicina y que los xenoinjertos de ratones tratados por vía intravenosa con ^{EGFR}minicélulas^{Dox} se estabilizan / remiten.

25 En este ejemplo, las células MDA-MB-468 crecieron en cultivo de tejidos y se trataron con concentraciones crecientes de Dox para desarrollar un clon resistente a Dox. Está bien establecido que un tratamiento con fármacos de este tipo regula positivamente *in vitro* e *in vivo* la expresión de proteínas de resistencia a múltiples fármacos, tales como MDR-1 y Bcl-2. Se obtuvieron varios clones resistentes a Dox y uno se utilizó para establecer un xenoinjerto en ratones Balb/c sin pelaje. Los grupos de tratamiento por vía intravenosa ($n = 11$ ratones por grupo) incluían **G2** - ^{EGFR}minicélulas^{Dox} y **G3** - ^{EGFR}minicélulas^{ARNsh-MDR-1} seguidas de ^{EGFR}minicélulas^{Dox}. Los ratones **G1** eran solo un control del tumor. El tratamiento con ARNsh se administró el día 21 y los tratamientos con fármacos se administraron los días 27, 34 y 41.

30 Los resultados mostraron (Fig. 4) que el tratamiento con ^{EGFR}minicélulas^{ARNsh-MDR-1} seguidas de ^{EGFR}minicélulas^{Dox} en ratones G3 era muy eficaz para anular la resistencia a Dox en las células cancerosas y que los tumores se estabilizaban. El tratamiento de control con ^{EGFR}minicélulas^{Dox} (G2) mostró que las células tumorales eran muy resistentes a Dox y los tumores crecieron rápidamente.

Ejemplo 6. Demostración *in vivo* del efecto de las pautas de dosificación sobre la anulación de la resistencia a los fármacos y el efecto terapéutico.

35 Este ejemplo demuestra el efecto de las pautas de dosificación sobre la anulación de la resistencia a los fármacos y el efecto terapéutico. Al permitir un tiempo suficiente para la entrega eficaz de ARNsh a las células tumorales antes de que se administren las minicélulas cargadas con fármaco dirigidas a los receptores, se mejoran los resultados. Se realizó un experimento a lo largo del tiempo, en el que se administraron ^{EGFR}minicélulas^{ARNsh-MDR-1} por vía intravenosa a ratones sin pelaje que eran portadores de un xenoinjerto de células Caco-2. En grupos distintos ($n = 11$ ratones por grupo), se administró a los ratones ^{EGFR}minicélulas^{irinotecn} 96 h (**G3**), 120 h (**G4**) o 144 h (**G5**) después del tratamiento con las ^{EGFR}minicélulas^{ARNsh-MDR-1}. **G1** y **G2** eran solo controles del tumor y de irinotecán libre ($\sim 2,4 \times 10^5$ ng/dosis). Las minicélulas se administraron a 5×10^8 por dosis y cada dosis era portadora de ~ 80 ng de irinotecán cargado en las minicélulas, que es una dosis 3000 veces menor que la administrada en forma de fármaco libre. Los resultados mostraron (Fig. 5) una clara correlación entre el tiempo permitido para la expresión de ARNsh y la posterior administración de ^{EGFR}minicélulas^{irinotecn}, siendo 144 h (G5) el tiempo más eficaz para la anulación de la resistencia a los fármacos y que lograba un efecto terapéutico significativo.

Ejemplo 7. Segunda demostración *in vivo* del efecto de las pautas de dosificación sobre la anulación de la resistencia a los fármacos y el efecto terapéutico.

50 Este ejemplo demuestra que el efecto de la pauta de dosificación observada en el ejemplo 6 se puede aplicar por lo general.

55 El experimento descrito en el ejemplo 6 se repitió con los mismos controles y grupos experimentales, excepto que G2 recibió 5-FU libre (1×10^6 ng/dosis) y que en G3, G4 y G5 el segundo tratamiento se llevó a cabo con ^{EGFR}minicélulas^{5-FU}. Las minicélulas se administraron a 1×10^9 por dosis y cada dosis era portadora de ~ 80 ng de 5-FU, es decir, ~ 12.500 veces menos que la administración de fármaco libre en ratones G2.

Los resultados mostraron (Fig. 6) que la administración de ^{EGFR}minicélulas^{5-FU} 144 horas después de la administra-

5 ción de ^{EGFR}minicélulas_{SARNsh-MDR-1} (G5) daba como resultado una eficacia máxima de la anulación de la resistencia a los fármacos y de la eficacia terapéutica. La potencia de la invención es evidente a partir de la concentración de fármaco requerido para tratar con eficacia estos tumores muy resistentes, ya que las minicélulas eran portadoras de 3000 veces y 12.500 veces menos fármaco, en comparación con tratamientos con irinotecán y 5-FU libres, respectivamente. Los fármacos libres no tenían ningún efecto sobre el crecimiento tumoral como se observa en las Figs. 5 y 6.

Referencias

- Ambudkar, et al., *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39: 361 (1999).
- Antoku, et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 286: 1003 (2001).
- 10 Ayesch et al., *Anticancer Drugs*, 7(6): 678-86 (1996)
- Ayesch et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 1316(1): 8-18 (1996)
- Bakhshi, et al., *Cell*, 41: 899 (1985).
- Bargou, et al., *Int. J. Cancer*, 60: 854 (1995).
- Batra et al., *Gene Ther.* 1(4): 255-60 (1994).
- 15 Becker et al., *Cancer Biol Ther.*, 1(5):548-53 (2002).
- Bredel, *Brain Res. Rev.*, 35: 161 (2001).
- Britton et al., *Genes Dev.*, 12: 1254 (1998).
- Broxterman et al., *Cancer Lett.*, 35(1): 87-95 (1987).
- Brummelkamp, et al., *Science* 296:550 (2002).
- 20 Caplen, *Expert Opin. Biol. Ther.*, 3(4): 575-86 (2003).
- Caplen and Mousses, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1002: 56-62 (2003).
- Carter, P. *Nat Rev Cancer*, 1(2): 118-29 (2001).
- Chen, et al., *Int. J. Cancer*, 93: 107 (2001).
- Ciliberto et al., *Cell*. 41: 531 (1985).
- 25 Cole et al., *Science* 258:1650-1654 (1992).
- Collins & Olive, *Biochem.* 2795-99 (1993).
- Cory et al., *Cancer Commun.* 3: 207-212 (1991).
- Cory, S. *Annu. Rev. Immunol.*, 13: 513-543 (1995).
- de Boer et al., *J. Bacteriol.* 174: 63 (1992).
- 30 de Haard, H. J. et al. *J. Biol. Chem.* 274, 18218-18230 (1999).
- Doige et al., *Ann. Rev. Microbiol.*, 47: 291-319 (1993).
- Dubel et al., *J. Immunol. Methods*, 178: 201-209 (1995).
- Duan et al., *Mol. Cancer Therapeutics*, 3(7): 833-38 (2004).
- Duxbury et al., *J. Am. Coll. Surg.*, 198: 953-59 (2004).
- 35 Elbashir et al., *Genes Dev.*, 15(2):188-200 (2001).
- Elbashir et al., *Nature*, 411(6836):494-8 (2001).
- Endicott et al., *Ann. Rev. Biochem.*, 58: 137-71 (1989).
- Fardel et al., *Gen Pharmacol.*, 27(8):1283-1291 (1996).
- Forbes, *Australian J. Biotechnology* 1: 30 (1987).

- Frain et al., *Mol. Cell. Biol.*, 10: 991 (1990).
- Frankel et al., *Leukemia*, 14: 576-585 (2000).
- Gariboldi et al., *Int. J. Oncology*, 22: 1057-64 (2003).
- Glennie et al., *J. Immunol.*, 139(7):2367-75 (1987).
- 5 Gosselin et al., *Biotechnol. Annu. Rev.*, 8:103-31 (2002).
- Gottesman, et al., *Nat. Rev. Cancer* 2: 48 (2002).
- Griffiths et al., *EMBO J.* 13: 3245-3260 (1994).
- Guerrier-Takada et al., *Cell*, 35: 849 (1983).
- Hampel and Tritz, *Biochem.*, 28: 4929 (1989).
- 10 Hampel et al., *Nucleic Acids Research*: 299 (1990)
- Hanada, et al., *J. Biol. Chem.*, 270: 11962 (1995).
- Hanahan, *Nature*, 315: 115 (1985).
- Hannon, *Nature (Lond.)*, 418: 244 (2002).
- Harry, *Mol. Microbiol.*, 40: 795 (2001).
- 15 Hart, *Semin. Oncol.*, 23: 154 (1996).
- Heim et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 12501 (1994).
- Hiraga et al., *J. Bacteriol.*, 171: 1496 (1989).
- Hoshida et al., *Pancreas*, 25(2):111-21 (2002).
- Hu et al., *Cancer Res.*, 56: 3055-3061 (1996).
- 20 Hu et al., *Mol. Microbiol.*, 34:82-90 (1999).
- Hunter et al., *Mol. Cell. Biol.*, 16: 877 (1996).
- Hudson & Souriau, *Expert Opin. Biol. Ther.* 1: 845-855 (2001).
- Hudson & Souriau, *Nat. Med.*, 9 (1):129-34 (2003).
- Hung et al., *Adv. Exp. Med. Biol.*, 465:171-80 (2000).
- 25 Hutvagner & Zamore, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 12: 225 (2002).
- Ireton et al., *J. Bacteriol.* 176: 5320 (1994).
- Jones et al., *Nature* 321: 522-525 (1986).
- Juliano & Ling, *Biochimica et Biophysica Acta*, 455:152 (1976).
- Kaetzel et al., *Biochem. Soc. Trans.* 25:475-480 (1997).
- 30 Karpovsky et al., *J. Exp. Med.*, 160(6):1686-701 (1984).
- Katabi et al., *Human Gene Therapy* 10: 155 (1999).
- Kelsey et al., *Genes and Devel.*, 1: 161 (1987).
- Kleeff et al., *Cancer Gene Ther.*, 9(6):522-32 (2002).
- Knappik et al., *J. Mol. Biol.* 296: 57-86 (2000).
- 35 Kostelny et al., *J. Immunol.* 148(5):1547-53 (1992).
- Kroemer, *Nat. Med.*, 3: 614 (1997).
- Kurane et al., *Jpn. J. Cancer Res.* 89: 1212 (1998).

- Leder et al., *Cell* 45: 485 (1986).
- Lehnert, *Eur. J. Cancer*, A(6): 912-20 (1996).
- Levin et al., *J. Bacteriol.*, 174: 6717 (1992).
- List , *Oncology*, 7(10): 23-8, 32, 35-38 (1993).
- 5 List et al., *J. Clin. Oncol.*, 11(9): 1652-60 (1993).
- Litman, et al., *J. Cell Sci.*, 113: 2011 (2000).
- Litman et al., *Cell Mol. Life Sci.*, 58(7): 931-59 (2001).
- MacDonald et al., *Hepatology* 7: 425 (1987).
- Mason et al., *Science* 234: 1372 (1986).
- 10 McCubrey, et al., *Cell Cycle Checkpoints and Cancer*, págs. 17-53. Georgetown, TX: Landes Bioscience, (2001a).
- McCubrey, et al., *Leukemia*, 15: 1203 (2001).
- Miller et al., *J. Clin. Oncol.*, 9(1): 17-24 (1991).
- Morton & Potter, *J. Pharmacology & Exper. Therapeutics* 286: 1066 (1998).
- Nieth et al., *FEBS Letters*, 545: 144-50 (2003).
- 15 Nyati et al., *Clin Cancer Res.* 10; 691-700 (2004).
- Okada et al., *Sci. Prog.* 77: 253 (1993-94).
- Okada et al., *J. Bacteriol.* 176: 917 (1994).
- Osbourn et al., *Drug Delivery Tech.*, 8: 845-851 (2003).
- Pack et al., *Biochemistry*, 31(6):1579-84 (1992).
- 20 Perrotta and Been, *Biochem.*, 31: 16 (1992)
- Pikaar et al., *J. Infect. Dis.* 172: 481 (1995).
- Pinkert et al., *Genes and Devel.* 1: 268 (1987).
- Prasher et al., *Trends in Genetics* 11: 320 (1995).
- Raskin & de Boer, *J. Bacteriol.* 181: 6419 (1999).
- 25 Readhead et al., *Cell* 48: 703 (1987).
- Reeve & Cornett, *J. Virol.* 15: 1308 (1975).
- Ridgway et al., *Protein Eng.*, 9(7): 617-21 (1996).
- Riezman, *Trends in Cell Biology*, 3: 330 (1993).
- Rossi et al., *Aids Research and Human Retroviruses*, 8: 183 (1992)
- 30 Salomon et al., *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 19: 183-232 (1995).
- Salveson et al., *Cell*, 91: 443 (1997).
- Sandvig & Deurs, *Trends in Cell Biology*, 4: 275 (1994).
- Sato, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 9238 (1994).
- Sattler, et al., *Science (Wash. DC)*, 275: 983 (1997).
- 35 Saville & Collins, *Cell*, 61: 685-96 (1990).
- Saville & Collins, *PNAS (USA)*, 88: 8826-30 (1991).
- Scheffer, et al., *Curr. Opin. Oncol.*, 12: 550 (2000).

- Sellers & Fisher, *J. Clin. Invest.*, 104: 1655 (1999).
- Sharp, *Genes Dev.*, 15: 485 (2001).
- Shaw & Griffen, *Nature* 289: 409 (1981).
- Sheets et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 6157-6162 (1998).
- 5 Siould, "Therapeutic siRNAs", *Trends in Pharmacological Sciences*, 25(1): 22-28 (2004).
- Speert et al., *J. Clin. Invest.*, 82: 872 (1988).
- Stewart & D'Ari, *J. Bacteriol.*, 174: 4513 (1992).
- Sun, et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 280: 788 (2001).
- Swift et al., *Cell*, 38: 639 (1984).
- 10 Thurnher et al., *Glycobiology*, 4(4):429-35 (1994).
- Todorovska et al., *J. Immunol. Methods*, 248: 47-66 (2001).
- Tomlinson & Holliger, *Methods Enzymol.*, 326: 461-479 (2000).
- Documento de patente de EE.UU. nº 3.817.837
- Documento de patente de EE.UU. nº 3.850.752
- 15 Documento de patente de EE.UU. nº 3.939.350
- Documento de patente de EE.UU. nº 3.996.345
- Documento de patente de EE.UU. nº 4.275.149
- Documento de patente de EE.UU. nº 4.277.437
- Documento de patente de EE.UU. nº 4.366.241
- 20 Documento de patente de EE.UU. nº 4.496.778
- Documento de patente de EE.UU. nº 4.987.071
- Documento de patente de EE.UU. nº 4.975.278
- Documento de patente de EE.UU. nº 5.037.743
- Documento de patente de EE.UU. nº 5.143.830
- 25 Documento de patente de EE.UU. nº 5.260.203
- Documento de patente de EE.UU. nº 5.455.030
- Documento de patente de EE.UU. nº 5.530.101
- Documento de patente de EE.UU. nº 5.585.089
- Documento de patente de EE.UU. nº 6.025.197
- 30 Documento de patente de EE.UU. nº 6.639.055
- Documento de solicitud de patente de EE.UU. publicada nº 2004-0265994
- Van Bambeke, et al., *Biochem. Pharmacol.*, 60: 457 (2000).
- Vaughan, et al., *Nature Biotechnol.*, 14: 309-314 (1996).
- Vaughan et al., *Nature Biotechnol.*, 16: 535-539 (1998).
- 35 Wachi et al., *J. Bacteriol.*, 171: 6511 (1989).
- Wang, et al., *Nat. Med.*, 5: 412 (1999).
- Wang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 7063-7068 (1996).

- White & McCubrey, *Leukemia*, 15: 1011-1021 (2001).
- Documento WO 81/01145
- Documento WO 88/07378
- Documento WO 95/21191
- 5 Documento WO 00/67776
- Documento WO 05/056749
- Wu, et al., *Cancer Res.*, 63: 1515-19 (2003).
- Wacheck, et al., *Oligonucleotides*, 13: 393 (2003).
- Wright & Jong, *Experimental Medi.*, 163: 1245 (1986).
- 10 Yague et al., *Gene Therapy*, 11: 1170-74 (2004).
- Ziady et al., *Am. J. Physiol.*, 273(2 Pt 1):G545-52 (1997).

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> ENGENEIC MOLECULAR DELIVERY PTY LTD.

<120> Administración de ácidos nucleicos funcionales a células de mamífero a través de minicélulas intactas obtenidas a partir de bacterias

5 <130> 060348-0121

<140> PCT/US05/30181
< 141> 2005-08-25

<150> 60/604,433 <151> 2004-08-26

<160> 2

10 <170> PatentIn versión 3.3

<210> 1
< 211> 59
< 212> ADN
< 213> Secuencia artificial

15 <220>
< 223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

<400> 1
tcgaaagaaa ccaactgtca gtagagta ctgta_actg acagttggtt tctttttt 59

20 <210> 2
< 211> 59
< 212> ADN
< 213> Secuencia artificial

<220>
< 223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

25 <400> 2
tcgatgtgga tgactgagta cctgagagta ctgcaggta ctgagcatc cacatttt 59

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende (a) una minicélula intacta, obtenida a partir de bacterias que contiene una molécula de ácido nucleico funcional o un plásmido que comprende un segmento que codifica una molécula de ácido nucleico funcional, comprendiendo además dicha minicélula un ligando biespecífico, en donde dicho ligando biespecífico tiene especificidad tanto hacia un componente de la superficie sobre la minicélula como hacia un componente de la superficie sobre una célula de mamífero no fagocítica; y (b) un vehículo farmacéuticamente aceptable para la misma, en donde dicha molécula de ácido nucleico funcional se dirige al gen o al transcrito de una proteína que contribuye a la resistencia a un fármaco quimioterapéutico.
2. La composición según la reivindicación 1, que comprende además un fármaco quimioterapéutico frente al cual el ácido nucleico funcional disminuye dicha resistencia a los fármacos.
3. Una minicélula intacta obtenida a partir de bacterias que contiene una molécula de ácido nucleico funcional o un plásmido que comprende un segmento que codifica una molécula de ácido nucleico funcional, en donde la molécula de ácido nucleico funcional se dirige a un gen o a un transcrito de una proteína que favorece la resistencia a un fármaco quimioterapéutico, comprendiendo además dicha minicélula un ligando biespecífico, teniendo dicho ligando biespecífico especificidad tanto hacia un componente de la superficie sobre la minicélula como hacia un componente de la superficie sobre una célula de mamífero no fagocítica; para uso como un medicamento.
4. Una minicélula intacta obtenida a partir de bacterias que contiene una molécula de ácido nucleico funcional o un plásmido que comprende un segmento que codifica una molécula de ácido nucleico funcional, en donde la molécula de ácido nucleico funcional se dirige a un gen o a un transcrito de una proteína que favorece la resistencia a un fármaco quimioterapéutico, comprendiendo además dicha minicélula un ligando biespecífico, teniendo dicho ligando biespecífico especificidad tanto hacia un componente de la superficie sobre la minicélula como hacia un componente de la superficie sobre una célula de mamífero no fagocítica; para uso en el tratamiento de una enfermedad resistente a dicho fármaco quimioterapéutico, en donde dicha minicélula intacta se administra de forma simultánea o consecutiva a dicho fármaco quimioterapéutico para permitir que el ácido nucleico funcional disminuya la resistencia a dicho fármaco quimioterapéutico.
5. La minicélula intacta obtenida a partir de bacterias según la reivindicación 4 para uso en el tratamiento de una enfermedad según la reivindicación 4, en donde dicho fármaco quimioterapéutico y dicha minicélula se administran de forma consecutiva, en cualquier orden.
6. La minicélula intacta obtenida a partir de bacterias según la reivindicación 4 para uso en el tratamiento de una enfermedad según la reivindicación 4, en donde dicho fármaco quimioterapéutico se administra después de dicha minicélula.
7. La minicélula intacta obtenida a partir de bacterias según la reivindicación 4 para uso en el tratamiento de una enfermedad según la reivindicación 4, en donde dicho fármaco quimioterapéutico y dicha minicélula se administran simultáneamente.
8. La minicélula intacta obtenida a partir de bacterias según la reivindicación 4 para uso en el tratamiento de una enfermedad según la reivindicación 4, en donde dicha enfermedad resistente a dicho fármaco quimioterapéutico se selecciona a partir de la lista que consiste en cáncer, SIDA y tuberculosis.
9. La minicélula intacta obtenida a partir de bacterias para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 3-8, en donde dicho ligando biespecífico se selecciona a partir de la lista que consiste en receptores, enzimas, péptidos de unión, proteínas de fusión/quiméricas y moléculas pequeñas.
10. La minicélula intacta obtenida a partir de bacterias para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 3-9, para administrar al menos una vez a la semana durante varias semanas hasta varios meses.
11. Un fármaco quimioterapéutico para uso en el tratamiento de una afección maligna resistente a los fármacos, en donde una minicélula intacta obtenida a partir de bacterias que contiene una molécula de ácido nucleico funcional o un plásmido que comprende un segmento que codifica una molécula de ácido nucleico funcional, en donde la molécula de ácido nucleico funcional se dirige al gen o al transcrito de una proteína que favorece la resistencia a dicho fármaco quimioterapéutico, comprendiendo además dicha minicélula un ligando biespecífico, teniendo dicho ligando biespecífico especificidad tanto hacia un componente de la superficie sobre la minicélula como hacia un componente de la superficie sobre una célula de mamífero no fagocítica, se administra de forma simultánea o consecutiva a dicho fármaco quimioterapéutico para permitir que el ácido nucleico funcional disminuya la resistencia a dicho fármaco quimioterapéutico.
12. El fármaco quimioterapéutico según la reivindicación 11 para uso en el tratamiento de una enfermedad según la reivindicación 11, en donde dicho fármaco quimioterapéutico y dicha minicélula se administran de forma consecutiva, en cualquier orden.
13. El fármaco quimioterapéutico según la reivindicación 11 para uso en el tratamiento de una enfermedad

según la reivindicación 11, en donde dicho fármaco quimioterapéutico se administra después de dicha minicélula.

14. El fármaco quimioterapéutico según la reivindicación 11 para uso en el tratamiento de una enfermedad según la reivindicación 11, en donde dicho fármaco quimioterapéutico y dicha minicélula se administran simultáneamente.

5 15. El fármaco quimioterapéutico según la reivindicación 11 para uso en el tratamiento de una enfermedad según la reivindicación 11, en donde dicha enfermedad resistente a dicho fármaco quimioterapéutico se selecciona a partir de la lista que consiste en cáncer, SIDA y tuberculosis.

10 16. El fármaco quimioterapéutico según cualquiera de las reivindicaciones 11-15 para uso en el tratamiento de una enfermedad según la reivindicación 11, en donde dicho ligando biespecífico se selecciona a partir de la lista que consiste en receptores, enzimas, péptidos de unión, proteínas de fusión/ quiméricas y moléculas pequeñas.

17. El fármaco quimioterapéutico según cualquiera de las reivindicaciones 11-16 para uso en el tratamiento de una enfermedad según la reivindicación 11, para administrar al menos una vez a la semana durante varias semanas hasta varios meses.

Figura 1

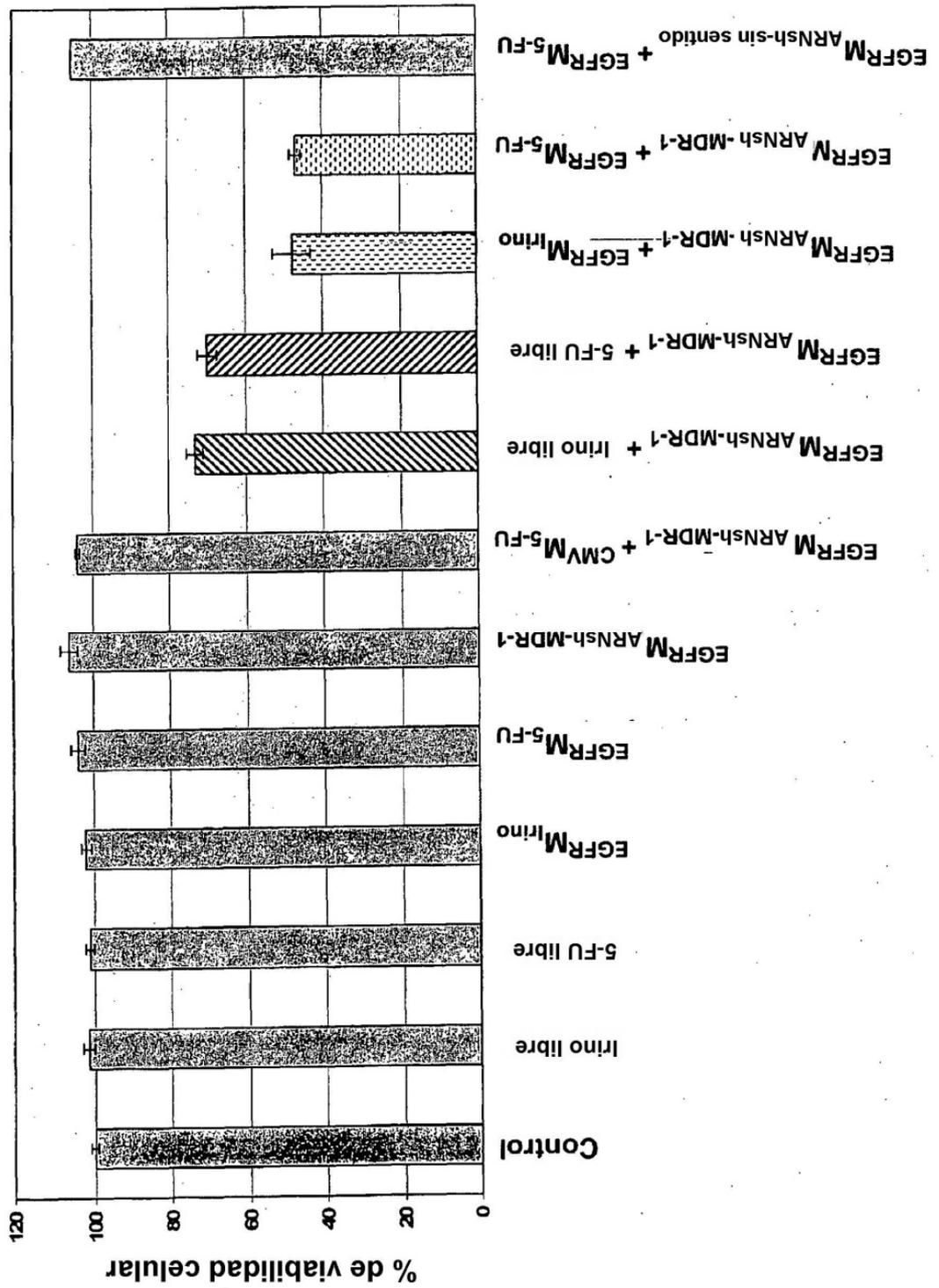


Figura 2

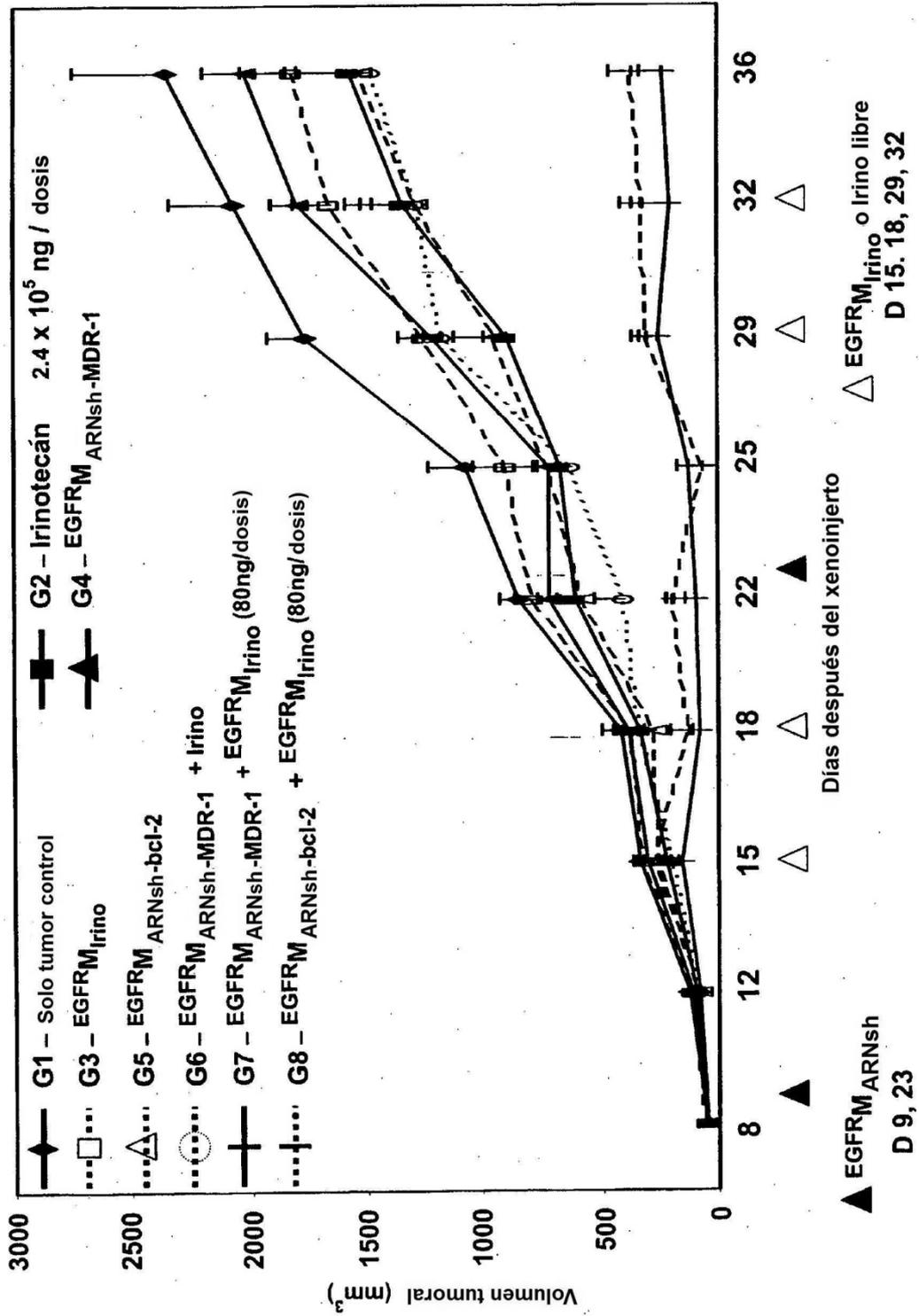


Figura 3

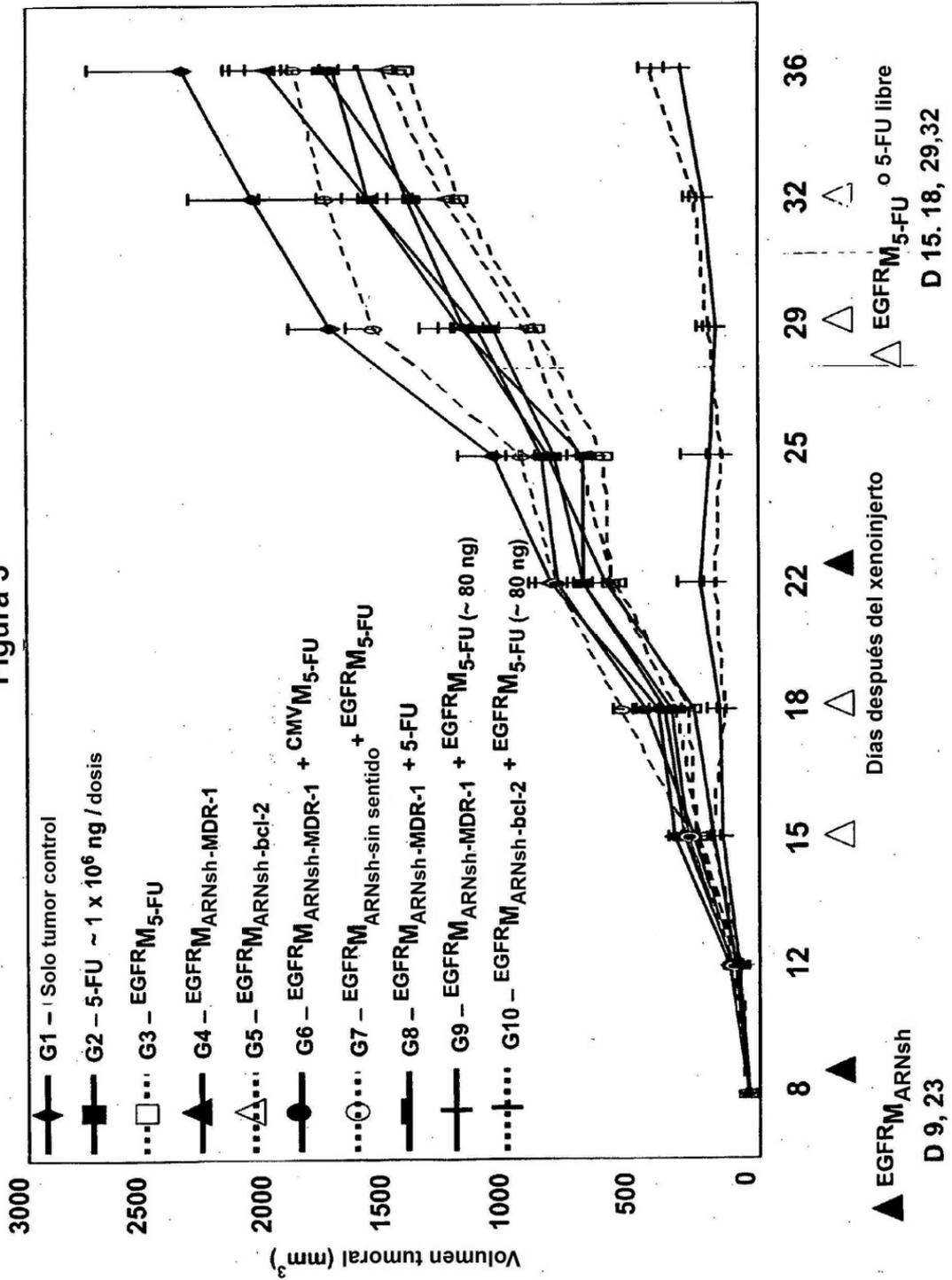


Figura 4

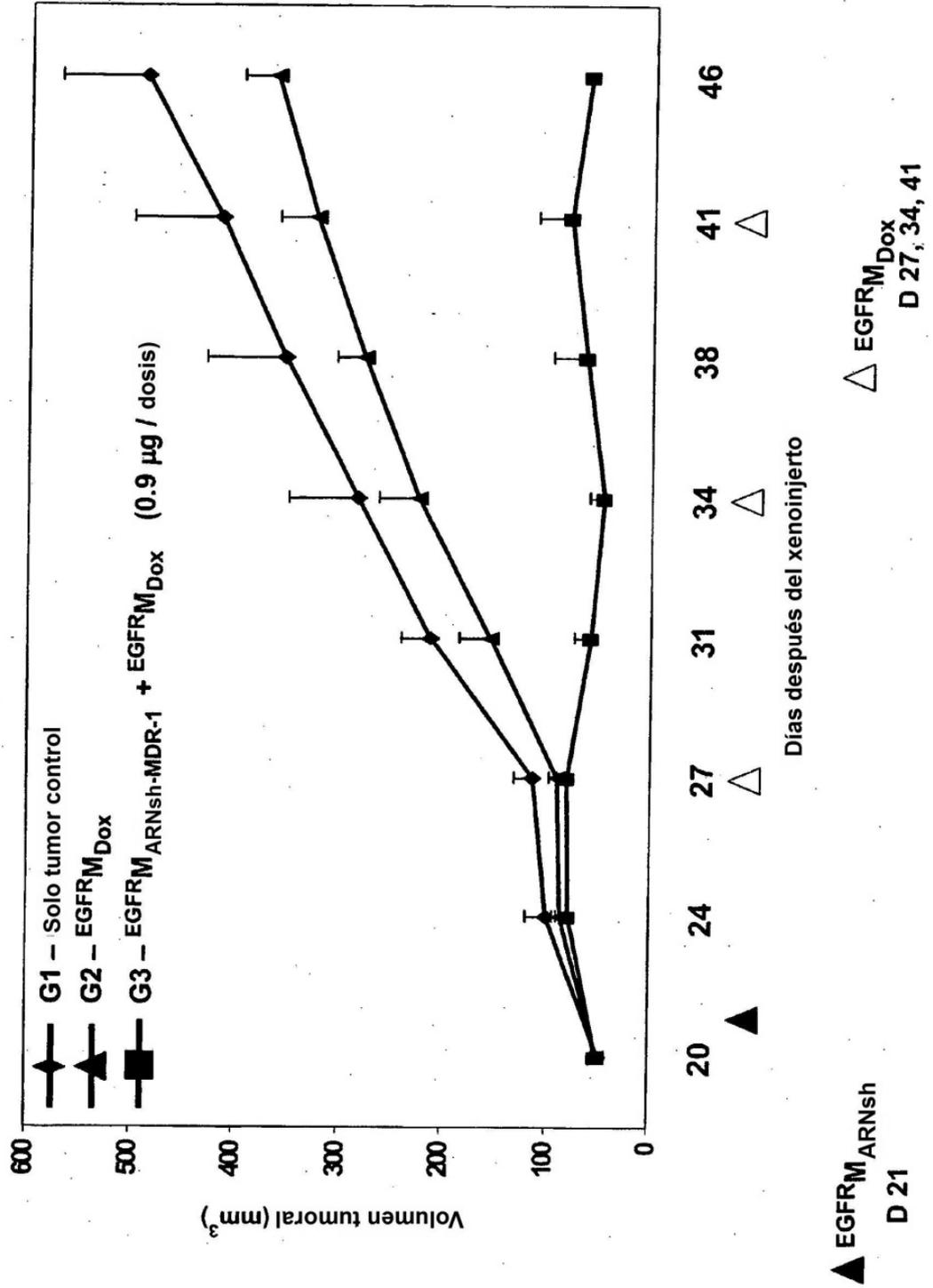


Figura 5

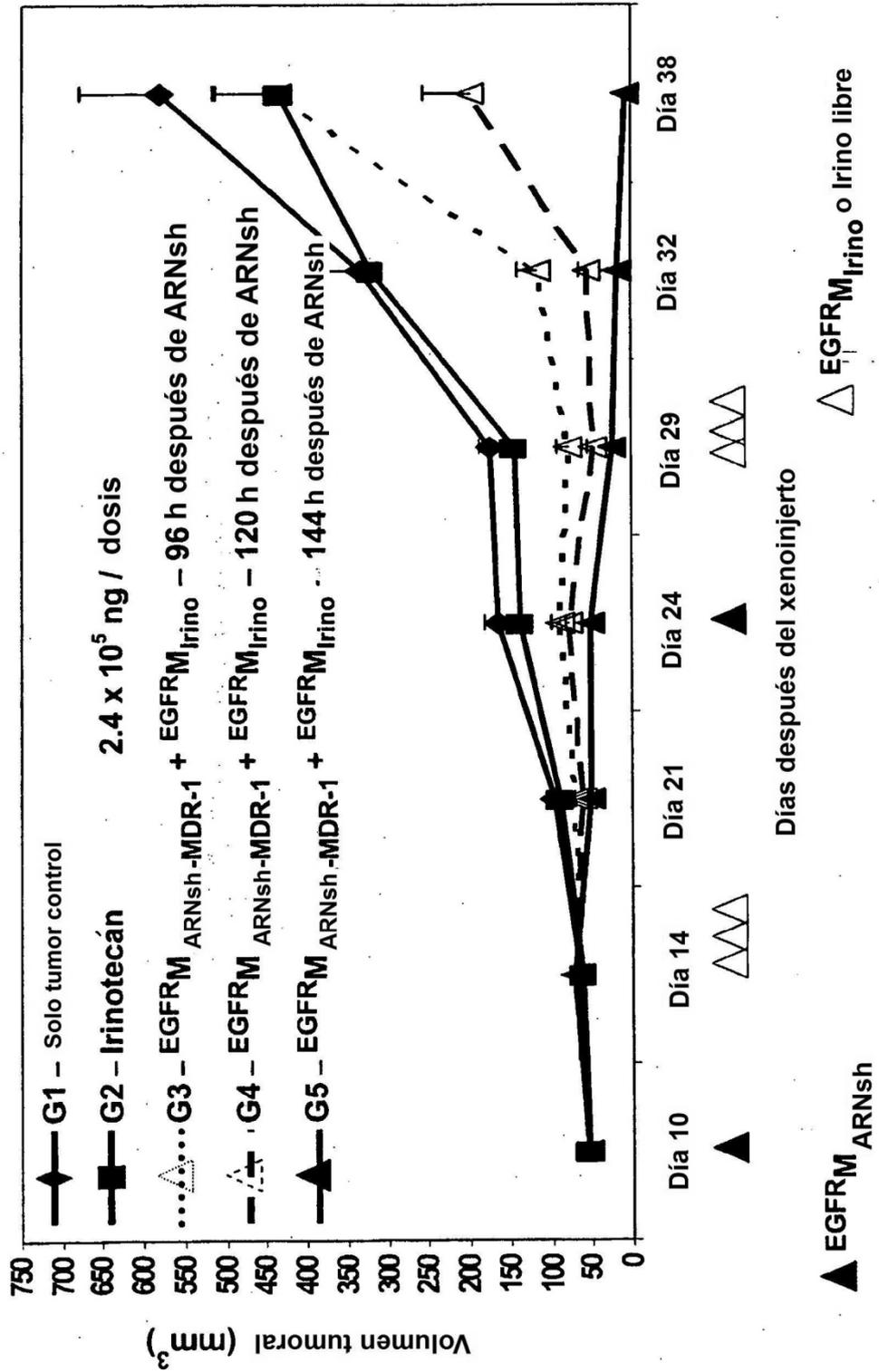


Figura 6

