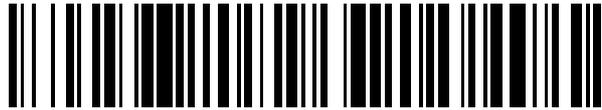


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 544 652**

51 Int. Cl.:

**A61K 47/00** (2006.01)

**A61K 9/127** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.01.2005 E 05702361 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2015 EP 1718338**

54 Título: **Composiciones y métodos de administración dirigida de fármacos in vitro e in vivo a células de mamífero a través de minicélulas intactas de origen bacteriano**

30 Prioridad:

**02.02.2004 US 540590 P**

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

**02.09.2015**

73 Titular/es:

**ENGENEIC 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 2 544 652 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

Composiciones y métodos de administración dirigida de fármacos *in vitro* e *in vivo* a células de mamífero a través de minicélulas intactas de origen bacteriano

5

**Antecedentes de la invención**

La presente invención se refiere a esfuerzos en curso para lograr la liberación controlada de fármacos y la administración dirigida de fármacos a tejidos específicos, particularmente en el área de la quimioterapia antineoplásica. Más concretamente, la invención se refiere a la administración dirigida de fármacos por medio de minicélulas bacterianas intactas, que son capaces de administrar fármacos intracelularmente, dentro de células diana deseadas, *in vivo* e *in vitro*. Las minicélulas que contienen fármacos químicos o bioquímicos constituyen vehículos de administración nuevos, capaces de ser dirigidos a células específicas. Un método de dirigir estos vehículos emplea moléculas biespecíficas que se unen específicamente tanto a una estructura superficial de la minicélula como a una estructura superficial de la célula diana como un receptor. Los ligandos biespecíficos actúan de mediadores en la interacción entre las minicélulas y las células diana, de modo que las células diana engullen las minicélulas, que liberan su carga útil de fármaco en el citoplasma de dichas células diana. Una vez liberado en el citoplasma, el fármaco actúa sobre los objetivos intracelulares, como los organelos intracelulares, el núcleo, el citoesqueleto, las enzimas y los cofactores para lograr un efecto terapéutico. En otro método de administración de fármacos, células diana competentes para la fagocitosis o la endocitosis engullen las minicélulas cargadas de fármaco sin el uso de ligandos biespecíficos.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

Actualmente, la mayoría de los fármacos utilizados para tratar el cáncer se administran sistémicamente. Aunque la administración sistémica de fármacos antineoplásicos citotóxicos juega un papel fundamental en la terapia del cáncer, también engendra serios problemas. Por ejemplo, la exposición sistémica de órganos y tejidos normales al fármaco administrado puede causar una toxicidad grave (Sarosy and Reed, 1993). Esto se agudiza por el hecho de que los fármacos antineoplásicos administrados sistémicamente a menudo se deben administrar en dosis muy altas para superar la mala biodisponibilidad de los mismos y el gran volumen de distribución en un paciente. Asimismo, la administración sistémica de fármacos puede ser invasiva, dado que a menudo requiere el uso de un catéter asegurado en un vaso sanguíneo principal. Debido a que la administración sistémica de fármacos requiere a menudo el uso de venas, ya sean periféricas o centrales, puede causar complicaciones locales como flebitis. La extravasación de un fármaco también puede provocar daño vesicante/tisular en el lugar de la administración, como se ve comúnmente luego de la administración de alcaloides de la vinca y antraciclinas.

Debido a que los sistemas existentes para la administración dirigida de fármacos son seriamente deficientes, las estrategias actuales de tratamiento con antineoplásicos enfrentan mediocrementemente los problemas que presenta la administración sistémica de fármacos. Un método para abordar estos problemas consiste simplemente en modificar los cronogramas de administración o los regímenes de infusión, que puede ser en bolo, intermitente o continua. Este método, no obstante, proporciona beneficios muy limitados.

También existen algunos métodos alternativos a la inyección intravenosa, cada uno diseñado para proporcionar la administración regional, es decir, la administración selectiva a una región tumoral. Los ejemplos de dichas alternativas incluyen implantes poliméricos, infusión intraperitoneal, infusión intrapleural, administración intrarterial, quimioembolización e inhalación de aerosoles. En particular, la administración intraperitoneal de la quimioterapia ha sido estudiada extensivamente para el carcinoma de ovario y otros tumores abdominales (Kirmani *et al.*, 1994; Alberts *et al.*, 1996). Desafortunadamente, cada uno de estos métodos de administración, inclusive la administración intraperitoneal, ha logrado un éxito sólo marginal en cuanto a administrar selectivamente fármacos al sitio del tumor y reducir los efectos secundarios.

Otros intentos de abordar los problemas de la administración sistémica de fármacos antineoplásicos citotóxicos incluyen el uso de formulaciones de fármacos y sistemas de administración alternativos, incluidos polímeros biodegradables de liberación controlada, microesferas poliméricas portadoras y liposomas, así como la administración concomitante de citoprotectores con antineoplásicos. Chonn y Cullis, 1995; Kemp *et al.*, 1996; Kumanohoso *et al.*, 1997; Schiller *et al.*, 1996; Sharma *et al.*, 1996; Sipo *et al.*, 1997.

El uso de liposomas como portadores de fármacos para antineoplásicos fue propuesto originalmente como un medio para manipular la distribución de los fármacos a fin de mejorar la eficacia antitumoral y reducir la toxicidad (reseñado por Allen, 1997). A través de la encapsulación de fármacos en un portador macromolecular, como un liposoma, el volumen de distribución se reduce significativamente y la concentración de fármaco en un tumor aumenta. Esto causa una disminución en las cantidades y tipos de toxicidades no específicas y un aumento en la cantidad de fármaco que puede ser efectivamente administrada a un tumor (Papahadjopoulos y Gabizon, 1995; Gabizon y Martin, 1997; Martin, 1998). Los liposomas protegen a los fármacos del metabolismo y la inactivación en el plasma. Además, debido a limitaciones de tamaño en el transporte de grandes moléculas o portadores a través de los endotelios sanos, los fármacos se acumulan en menor medida en tejidos sanos (Mayer *et al.*, 1989; Working *et al.*,

1994).

Para prolongar su tiempo de circulación, los liposomas se recubren con polietilenglicol (PEG), un polímero hidrófilo sintético (Woodle y Lasic, 1992). El grupo de cabeza del PEG sirve como una barrera, que inhibe estéricamente las interacciones hidrófobas y electrostáticas con una variedad de componentes sanguíneos y opsoninas plasmáticas en la superficie de los liposomas y retarda así el reconocimiento de los liposomas por el sistema reticuloendotelial. Los liposomas recubiertos con PEG se denominan "estabilizados estéricamente" (SSL, en inglés) o liposomas STEALTH (Lasic y Martin, 1995). Esta tecnología dio lugar a una formulación farmacéutica comercial de Doxorubicina liposómica pegilada, conocida como Doxil en Estados Unidos y Caelyx en Europa. Una amplia gama de otros fármacos también han sido encapsulados en liposomas para el tratamiento del cáncer (Heath *et al.*, 1983; Papahadjopoulos *et al.*, 1991; Allen *et al.*, 1992; Vaage *et al.*, 1993b; Burke y Gao, 1994; Sharma *et al.*, 1995; Jones *et al.*, 1997; Working, 1998).

Los portadores de fármacos liposómicos tienen, desafortunadamente, varios inconvenientes. Por ejemplo, *in vivo*, los fármacos se escapan de los liposomas a una velocidad suficiente para tornarse biodisponibles, causando toxicidad a los tejidos normales. Análogamente, los liposomas son inestables *in vivo* donde su ruptura libera el fármaco y causa toxicidad a los tejidos normales. Asimismo, las formulaciones liposómicas de fármacos altamente hidrófilos pueden tener una biodisponibilidad prohibitivamente baja en el sitio de un tumor, debido a que los fármacos hidrófilos tienen una permeabilidad de membrana extremadamente baja. Esto limita la liberación de fármacos una vez que los portadores liposómicos alcanzan el tumor. Los fármacos altamente hidrófobos también tienden a asociarse fundamentalmente con el compartimiento de la bicapa de los liposomas, causando una baja estabilidad de atrapamiento debido a la rápida redistribución de un fármaco en los componentes plasmáticos. Además, algunos fármacos como 1- $\beta$ -D-arabinofuranosilcitosina (ara-C) y metotrexato, sólo entran en las células tumorales directamente, a través de transportadores de membrana (Plageman *et al.*, 1978; Wiley *et al.*, 1982; Westerhof *et al.*, 1991, 1995; Antony, 1992). En tales casos, un portador liposómico necesitaría liberar suficiente fármaco cerca del sitio del tumor para lograr un efecto terapéutico (Heath *et al.*, 1983; Matthey *et al.*, 1989; Allen *et al.*, 1992). Por último, el uso de formulaciones liposómicas convencionales aumenta el riesgo del paciente de adquirir infecciones oportunistas (White, 1997), debido a la localización de los fármacos en macrófagos del sistema reticuloendotelial y a una consecuente toxicidad de los macrófagos (Allen *et al.*, 1984; Daemen *et al.*, 1995, 1997). Este problema se acentúa en los pacientes inmunodeprimidos, como los pacientes con SIDA que están siendo tratados por sarcoma de Kaposi.

Debido a que los problemas continúan obstaculizando significativamente el éxito de las terapias contra el cáncer, existe una necesidad urgente de estrategias de administración dirigida de fármacos que administren selectivamente fármacos a las células tumorales y los órganos diana, o protejan a los tejidos normales de los antineoplásicos administrados. Dichas estrategias deberían mejorar la eficacia de la farmacoterapia al aumentar los índices terapéuticos de los antineoplásicos minimizando simultáneamente los riesgos de la toxicidad relacionada con los fármacos.

Una solicitud de patente internacional, PCT/IB02/04632, describió minicélulas intactas recombinantes que contienen moléculas de ácido nucleico terapéutico. Dichas minicélulas son vectores eficaces para administrar oligonucleótidos y polinucleótidos a células huésped *in vitro* e *in vivo*. Los datos presentados en PCT/IB02/04632 demostraron, por ejemplo, que las minicélulas recombinantes que transportan plásmidos de expresión de genes de mamíferos pueden ser administradas a células fagocíticas y no fagocíticas. La solicitud también describió la transformación genética de cepas bacterianas progenitoras productoras de minicélulas con ácidos nucleicos heterólogos transportados en ADN plasmídicos episómicamente replicativos. Luego de la separación de la bacteria progenitora y las minicélulas, algo de ADN episómico segregó a las minicélulas. Las minicélulas recombinantes resultantes fueron fácilmente engullidas por las células fagocíticas de mamífero y fueron degradadas dentro de los fagolisosomas intracelulares. Sorprendentemente, algo del ADN recombinante escapó de la membrana fagolisosómica y fue transportado al núcleo de la célula de mamífero, donde se expresaron los genes recombinantes. Así, la aplicación demostró una utilidad de las minicélulas en la genoterapia humana y animal.

US 2003/0203481 da a conocer minicélulas de origen bacteriano capaces de cargar agentes terapéuticos incluidos principios activos, profármacos y moléculas pequeñas. Párrafo [0019]: "El uso de minicélulas incluye pero no exclusivamente las minicélulas eubacterianas". Los ejemplos de preparación de minicélulas son de origen bacteriano, por ej. *Escherichia coli* (véase [0368-0410]). La minicélula puede tener capacidad de ligando o una porción de unión (como parte de una proteína de fusión que comprende un primer polipéptido que contiene al menos un dominio transmembrana o al menos un dominio de anclaje la membrana y un segundo polipéptido que contiene una porción de unión). Uso de minicélulas para transferir información genética a una célula receptora, la transferencia de genes puede producirse entre una minicélula y una célula de mamífero *in vitro* o *in vivo* empleando un ligando, utilizado para tratamientos médicos. También composiciones farmacéuticas que contienen minicélulas útiles para diagnóstico, terapia, investigación, cribado de compuestos y descubrimiento de fármacos que comprende un portador farmacéuticamente aceptable para ellas y una o más minicélulas cargadas con principios biológicamente activos, como moléculas de ácido nucleico o moléculas pequeñas (véanse los párrafos 98-100, 426, 666-669, 873-

887 y 1107). Pero no se mencionan fármacos antineoplásicos ni se usa gradiente de concentración.

El artículo en *The journal of biological Chemistry*, 2004, vol. 279, Nº 5, pp.3743-3748, Murakami *et al.*, da a conocer Daspei, como compuesto anfífilo, para la captación en el citoplasma celular de cepas de *Escherichia coli*, usando un proceso de bombeo dependiente de energía la inactividad conduce a la acumulación de fármacos en la célula. Las condiciones de desnutrición y la glucosa como fuente de carbono influyen en el proceso de carga de fármacos a través de la (re)actividad del eflujo de fármaco (véanse p.3745-3746). Muestra la introducción de agentes terapéuticos en células bacterianas haciendo uso de un gradiente de concentración de dicho principio activo, pero no se sugiere el uso de fármacos antineoplásicos.

La presente invención se fundamenta en estos descubrimientos recientes relacionados con minicélulas y aborda las necesidades continuas de mejores estrategias de administración de fármacos, especialmente en el contexto de la quimioterapia antineoplásica.

## Resumen de la invención

Para abordar estas y otras necesidades, la presente invención proporciona, en un aspecto, una composición que consta esencialmente de minicélulas intactas que contienen un fármaco, como un fármaco antineoplásico. En un aspecto relacionado, la invención proporciona una composición que comprende (i) minicélulas intactas de origen bacteriano y (ii) un portador farmacéuticamente aceptable para ellas, donde las minicélulas contienen un fármaco.

De acuerdo con la reivindicación 1, la invención proporciona una composición que comprende (i) minicélulas intactas de origen bacteriano, que tienen paredes celulares intactas, cargadas con una cantidad terapéuticamente eficaz de un antineoplásico, (ii) un portador farmacéuticamente aceptable para ellas, y (iii) un ligando biespecífico capaz de unirse a un componente de superficie de dichas minicélulas y a un componente de superficie de una célula de mamífero no fagocítica.

La invención también proporciona en la reivindicación 7, un método para cargar minicélulas intactas de origen bacteriano que tienen paredes celulares intactas, con una cantidad terapéuticamente eficaz de un antineoplásico, que comprende el paso de crear un gradiente de concentración de dicho fármaco entre un medio extracelular que contiene dichas minicélulas y el citoplasma de las minicélulas, de modo que dicho fármaco se desplace en sentido descendente de dicho gradiente de concentración hacia el citoplasma de la minicélula.

Según otro aspecto, la invención proporciona un método de administración dirigida de fármacos que comprende poner en contacto ligandos biespecíficos con (i) minicélulas de origen bacteriano que contienen un fármaco deseado y (ii) células de mamífero, preferentemente células de mamífero no fagocíticas. Los ligandos biespecíficos tienen especificidad tanto por un componente de superficie de las minicélulas como por un componente de superficie de las células de mamífero. Como resultado, los ligandos hacen que las minicélulas se unan a las células de mamífero, las minicélulas son engullidas por las células de mamífero y el fármaco se libera en el citoplasma de dichas células de mamífero.

La invención también proporciona ligandos biespecíficos útiles para dirigir vehículos de minicélulas a células huésped de mamífero. El ligando biespecífico puede ser un polipéptido, carbohidrato o glucopéptido, y puede comprender un anticuerpo o fragmento de anticuerpo. En realizaciones preferidas, el ligando biespecífico tiene un primer brazo con especificidad por una estructura de superficie de una minicélula bacteriana y un segundo brazo que tiene especificidad por una estructura de superficie de una célula de mamífero. Una estructura de superficie de la minicélula, deseable para la unión del ligando, es un componente O-polisacárido de un lipopolisacárido. Las estructuras de superficie de las células de mamífero deseables para la unión del ligando son receptores, preferentemente aquellos capaces de activar la endocitosis mediada por receptor.

En otro aspecto, la invención proporciona una composición que comprende (i) una minicélula de origen bacteriano que contiene una molécula farmacológica y (ii) un ligando biespecífico capaz de unirse a un componente de superficie de la minicélula y a un componente de superficie de una célula de mamífero.

La invención proporciona otro método de administración de fármacos que implica poner en contacto minicélulas de origen bacteriano que contienen un fármaco con células diana de mamífero que son competentes para la fagocitosis o la endocitosis. Las células de mamífero engullen las minicélulas cargadas de fármaco, que después liberan la carga útil de fármaco intracelularmente.

La invención proporciona además una metodología para cargar minicélulas con un fármaco. Un método de ese tipo implica crear un gradiente de concentración del fármaco entre un medio extracelular que contiene las minicélulas y el citoplasma de las minicélulas. El fármaco se desplaza naturalmente en sentido descendente del gradiente de concentración hacia el citoplasma de la minicélula.

Otro método de carga de las minicélulas con un fármaco, implica cultivar una célula bacteriana progenitora recombinante en condiciones tales que la célula bacteriana progenitora transcriba y traduzca un ácido nucleico terapéutico que codifica el fármaco, de modo que el fármaco sea liberado en el citoplasma de la célula bacteriana progenitora. Cuando la célula bacteriana progenitora se divide y forma la progenie de minicélulas, las minicélulas también contienen el fármaco en su citoplasma.

Asimismo, otro método de carga de minicélulas con un fármaco, implica el cultivo de una minicélula recombinante que contenga un ácido nucleico terapéutico que codifica el fármaco, en condiciones tales que el ácido nucleico terapéutico se transcriba y traduzca dentro de la minicélula.

La invención también proporciona el uso de minicélulas intactas de origen bacteriano y ligandos biespecíficos en la preparación de un medicamento para utilizar en un método de tratamiento de una enfermedad o de modificación de una característica por administración del medicamento a una célula, un tejido o un órgano. En el medicamento, las minicélulas contienen una molécula de fármaco y ligandos biespecíficos que son capaces de unirse a las minicélulas y a las células diana de mamífero. Tales medicamentos son útiles para tratar diversas afecciones y enfermedades, incluidas enfermedades adquiridas como sida, neumonía y tuberculosis, pero son particularmente útiles en el contexto de la quimioterapia antineoplásica.

La invención produce mejoras significativas respecto a las técnicas de farmacoterapia convencionales mediante (i) reducción de la toxicidad relacionada con el fármaco, dado que el fármaco se administra específicamente intracelularmente en las células diana, (ii) alivio de los efectos secundarios asociados al fármaco en el sitio de administración en un ser humano o animal, dado que el fármaco se empaqueta dentro de las minicélulas y no está libre para interactuar con células y tejidos que no son la diana en el sitio de administración, (iii) eliminación de la necesidad de infusión continua de fármacos, dado que una dosis terapéutica de las minicélulas con fármaco empacado y dirigidas se puede administrar mediante una inyección de rutina, (iv) reducción de la dosis eficaz de un fármaco, dado que se logra la administración dirigida específica, y (v) algunas veces eliminación de la necesidad de purificar el fármaco, dado que éste puede ser sintetizado biológicamente ya sea por el vehículo de minicélulas de administración del fármaco o la bacteria progenitora. El uso de minicélulas tanto para la biosíntesis de fármacos como para la administración dirigida a células de mamífero deseadas constituye una ventaja particular, porque muchos fármacos se extraen convencionalmente de plantas o fuentes marinas raras, o son muy difíciles de sintetizar químicamente. Además, algunos fármacos antineoplásicos, incluido el metotrexato, pueden entrar en las células de mamífero a través de un mecanismo de transporte activo asociado a la membrana.

### Breve descripción de las figuras

La figura 1 es un gráfico que muestra la cuantificación por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) y cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS) de Doxorubicina empacada en minicélulas (minicélulas<sub>DOX</sub>). Se empacaron  $5 \times 10^8$  minicélulas con diversas concentraciones de Doxorubicina en el medio externo (se muestra en el eje de la x). Las minicélulas<sub>DOX</sub> se purificaron y se extrajo la Doxorubicina empleando procedimientos nuevos (descritos en el ejemplo 3). La concentración de Doxorubicina en los extractos se midió usando HPLC (círculos) y LC-MS (triángulos) y se graficó en el eje de las y.

La figura 2 es un gráfico que muestra la administración de fármaco mediante minicélulas<sub>DOX</sub> a células de adenocarcinoma de mama humano (MDA-MB-468) *in vitro*. Se realizó un ensayo de citotoxicidad celular en células tratadas con minicélulas<sub>DOX</sub> dirigidas por EGFR (<sup>EGFR</sup>minicélulas<sub>DOX</sub>), minicélulas<sub>DOX</sub> no dirigidas (<sup>no dirigidas</sup>minicélulas<sub>DOX</sub>), Doxorubicina libre y células sin tratar. En los 6 días siguientes al tratamiento, las células tratadas con Doxorubicina libre o <sup>EGFR</sup>minicélulas<sub>DOX</sub> mostraron sólo aproximadamente 30% de viabilidad. Las células sin tratar y las células tratadas con <sup>no dirigidas</sup>minicélulas<sub>DOX</sub> mostraron una viabilidad celular normal.

La figura 3 es un gráfico que muestra un efecto terapéutico altamente significativo de minicélulas con Doxorubicina empacada dirigidas por EGFR (<sup>EGFR</sup>minicélulas<sub>DOX</sub>) sobre xenoinjertos de cáncer de mama humano. El volumen del tumor se muestra en el eje de las y, y los días post establecimiento de xenoinjertos se muestran en el eje de las x. Los triángulos sólidos debajo del eje de las x indican los días en los que se administraron diversos tratamientos. Los triángulos abiertos debajo del eje de las x indican un cambio en el tratamiento de los grupos de control G5 y G6, cuando se administraron <sup>EGFR</sup>minicélulas<sub>DOX</sub> en vez de <sup>no dirigidas</sup>minicélulas<sub>DOX</sub>. La leyenda identifica los diversos tratamientos administrados a cada uno de los 8 grupos de ratones ( $n = 11$  por grupo).

La figura 4 es un gráfico que muestra un efecto terapéutico altamente significativo de minicélulas con Paclitaxel empacado dirigidas por EGFR (<sup>EGFR</sup>minicélulas<sub>Pac</sub>) sobre xenoinjertos de cáncer de mama humano. El volumen del tumor se muestra en el eje de las y, y los días post establecimiento de xenoinjertos se muestran en el eje de las x. Los triángulos sólidos debajo del eje de las x indican los días en los que se administraron diversos tratamientos. La leyenda identifica los diversos tratamientos administrados a cada uno de los 8 grupos de ratones ( $n = 11$  por grupo).

La figura 5 es un gráfico que muestra un efecto terapéutico altamente significativo de minicélulas con Doxorubicina

empacada dirigidas por HER2/*neu* (<sup>HER2</sup>minicélulas<sub>DOX</sub>) sobre xenoinjertos de cáncer de ovario humano. Las minicélulas se derivaron de cepas progenitoras *minCDE* de *S. typhimurium* (*S.t.*) o de *E. coli* (*E.c.*). El volumen del tumor se muestra en el eje de las *y*, y los días post establecimiento de xenoinjertos se muestran en el eje de las *x*. Los triángulos sólidos debajo del eje de las *x* indican los días en los que se administraron diversos tratamientos. La leyenda identifica los diversos tratamientos administrados a cada uno de los 7 grupos de ratones ( $n = 11$  por grupo).

La figura 6 es un gráfico que muestra un efecto de respuesta a la dosis sobre la estabilización/regresión de un tumor por minicélulas con Doxorubicina empacada dirigidas por EGFR (<sup>EGFR</sup>minicélulas<sub>DOX</sub>). Se establecieron xenoinjertos de tumor MDA-MB-468 en ratones Balb/c *nu/nu*, y se trataron por vía intravenosa grupos ( $n = 11$ ) con  $10^6$ ,  $10^7$  o  $10^8$  <sup>EGFR</sup>minicélulas<sub>DOX</sub> que contenían dos concentraciones diferentes de Doxorubicina. El volumen del tumor se muestra en el eje de las *y*, y los días post establecimiento de xenoinjertos se muestran en el eje de las *x*. Los triángulos sólidos debajo del eje de las *x* indican los días en los que se administraron diversos tratamientos. La leyenda identifica los diversos tratamientos administrados a cada uno de los 7 grupos de ratones.

### 15 Descripción detallada de las realizaciones preferidas

Los inventores de la presente determinaron que minicélulas intactas de origen bacteriano son vehículos eficaces para administrar fármacos a células de mamífero *in vitro* e *in vivo*. Más particularmente, los inventores encontraron que una minicélula que transporta una carga útil de fármaco puede ser dirigida a células diana, que internalizan la minicélula y la procesan de modo que la carga útil de fármaco sea liberada en el citoplasma de dicha célula diana. Sorprendentemente, el fármaco sobrevive a este proceso sin degradarse.

En un ejemplo de estos descubrimientos, los inventores observaron que minicélulas con fármaco empacado podían ser dirigidas a células cancerosas, internalizadas *in vitro* en las células cancerosas, y degradadas dentro de endosomas tardíos o fagolisosomas, liberando así cantidades terapéuticamente eficaces de fármaco bioactivo en el citoplasma de la célula cancerosa. Véanse los ejemplos más adelante.

En otro ejemplo, estas observaciones fueron corroboradas por estudios *in vivo* usando xenoinjertos de tumor humano en ratones atímicos. La administración intravenosa de minicélulas con fármaco empacado demostró una reducción altamente significativa del xenoinjerto de tumor en todos los ratones (11 ratones por grupo). Véanse los ejemplos más adelante.

Por lo tanto, los inventores descubrieron (i) que una gama de fármacos diferentes puede ser empacada en minicélulas intactas, (ii) que los fármacos se desplazan en una dirección desde el ambiente extracelular al citoplasma de las minicélulas intactas, (iii) que se pueden transferir concentraciones terapéuticamente significativas de fármacos al citoplasma de las minicélulas intactas, (iv) que las membranas de las minicélulas intactas son impermeables a las fugas de fármaco desde el citoplasma de las minicélulas, (v) que la unión de ligandos biespecíficos a estructuras superficiales de las minicélulas con fármaco empacado no desestabiliza a las minicélulas y que por lo tanto las minicélulas se unen específicamente a células diana de mamífero tanto *in vitro* como *in vivo*, (vi) que las células de mamífero competentes para fagocitosis o endocitosis engullen las minicélulas con fármaco empacado, (vii) que las células de mamífero no fagocíticas engullen las minicélulas con fármaco empacado unidas a un receptor de superficie, (viii) que luego de haber sido engullidas las minicélulas se degradan dentro de vacuolas, y cantidades significativas de fármaco bioactivo escapan de la membrana vacuolar, (viii) que el fármaco escapado puede afectar a su objetivo intracelular dentro de la célula de mamífero, (ix) que las minicélulas con antineoplásico empacado pueden penetrar la vasculatura permeable que rodea las masas tumorales *in vivo*, (x) que se pueden lograr efectos terapéuticos altamente significativos, inclusive la regresión del tumor y la estabilización de la enfermedad, usando minicélulas con antineoplásico empacado, y (xi) que las minicélulas con fármaco empacado reducen significativamente o eliminan la toxicidad indeseada.

La capacidad de las minicélulas para empacar fármacos es sorprendente por varias razones. Es sorprendente que esas membranas de las minicélulas intactas sean permeables a una diversidad de fármacos estructuralmente distintos, hidrófilos, hidrófobos y anfipáticos. Por el contrario, las células bacterianas vivas muestran una permeabilidad selectiva de la membrana a solutos, por lo tanto parece que estas minicélulas han perdido dicha selectividad. También es sorprendente que las minicélulas sean incapaces de expeler fármacos desde su citoplasma, porque las células bacterianas vivas extruyen químicos nocivos que ingresan en el citoplasma bacteriano. Incluso en contra de un gradiente osmótico inverso, en el cual las minicélulas cargadas con fármaco están suspendidas en solución salina tamponada con fosfato que no contiene fármaco, las minicélulas retienen el fármaco. Esto es adicionalmente sorprendente porque los fármacos parecen simplemente difundir al interior de las minicélulas a través de las membranas de las minicélulas intactas, no obstante los canales de difusión no están disponibles para que los fármacos difundan fuera de las minicélulas. Otro aspecto inesperado de la presente invención es que se pueden empacar concentraciones terapéuticamente significativas de fármacos dentro de las minicélulas, debido a que el citoplasma bacteriano (y en consecuencia el citoplasma de la minicélula) contiene concentraciones significativas de solutos biocompatibles. Por lo tanto, se creía que el espacio intracelular de reserva podría ser insuficiente para acomodar altas concentraciones de solutos como fármacos no biocompatibles, sin

pérdida de la integridad de la minicélula.

La capacidad de las minicélulas para administrar fármacos también es sorprendente por varias razones. Es inesperado, por ejemplo, que las minicélulas con fármaco empacado no tengan escape del fármaco al espacio extracelular. Este es un problema persistente con los vectores liposómicos de administración de fármacos, y las minicélulas, al igual que los liposomas, son vesículas inanimadas. Sin embargo, aunque las membranas de las minicélulas intactas carecen de selectividad a la penetración de fármacos, la integridad de la membrana es suficiente para evitar fugas de solutos intracelulares. También es sorprendente, y a diferencia de los vectores liposómicos de administración de fármacos, que la unión de ligandos a la superficie de minicélulas con fármaco empacado no cause desestabilización de la integridad de la minicélula ni perturbaciones de la membrana que resulten en el escape de fármaco. Además, es inesperado que las minicélulas con fármaco empacado sufran endocitosis rápidamente por células de mamífero no fagocíticas, simplemente en virtud de un ligando biespecífico que une a las dos. Hasta ahora era una creencia muy difundida que las partículas grandes, como las bacterias, solamente podían penetrar e invadir células de mamífero no fagocíticas mediante un proceso activo que implica la secreción de proteínas asociadas a la invasión por un patógeno vivo. Las minicélulas son vesículas inanimadas que carecen de capacidad para invadir activamente células de mamífero no fagocíticas. Aún otra sorpresa fue que las minicélulas con fármaco empacado que transportan un ligando biespecífico son capaces de extravasar la neovasculatura tumoral *in vivo*. Si bien existe un importante debate sobre la permeabilidad de la neovasculatura del microambiente tumoral, la visión actual es que los poros de la neovasculatura tienen 150-400 nm de diámetro (Gabizon *et al.*, 2003). Las minicélulas que transportan un ligando de superficie tienen, sin embargo, 400 nm a 600 nm de diámetro, y aún son capaces de extravasar la neovasculatura tumoral *in vivo*. La capacidad de los fármacos empacados en las minicélulas para evitar la degradación también es sorprendente por varias razones. Las minicélulas engullidas son sometidas a ambientes lisosómicos y endosómicos tardíos que se sabe que son fuertes, y que rompen las minicélulas. A pesar de lo fuerte que puedan ser estos ambientes, los inventores observaron que una serie de fármacos son liberados desde minicélulas en forma biológicamente activa y permanecen significativamente inalterados. Tal vez aún más sorprendente fue el descubrimiento de que una concentración significativa de fármaco es capaz de escapar, en su forma activa, al citoplasma de las células de mamífero. De conformidad con la presente invención, las concentraciones de fármaco dentro de las células de mamífero son suficientes para obrar un efecto terapéutico en experimentos tanto *in vitro* como *in vivo*.

Todavía otro descubrimiento sorprendente es que las minicélulas con fármaco empacado minimizan los efectos secundarios adversos. Por ejemplo, en el sitio de la inyección intravenosa en la vena de la cola de ratones atímicos, las inyecciones exentas de fármaco causan reacciones cutáneas graves, mientras que las minicélulas con fármaco empacado no causan dicho efecto secundario adverso.

De conformidad con estos descubrimientos, la invención proporciona una composición que consiste esencialmente en minicélulas intactas que contienen un fármaco deseado, como un antineoplásico. La invención también proporciona una composición que comprende (i) minicélulas intactas de origen bacteriano y (ii) un portador farmacéuticamente aceptable para ellas, donde las minicélulas contienen un fármaco, como un antineoplásico.

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

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

Las minicélulas de la invención contienen uno o más fármacos. El término "fármaco" incluye cualquier principio fisiológica o farmacológicamente activo que produce un efecto local o sistémico en los animales, especialmente los mamíferos y los seres humanos. Los fármacos pueden ser compuestos inorgánicos u orgánicos, incluidos sin limitación, péptidos, proteínas, ácidos nucleicos y moléculas pequeñas, cualquiera de los cuales puede estar caracterizado o sin caracterizar. Pueden estar en diversas formas, como moléculas incambiadas, complejos moleculares, sales farmacológicamente aceptables, como clorhidrato, bromhidrato, sulfato, laurato, palmitato, fosfato, nitrito, nitrato, borato, acetato, maleato, tartrato, oleato, salicilato y similares. Para los fármacos ácidos, se pueden usar sales de metales, aminas o cationes orgánicos, por ejemplo, amonio cuaternario. También se pueden usar derivados de fármacos, como bases, ésteres y amidas. Se puede usar un fármaco que sea insoluble en agua en una forma que sea un derivado soluble en agua del fármaco, o como una base derivada de éste, que en cualquier caso, o mediante su administración, sea convertida por enzimas, hidrolizada por el pH del organismo, o por otros procesos metabólicos en su forma terapéuticamente activa original.

Los fármacos que tienen cualquier actividad fisiológica o farmacológica son útiles en esta invención, pero los antineoplásicos son los fármacos preferidos. Los antineoplásicos útiles incluyen mostazas de nitrógeno, nitrosoureas, etilenoimina, sulfonatos de alcano, tetrazina, compuestos de platino, análogos de pirimidina, análogos de purina, antimetabolitos, análogos de folato, antraciclinas, taxanos, alcaloides de la vinca, inhibidores de la topoisomerasa y agentes hormonales. Los ejemplos de antineoplásicos son Actinomicina-D, Alkeran, Ara-C, Anastrozol, Asparaginasa, BiCNU, Bicalutamida, Bleomicina, Busulfán, Capecitabina, Carboplatino, Carboplatino, Carmustina, CCNU, Clorambucilo, Cisplatino, Cladribina, CPT-11, Ciclofosfamida, Citarabina, Arabinósido De Citosina, Citoxano, Dacarbazina, Dactinomicina, Daunorrubicina, Dexrazoxano, Docetaxel, Doxorrubicina, DTIC, Epirubicina, Etilenoimina, Etopósido, Floxuridina, Fludarabina, Fluorouracilo, Flutamida, Fotemustina, Gemcitabina, Herceptin, Hexametilamina, Hidroxiurea, Idarrubicina, Ifosfamida, Irinotecán, Lomustina, Mecloretamina, Melfalán, Mercaptopurina, Metotrexato, Mitomicina, Mitotano, Mitoxantrona, Oxaliplatino, Paclitaxel, Pamidronato, Pentostatina, Plicamicina, Procarbazina, Rituximab, Esteroides, Estreptozocina, STI-571, Estreptozocina, Tamoxifeno, Temozolomida, Tenipósido, Tetrazina, Tioguanina, Tiotepa, Tomudex, Topotecán, Treosulfán, Trimetrexato, Vinblastina, Vincristina, Vindesina, Vinorelbina, VP-16 y Xeloda.

Las composiciones que contienen minicélulas de esta invención contienen preferentemente menos de aproximadamente 1 célula bacteriana progenitora contaminante cada  $10^7$  minicélulas, más preferentemente contienen menos de aproximadamente 1 célula bacteriana progenitora contaminante cada  $10^8$  minicélulas, incluso más preferentemente contienen menos de aproximadamente 1 célula bacteriana progenitora contaminante cada  $10^9$  minicélulas, todavía más preferentemente contienen menos de aproximadamente 1 célula bacteriana progenitora contaminante cada  $10^{10}$  minicélulas y muy preferentemente contiene menos de aproximadamente 1 célula bacteriana progenitora contaminante cada  $10^{11}$  minicélulas.

Los métodos de purificación de minicélulas son conocidos en el área y se describen en PCT/IB02/04632. Uno de dichos métodos combina filtración de flujo cruzado (el flujo de alimentación es paralelo a la superficie de una membrana; Forbes, 1987) y filtración sin salida (el flujo de alimentación es perpendicular a la superficie de la membrana). Opcionalmente, la combinación de filtración puede estar precedida por una centrifugación diferencial, a baja fuerza centrífuga, para eliminar parte de las células bacterianas y así enriquecer el sobrenadante en minicélulas.

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

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

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

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

Paso B: centrifugación por gradiente de densidad utilizando un medio de gradiente de densidad isotónico y atóxico.

Este paso separa las minicélulas de muchos contaminantes, incluidas las células bacterianas progenitoras, con mínima pérdida de minicélulas. Preferentemente, este paso se repite dentro de un método de purificación.

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

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

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

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

25 Paso G: filtración sin salida para eliminar las células bacterianas filamentosas muertas. Se puede emplear un filtro de 0.45  $\mu\text{m}$  para este paso.

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

35 En otro aspecto, la invención proporciona un método de administración dirigida de fármacos que comprende poner en contacto ligandos biespecíficos con (i) minicélulas de origen bacteriano que contienen una molécula de fármaco y (ii) células de mamífero. Estos ligandos biespecíficos, que tienen especificidad tanto por los componentes de las minicélulas como de las células de mamífero, hacen que las minicélulas se unan a las células de mamífero, de modo que las minicélulas sean engullidas por las células de mamífero, y el fármaco se libere en el citoplasma de las células de mamífero.

40 Los inventores encontraron que este método es ampliamente aplicable a una diversidad de células de mamífero, incluidas las células que normalmente son resistentes a la adhesión específica y a la endocitosis de minicélulas. Por ejemplo, ligandos de anticuerpos biespecíficos con especificidad anti-O-polisacárido en un brazo y especificidad anti-receptor HER2 o anti-receptor de EGF o anti-receptor de andrógenos en el otro brazo, unen eficazmente las minicélulas a los receptores respectivos en una gama 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 la endocitosis rápida de las minicélulas por cada una de las células no fagocíticas.

45 Las células diana de la invención incluyen cualquier célula en la cual se va a introducir un fármaco. "Introducir" cuando se usa con referencia a un fármaco, significa que el fármaco transportado dentro de una minicélula es administrado a la célula diana, de preferencia intracelularmente. Las células diana deseables se caracterizan por la expresión de un receptor de superficie celular que, luego de la unión de un ligando, facilita la endocitosis. Las células que se prefieren como diana no son fagocíticas, lo que significa que las células no son fagocitos profesionales, como los macrófagos, las células dendríticas y los linfocitos citolíticos naturales (Natural Killer). Las células preferidas como diana también son de mamífero.

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

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

60 Para unir minicélulas de origen bacteriano, es deseable que un brazo del ligando sea específico para el componente

O-polisacárido de un lipopolisacárido que se encuentra en la célula bacteriana progenitora. Otras estructuras superficiales de la minicélula que puedan ser explotadas para la unión del ligando incluyen polipéptidos expuestos en la superficie celular y carbohidratos en las membranas externas, como pilosidades, fimbrias y flagelos y segmentos peptídicos expuestos en la superficie celular.

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

A modo de ejemplo, se puede atacar células tumorales, células metastásicas, células de la vasculatura, como células endoteliales y células del músculo liso, células pulmonares, células renales, glóbulos, células de la médula ósea, células cerebrales, células hepáticas, etc., o precursores de cualquier célula seleccionada mediante la elección de un ligando que se una específicamente a un motivo del receptor de la superficie celular en las células deseadas. Los ejemplos de receptores de la superficie celular incluyen el antígeno carcinoembrionario (CEA), que se sobreexpresa en la mayoría de los carcinomas de colon, recto, mama, pulmón, páncreas y del tubo gastrointestinal (Marshall, 2003); receptores de herregulina (HER-2, *neu* o *c-erbB-2*), que frecuentemente se sobreexpresa en el cáncer de mama, ovarios, colon, pulmón, próstata y de cuello uterino (Hung *et al.*, 2000); el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), que se expresa mucho en una diversidad de tumores sólidos, como los de mama, cabeza y cuello, de pulmón no microcítico y de próstata (Salomon *et al.*, 1995); el receptor de la asialoglicoproteína (Stockert, 1995); el receptor de la transferrina (Singh, 1999); el receptor del complejo enzimático de las serpinas, que se expresa en hepatocitos (Ziady *et al.*, 1997); el receptor del factor de crecimiento de los fibroblastos (FGFR), que se sobreexpresa en las células del adenocarcinoma ductal pancreático (Kleeff *et al.*, 2002); el receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR), para la genoterapia antiangiogénica (Becker *et al.*, 2002 y Hoshida *et al.*, 2002); el receptor del folato, que se sobreexpresa selectivamente en el 90% de los carcinomas de ovario no mucinosos (Gosselin y Lee, 2002); el glucocáliz de la superficie celular (Batra *et al.*, 1994); los receptores de carbohidratos (Thurnher *et al.*, 1994); y el receptor polimérico de inmunoglobulinas, que es útil para la administración génica a células epiteliales respiratorias y atractivo para el tratamiento de enfermedades pulmonares como la fibrosis quística (Kaetzl *et al.*, 1997).

En otro ejemplo, se pueden incorporar fármacos antivirales, antimicrobianos y antiparasitarios en minicélulas intactas y se puede lograr la administración dirigida de los fármacos a células infectadas específicas, como linfocitos T cooperadores CD4+ infectados por el VIH.

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

Los anticuerpos naturales tienen cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras idénticas. Ambos tipos de cadenas polipeptídicas tienen regiones constantes, que no varían o varían mínimamente entre anticuerpos de la misma clase, y regiones variables. Las regiones variables son exclusivas de un anticuerpo en particular y contienen un dominio de unión al antígeno que reconoce un epítipo específico. Las regiones del dominio de unión al antígeno que participan más directamente en la unión del anticuerpo son las "regiones determinantes de la complementariedad" (CDR).

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

Cuando los anticuerpos, incluidos los fragmentos de anticuerpos, constituyen parte o la totalidad de los ligandos, son preferentemente de origen humano o se modifican para ser aptos para uso en seres humanos. Los denominados "anticuerpos humanizados" son bien conocidos en el área. Véase por ej. Osbourn *et al.*, 2003. Fueron modificados

- por manipulación genética y/o tratamiento *in vitro* para reducir su antigenicidad en un ser humano. Los métodos para humanizar anticuerpos se describen, por ej., en las patentes de Estados Unidos N° 6,639,055; N° 5,585,089 y N° 5,530,101. En el caso más simple, los anticuerpos humanizados se forman mediante injerto de bucles de unión al antígeno, conocidos como regiones determinantes de la complementariedad (CDR), de un mAb de ratón en una IgG humana. Véanse Jones *et al.*, 1986; Riechmann *et al.*, 1988; Verhoeven *et al.*, 1988. Sin embargo, la generación de anticuerpos humanizados de alta afinidad generalmente requiere la transferencia de uno o más residuos adicionales de las regiones denominadas marco (FR) del mAb original de ratón. También se han desarrollado varias variantes de la tecnología de humanización. Véase Vaughan *et al.*, 1998.
- 5
- 10 También se pueden usar en la invención anticuerpos humanos, en lugar de "anticuerpos humanizados". Tienen una alta afinidad por sus respectivos antígenos y se obtienen de forma rutinaria a partir de colecciones muy grandes de presentación en fago de fragmentos variables monocatenarios (scFv) o Fab. Véanse Griffiths *et al.*, 1994; Vaughan *et al.*, 1996; Sheets *et al.*, 1998; de Haard *et al.*, 1999; y Knappik *et al.*, 2000.
- 15 Los ligandos útiles también incluyen anticuerpos monocatenarios biespecíficos que, típicamente, son polipéptidos recombinantes que consisten en una porción de cadena ligera variable unida covalentemente a través de una molécula conectora a la porción de cadena pesada variable correspondiente. Véanse las patentes de EE. UU. 5,455,030; 5,260,203 y 4,496,778. Los anticuerpos biespecíficos también se pueden preparar por otros métodos. Por ejemplo, se pueden crear heteroconjugados químicos mediante unión química de anticuerpos intactos o fragmentos de anticuerpos de diferentes especificidades. Véase Karpovsky *et al.*, 1984. No obstante, dichos heteroconjugados son difíciles de preparar de manera reproducible y son al menos dos veces tan grandes como los anticuerpos monoclonales normales. Los anticuerpos biespecíficos también se pueden crear por intercambio de disulfuro, que implica la escisión enzimática y la reasociación de los fragmentos de anticuerpo. Véase Glennie *et al.*, 1987.
- 20
- 25 Debido a que los fragmentos Fab y scFv son monovalentes a menudo tienen baja afinidad por estructuras diana. Por lo tanto, los ligandos preferidos preparados a partir de estos componentes se diseñan como conjugados dimericos, triméricos o tetraméricos para aumentar la afinidad funcional. Véanse Tomlinson y Holliger, 2000; Carter, 2001; Hudson y Souriau, 2001; y Todorovska *et al.*, 2001. Dichas estructuras conjugadas se pueden crear por entrecruzamiento químico y/o genético.
- 30
- Los ligandos biespecíficos de la invención son preferentemente monoespecíficos en cada extremo, es decir, específicos para un solo componente de las minicélulas en un extremo y específicos para un solo componente de las células diana en el otro extremo. Los ligandos pueden ser multivalentes en uno o ambos extremos, por ejemplo, en la forma de los denominados diacuerpos, triacuerpos y tetracuerpos. Véase Hudson y Souriau, 2003. Un diacuerpo es un dímero bivalente formado por una asociación no covalente de dos scFvs, que produce dos sitios de unión de Fv. Del mismo modo, un triacuerpo resulta de la formación de un trímero trivalente de tres scFv, lo que proporciona tres sitios de unión, y un tetracuerpo resulta de la formación de un tetrámero tetravalente de cuatro scFv, lo que proporciona cuatro sitios de unión.
- 35
- 40 Varios anticuerpos monoclonales humanizados, humanos y de ratón y fragmentos de éstos que tienen especificidad por los receptores de las células de mamífero han sido aprobados para el uso terapéutico en humanos, y la lista está creciendo rápidamente. Véase Hudson y Souriau, 2003. Un ejemplo de un anticuerpo de ese tipo que se puede utilizar para formar un brazo de un ligando biespecífico tiene especificidad por HER2: Herceptin™; Trastuzumab.
- 45 También se pueden fusionar las regiones variables del anticuerpo a una amplia variedad de dominios proteínicos. La fusión a dominios de inmunoglobulina humana como CH3 de IgG1 agrega masa y promueve la dimerización. Véase Hu *et al.*, 1996. La fusión a regiones bisagra-Fc de Ig humana puede añadir funciones efectoras. Asimismo, la fusión a dominios proteínicos heterólogos de proteínas multiméricas promueve la multimerización. Por ejemplo, se ha usado la fusión de un scFv corto a hélices anfipáticas cortas para producir minianticuerpos. Véase Pack y Pluckthun, 1992. Se pueden usar dominios de proteínas que forman heterodímeros, tales como fos/jun, para producir moléculas biespecíficas (Kostelny *et al.*, 1992) y, alternativamente, se pueden modificar genéticamente dominios de homodimerización para formar heterodímeros por estrategias de manipulación genética como la de "botón en ojal" (Ridgway *et al.*, 1996). Por último, se pueden elegir compañeros de proteínas de fusión que proporcionen tanto multimerización como una función adicional, p. ej., la estreptavidina. Véase Dubel *et al.*, 1995.
- 50
- 55 En otro aspecto, la invención proporciona una composición de materia útil para introducir moléculas de fármaco en células diana de mamífero con alta eficacia. La composición comprende (i) una minicélula de origen bacteriano y (ii) un ligando biespecífico. La minicélula y el ligando pueden ser cualquiera de los descritos en este documento. Por consiguiente, la minicélula contiene un fármaco y el ligando biespecífico es preferentemente capaz de unirse a un componente de superficie de la minicélula y a un componente de superficie de la célula de mamífero que es la diana.
- 60

Se puede formular de manera convencional una composición que consista esencialmente de minicélulas y ligandos biespecíficos de la presente invención (es decir, una composición que incluya dichas minicélulas y ligandos con otros constituyentes que no interfieran indebidamente con la calidad de la administración del fármaco de la

composición), usando uno o más portadores o excipientes farmacéuticamente aceptables.

La expresión "farmacéuticamente aceptable" significa que un portador o excipiente no anula la actividad biológica de la composición que se está administrando, es químicamente inerte y no es tóxico para el organismo en el cual se administra. Las formulaciones se pueden presentar en formas farmacéuticas unitarias, por ejemplo, en ampollas o viales o en recipientes multidosis, con o sin conservante añadido. La formulación puede ser una solución, una suspensión o una emulsión en vehículos acuosos u oleosos, y puede contener agentes de formulación, como suspendentes, estabilizantes y/o dispersantes. Una solución adecuada es isotónica con la sangre del receptor y se ilustra mediante solución salina, solución de Ringer y solución de dextrosa. Alternativamente, las composiciones pueden estar en forma de polvo liofilizado para la reconstitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua apirógena o suero fisiológico estériles. Las composiciones también se pueden formular como una preparación en depot. Tales formulaciones de acción prolongada se pueden administrar mediante implantación (por ejemplo, subcutáneamente o intramuscularmente) o por inyección intramuscular.

Una composición de la presente invención se puede administrar por diferentes vías y en diversos sitios en el cuerpo de un mamífero, para lograr los efectos terapéuticos deseados, ya sea local o sistémicamente. La administración se puede llevar a cabo, por ejemplo, mediante administración oral, por aplicación de la formulación en una cavidad corporal, por inhalación o insuflación, o por administración parenteral, intramuscular, intravenosa, intraportal, intrahepática, peritoneal, subcutánea, intratumoral, o intradérmica. El modo y el sitio de administración dependen de la ubicación de las células que son la diana. Por ejemplo, las células de fibrosis quística pueden ser eficazmente atacadas por administración inhalada de las minicélulas dirigidas. De manera similar, las metástasis tumorales pueden ser tratadas más eficazmente por administración intravenosa de minicélulas recombinantes dirigidas. El cáncer de ovario primario se puede tratar por administración intraperitoneal de minicélulas dirigidas.

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

Varios mecanismos pueden estar implicados en el proceso de engullir minicélulas por un determinado tipo de célula, y la presente invención no depende de ningún mecanismo en particular a este respecto. Por ejemplo, la fagocitosis es un proceso bien documentado en el que los macrófagos y otras células fagocíticas, como los neutrófilos, ingieren partículas al extender pseudópodos sobre la superficie de la partícula hasta envolver la misma por completo. Aunque se ha descrito como fagocitosis "inespecífica" se ha demostrado que participan en el proceso receptores específicos. Véase Wright *et al.*, (1986); Speert *et al.*, (1988).

Por lo tanto, una forma de fagocitosis implica la interacción entre ligandos de superficie y receptores de ligandos ubicados en las membranas de los pseudópodos (Shaw y Griffin, 1981). Se cree que este paso de unión, mediado por los receptores específicos, depende de las adhesinas bacterianas de superficie. Con respecto a las bacterias menos virulentas, tales como la *E. coli* no enterotoxigénica, la fagocitosis también se puede producir en ausencia de ligandos de superficie para los receptores de fagocitos. Véase, por ejemplo, Pikaar *et al.* (1995). Por lo tanto, la presente invención abarca, pero no exclusivamente, el uso de minicélulas que poseen o carecen de adhesinas superficiales, de acuerdo con la naturaleza de las células bacterianas progenitoras, y que son engullidas por fagocitos (es decir, células huésped "competentes para la fagocitosis"), de las cuales los neutrófilos y macrófagos son los tipos principales en los mamíferos.

Otro proceso por el que se engulle es la endocitosis, mediante la cual patógenos intracelulares ejemplificados por especies de *Salmonella*, *Escherichia*, *Shigella*, *Helicobacter*, *Pseudomonas* y *Lactobacilli* entran en las células epiteliales de mamífero y se replican en ellas. Dos mecanismos básicos a este respecto son la endocitosis mediada por receptor dependiente de clatrina, también conocida como "endocitosis de fosa cubierta" (Riezman, 1993), y la endocitosis independiente de clatrina (Sandvig y Deurs, 1994). Cualquiera de ellos o ambos pueden estar implicados cuando una célula competente para engullir, que actúa por endocitosis (es decir, una célula huésped "competente para la endocitosis") engulle minicélulas de conformidad con la invención. Son representativas de las células competentes para la endocitosis, las células epiteliales de mama, los enterocitos del tubo gastrointestinal, las células epiteliales de estómago, las células epiteliales de pulmón y las células epiteliales de las vías urinarias y la vejiga.

Al administrar un fármaco a una célula de mamífero competente para engullir sin el uso de un ligando que dirija, la naturaleza de la aplicación contemplada influirá en la elección de la fuente bacteriana para las minicélulas empleadas. Por ejemplo, las especies *Salmonella*, *Escherichia* y *Shigella* son portadoras de adhesinas que son reconocidas por los receptores que median la endocitosis en los enterocitos del tubo gastrointestinal y pueden ser adecuadas para administrar un fármaco que sea eficaz contra las células de cáncer de colon. De manera similar, las minicélulas derivadas de *Helicobacter pylori*, portadoras de adhesinas específicas para las células epiteliales del

estómago, podrían ser adecuadas para la administración dirigida a las células de cáncer de estómago. La inhalación o la insuflación pueden ser ideales para administrar minicélulas intactas derivadas de una especie de *Pseudomonas* portadora de adhesinas que son reconocidas por los receptores de las células epiteliales pulmonares. Las minicélulas derivadas de *Lactobacilli*, portadoras de adhesinas específicas para las células epiteliales de las vías urinarias y la vejiga, podrían ser adecuadas para la administración intrauretral de un fármaco a cáncer de vías urinarias o de vejiga. La invención también proporciona el uso de minicélulas intactas de origen bacteriano y ligandos biespecíficos en la preparación de un medicamento para utilizar en un método de tratamiento de una enfermedad o de modificación de una característica por administración del medicamento a una célula, un tejido o un órgano. En el medicamento, las minicélulas contienen una molécula de fármaco y ligandos biespecíficos que son capaces de unirse a las minicélulas y a las células diana de mamífero. Tales medicamentos son útiles para tratar diversas afecciones y enfermedades, incluidas enfermedades adquiridas como sida, neumonía y tuberculosis, pero son particularmente útiles en el contexto de la quimioterapia antineoplásica.

La invención proporciona además métodos para cargar minicélulas con un fármaco. Empleando esos métodos, el empaqueo de fármacos se puede llevar a cabo con fármacos tanto hidrófilos como hidrófobos. Un método de carga de minicélulas con un fármaco implica crear un gradiente de concentración del fármaco entre un medio extracelular que contiene las minicélulas y el citoplasma de la minicélula. Cuando el medio extracelular contiene una mayor concentración de fármaco que el citoplasma de las minicélulas, el fármaco se desplaza naturalmente en sentido descendente del gradiente de concentración, hacia el citoplasma de las minicélulas. Sin embargo, cuando se invierte el gradiente de concentración, el fármaco no se desplaza fuera de las minicélulas.

Es sorprendente por varias razones que cantidades terapéuticamente significativas de fármacos se puedan empaquetar en minicélulas inanimadas sin que se produzca escape. Se sabe que la envoltura externa de las bacterias vivas, tanto gramnegativas como grampositivas, forma una barrera eficaz para los solutos del medio circundante, mientras es permeable el agua. Esto protege a las bacterias de los efectos perjudiciales de moléculas tóxicas, como biocidas y antibióticos. Se sabe también que la envoltura bacteriana le confiere una resistencia intrínseca a la difusión pasiva y al ingreso intracelular de productos químicos hidrófobos que no pueden ingresar a través de canales hidrófilos llenos de agua, formados por proteínas asociadas a la membrana denominadas porinas.

Las minicélulas contienen la misma envoltura externa que las células bacterianas progenitoras. Por lo tanto, es sorprendente que fármacos tanto hidrófilos, ejemplificados por Doxorubicina y Vinblastina, como fármacos hidrófobos, ejemplificados por Paclitaxel, puedan ser transferidos fácilmente al citoplasma de la minicélula simplemente creando un gradiente de concentración del fármaco entre el ambiente extra minicélula y el ambiente intra minicélula. Esto sugiere que la permeabilidad de la envoltura de las bacterias que no están vivas y sus derivados es bastante diferente de la permeabilidad de la envoltura de las bacterias vivas.

El descubrimiento de que el desplazamiento del fármaco se produce sólo en una dirección en las minicélulas fue una sorpresa mayor. Ha sido bien establecido que las bacterias vivas tienen procesos de eflujo activo para eliminar entidades químicas tóxicas que a veces ingresan en su citoplasma (reseñado por Borges-Walmsley y Walmsley, 2001). Estos procesos son mediados por transportadores de resistencia a múltiples fármacos, un grupo grande y diverso de proteínas capaces de proteger a las células contra una amplia variedad de toxinas ambientales mediante extrusión activa de compuestos nocivos. Existen al menos cinco familias conocidas basadas en similitud de secuencia, de transportadores de resistencia a múltiples fármacos. Incluyen las familias (i) de facilitadores principales (MFS), (ii) de resistencia-nodulación-división celular (RND), (iii) menor de resistencia a múltiples fármacos, (iv) de extrusión de múltiples fármacos y compuestos tóxicos y (v) de cassette de unión a ATP. Estos transportadores de resistencia a múltiples fármacos son proteínas unidas a la membrana bacteriana y están ampliamente distribuidos en las especies bacterianas.

Los transportadores de resistencia a múltiples fármacos se deberían conservar en las membranas de las minicélulas, aunque sorprendentemente parecen ser no funcionales, posiblemente porque las minicélulas son inanimadas y carecen del ATP necesario para conducir a los transportadores de resistencia a múltiples fármacos.

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

Otro método de carga de las minicélulas con un fármaco implica cultivar una célula bacteriana progenitora recombinante en condiciones tales que la célula bacteriana progenitora transcriba y traduzca un ácido nucleico

terapéutico que codifica el fármaco y el fármaco sea liberado en el citoplasma de la célula bacteriana progenitora. Por ejemplo, una agrupación de genes que codifica la vía celular biosintética para un fármaco deseado se puede clonar y transferir a una cepa bacteriana progenitora que sea capaz de producir minicélulas. La transcripción y la traducción genéticas de la agrupación de genes da lugar a la biosíntesis del fármaco dentro del citoplasma de las células bacterianas progenitoras, llenando el citoplasma bacteriano con el fármaco. Cuando la célula bacteriana progenitora se divide y forma la progenie de minicélulas, las minicélulas también contienen el fármaco en su citoplasma. Las minicélulas preempacadas se pueden purificar mediante cualquier proceso de purificación conocido en el área y descrito antes.

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

Para producir fármacos directamente dentro de células bacterianas progenitoras o minicélulas, las células bacterianas progenitoras o las minicélulas contienen una molécula de ácido nucleico que, luego de la transcripción y/o traducción, actúa para mejorar o de lo contrario tratar una enfermedad o modificar una característica en una célula, un tejido o un órgano. A los efectos de la presente descripción, dichas moléculas de ácido nucleico se categorizan como "moléculas de ácido nucleico terapéutico". Normalmente, el ácido nucleico terapéutico se encuentra en un plásmido dentro de la bacteria progenitora o las minicélulas.

La molécula de ácido nucleico terapéutico codifica un producto farmacológico, como un ARN funcional (por ej., antisentido o ARNip) o un péptido, un polipéptido o una proteína, cuya producción se desea. Por ejemplo, el material genético de interés puede codificar una hormona, un receptor, una enzima o un (poli)péptido de valor terapéutico. Una molécula de ácido nucleico terapéutico puede ser la contrapartida normal de un gen que expresa una proteína que actúa anormalmente o que está presente en niveles anormales en un estado patológico, como es el caso, por ejemplo, con el regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística en la fibrosis quística (Kerem *et al.*, 1989; Riordan *et al.*, 1989; Rommens *et al.*, 1989), con la  $\beta$ -globina en la anemia de células falciformes, y con la  $\alpha$ -globina,  $\beta$ -globina y  $\gamma$ -globina en la talasemia. La molécula de ácido nucleico terapéutico puede tener un transcrito de ARN antisentido o un ARN interferente pequeño, como se mencionó antes.

En el tratamiento del cáncer, una molécula de ácido nucleico terapéutico adecuada para usar según la presente invención podría tener una secuencia que corresponda a un gen o derive de un gen que se asocia a la supresión de un tumor, como el gen *p53*, el gen del retinoblastoma, y el gen que codifica el factor de necrosis tumoral. Una amplia variedad de tumores sólidos (cáncer, papilomas y verrugas) debería ser tratable por este método de conformidad con la invención. Los tipos de cáncer representativos en este sentido incluyen carcinoma de colon, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de piel, cáncer de hígado, cáncer de hueso, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de cerebro, cáncer de cabeza y cuello, y linfoma. Los papilomas ilustrativos son papiloma de células escamosas, papiloma del plexo coroides y papiloma laríngeo. Los ejemplos de afecciones de verruga son verrugas genitales, verrugas plantares, epidermodisplasia verruciforme y verrugas malignas.

Una molécula de ácido nucleico terapéutico para la presente invención también puede contener un segmento de ADN que codifique una enzima que convierta un profármaco inactivo en uno o más metabolitos citotóxicos de modo que, luego de la introducción *in vivo* del profármaco, la célula diana sea en efecto obligada, quizás también con sus células vecinas, a cometer suicidio. Las aplicaciones preclínicas y clínicas de dicho "gen suicida" que puede ser de origen humano o no humano, son reseñadas por Spencer (2000), Shangara *et al.* (2000) y Yazawa *et al.* (2002). Los genes suicidas ilustrativos de origen no humano son los que codifican la HSV-timidina cinasa (tk), la citocina desaminasa (CDA) + uracil fosforibosiltransferasa, la xantina-guanina fosforibosiltransferasa (GPT), la nitroreductasa (NTR), la purina nucleósido fosforilasa (PNP, DeoD), el citocromo P450 (CYP4B1), las carboxipeptidasas G2 (CPG2), y la D-aminoácido oxidasa (DAAO), respectivamente. Los genes suicidas de origen humano se ejemplifican por genes que codifican la carboxipeptidasa A1 (CPA), la desoxicitidina cinasa (dCK), el citocromo P450 (CYP2B1,6), LNGFR/FKBP/Fas, FKBP/caspasas y ER/p53, respectivamente.

Según la invención, el ácido nucleico terapéutico está contenido habitualmente en un plásmido dentro de la célula bacteriana progenitora o la minicélula. El plásmido también puede contener un segmento de ácido nucleico adicional que actúe como un elemento regulador, como un promotor, un terminador, un potenciador o una secuencia de señal, y que esté unido operablemente al segmento de ácido nucleico terapéutico.

Un plásmido dentro de una célula bacteriana progenitora o una minicélula de la invención también puede contener un elemento reportero. Un elemento reportero confiere a su huésped recombinante un fenotipo o característica fácilmente detectable, habitualmente mediante codificación de un polipéptido, que de lo contrario no es producido por el huésped, que puede ser detectado, luego de la expresión, por análisis histológico o *in situ*, por ejemplo por técnicas de imagenología *in vivo*. Por ejemplo, un elemento reportero suministrado por una minicélula intacta, según la presente invención, podría codificar una proteína que produzca, en la célula huésped que la engulle, un cambio colorimétrico o fluorométrico detectable por un análisis *in situ* y que es una función cuantitativa o semicuantitativa de

la activación transcripcional. Las proteínas ilustrativas de ese tipo son esterasas, fosfatasas, proteasas y otras enzimas, cuya actividad genera un cromóforo o fluoróforo detectable

Los ejemplos preferidos son  $\beta$ -galactosidasa de *E. coli*, que produce un cambio de color a través de la escisión de un sustrato indigogénico, indolil- $\beta$ -D-galactósido y una luciferasa, que oxida un aldehído de cadena larga (luciferasa bacteriana) o un ácido carboxílico heterocíclico (luciferina), con la concomitante liberación de luz. También es útil en este contexto un elemento reportero que codifica la proteína verde fluorescente (GFP) de la medusa, *Aequorea victoria*, como describen Prasher *et al.* (1995). El campo de la tecnología relacionada con GFP es ilustrado por dos solicitudes PCT publicadas, WO 095/21191 (que da a conocer una secuencia de polinucleótidos que codifica una apoproteína de GFP de 238 aminoácidos, que contiene un cromóforo formado por los aminoácidos 65 a 67) y WO 095/21191 (que da a conocer una modificación del ADNc para el apopéptido de la GFP de *A. victoria*, proporcionando un péptido que tiene propiedades fluorescentes alteradas), y por un reporte de Heim *et al.* (1994) de una GFP mutante, caracterizada por un aumento de 4 a 6 veces en la amplitud de excitación.

Los ejemplos siguientes ilustran y proporcionan una comprensión más completa de la invención y son sólo ilustrativos.

### **Ejemplo 1. Empacado eficaz de los fármacos antineoplásicos hidrófilos Doxorubicina y Vinblastina en minicélulas intactas de origen bacteriano**

Este ejemplo demuestra que se pueden empacar fármacos hidrófilos en el citoplasma de minicélulas intactas de origen bacteriano.

La Doxorubicina es un antibiótico antimitogénico de la familia de las antraciclinas aislado de *Streptomyces peuceitius*, y se usa comúnmente para el tratamiento del carcinoma de mama (Henderson *et al.*, 1989; Cowan *et al.*, 1991; Chan *et al.*, 1999; Paridaens *et al.*, 2000; Norris *et al.*, 2000). A pesar de la disponibilidad de los taxanos y otros nuevos agentes, la Doxorubicina sigue siendo un pilar del tratamiento para los pacientes con enfermedad metastásica.

Los alcaloides de la vinca constituyen una clase química de gran interés en la quimioterapia antineoplásica. Los compuestos líder, Vinblastina y Vincristina, han sido empleados en la práctica clínica durante más de treinta años y siguen siendo ampliamente utilizados hoy en día. La vinblastina inhibe la proliferación celular encapsulando los extremos de los microtúbulos, suprimiendo así la dinámica de los microtúbulos del huso mitótico.

Las minicélulas se obtuvieron de una cepa *minCDE*-mutante de *S. typhimurium* generada previamente, como se describe en la solicitud internacional N° PCT-IB02/04632 y se purificaron mediante un procedimiento de centrifugación en gradiente / filamentación / filtración / eliminación de endotoxina descrito antes.

El fármaco se empacó en las minicélulas mediante la creación de un gradiente de concentración del fármaco entre los compartimientos extracelulares e intracelulares. El fármaco se desplazó en sentido descendente de este gradiente al interior del citoplasma de la minicélula a través de la membrana intacta de las minicélulas.

Las minicélulas purificadas se empacaron con el antineoplásico Doxorubicina (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EE.UU.) de la manera siguiente. Se centrifugaron  $7 \times 10^9$  minicélulas en solución de BSG, se descartó el sobrenadante y las minicélulas se resuspendieron en 940  $\mu$ l de BSG y 60  $\mu$ l de solución de Doxorubicina (1 mg/ml; disuelta en agua destilada estéril). La suspensión se incubó toda la noche a 37 °C con rotación y para permitir que la Doxorubicina difundiera en el citoplasma de la minicélula. El exceso de Doxorubicina no unida específicamente a la superficie externa de las minicélulas se eliminó por lavado mediante ultrafiltración en celda agitada de la manera siguiente. Se montó un equipo Amicon de ultrafiltración en celda agitada modelo 8010 (Millipore, Billerica, MA, EE.UU.) según las instrucciones del fabricante con un disco de membrana de ultrafiltración (poliétersulfona; peso molecular de corte de 300 kDa; Millipore). La celda se lavó tres veces con agua destilada estéril seguido de otros tres lavados con BSG. Después la celda se llenó con 9 ml de BSG recién preparado y se agregó 1 ml de solución de minicélulas con Doxorubicina empacada. 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. Se continuó la ultrafiltración hasta que el volumen nuevamente descendió a 5 ml. Este procedimiento de completado / ultrafiltración se realizó 6 veces para permitir un lavado exhaustivo de las superficies exteriores de las minicélulas con Doxorubicina empacada. 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 con Doxorubicina empacada.

Las minicélulas con Doxorubicina empacada se montaron en portaobjetos de vidrio y se observaron con un microscopio de fluorescencia (Leica modelo DM LB microscopio de luz, aumento de 100x; Leica Microsystems, Alemania) porque la Doxorubicina es intrínsecamente fluorescente. Los resultados se capturaron usando la cámara Leica DC y el software de gestión de imágenes Leica IM. Se usó el filtro adecuado para permitir la observación de la

autofluorescencia de la Doxorubicina (excitación 488 nm, emisión 550 nm; fluorescencia roja).

Los resultados revelaron que todas las minicélulas mostraban fluorescencia roja brillante, lo que sugiere que la Doxorubicina había sido transferida al citoplasma de la minicélula y, a pesar de los exhaustivos pasos de lavado empleando el sistema de ultrafiltración de celda agitada, la Doxorubicina fue incapaz de difundir fuera del citoplasma de las minicélulas. Esto fue sorprendente, porque durante los pasos de lavado, el gradiente de concentración de Doxorubicina fue invertido, es decir la concentración de Doxorubicina en el citoplasma de la minicélula fue superior a la del ambiente extracelular (solución de BSG). Las minicélulas de control que no se incubaron con el fármaco no mostraron ningún fondo de autofluorescencia.

Para demostrar que el empacado de fármacos en minicélulas no está limitado a la doxorubicina, se realizaron experimentos similares con otro antineoplásico, la Vinblastina, que tiene una solubilidad en agua baja. Este fármaco no presenta autofluorescencia; por consiguiente se usó Vinblastina conjugada a BODIPY-FL (Molecular Probes, Eugene, OR, EE.UU.), un análogo fluorescente (excitación 505 nm, emisión 513 nm; fluorescencia roja). Las minicélulas purificadas se empacaron con Vinblastina conjugada a BODIPY-FL de la manera siguiente: el fármaco se disolvió inicialmente en metanol (solución madre de 10 mg/ml) y se diluyó 1:10 en PBS estéril para dar una solución madre de 1 mg/ml. Se centrifugaron  $7 \times 10^9$  minicélulas en solución de BSG, se descartó el sobrenadante y las minicélulas se resuspendieron en 940  $\mu$ l de BSG y 60  $\mu$ l de solución de Vinblastina conjugada a BODIPY-FL (solución madre de 1 mg/ml). Esto dio una concentración final de 60  $\mu$ g de fármaco en 1 ml de suspensión de minicélulas. La suspensión se incubó toda la noche a 37 °C con rotación para permitir que el fármaco difundiera en el citoplasma de las minicélulas. Los procedimientos siguientes de lavado del exceso de fármaco por ultrafiltración hasta la etapa de resuspensión final de las minicélulas con fármaco empacado en BSG, antes de la observación por microscopía de fluorescencia, fueron los mismos que los descritos antes para Doxorubicina.

Las minicélulas con fármaco empacado se montaron en portaobjetos de vidrio y se observaron con un microscopio de fluorescencia como antes y los resultados se capturaron con la cámara Leica DC y el software de gestión de imágenes Leica IM. Se usó el filtro adecuado para permitir la observación de la fluorescencia roja de la Vinblastina conjugada a BODIPY-FL.

Los resultados revelaron que todas las minicélulas mostraron fluorescencia roja brillante, lo que indica que el fármaco había sido transferido al citoplasma de la minicélula y, de manera similar a lo observado para la Doxorubicina, que los exhaustivos pasos de lavado empleando el sistema de ultrafiltración en celda agitada, no produjeron un eflujo del fármaco desde las minicélulas al líquido extracelular. Esto también fue sorprendente porque es un entendido convencional que únicamente los solutos muy hidrófilos pueden ingresar en una célula bacteriana por difusión, posiblemente a través de los canales de porinas que se encuentran en las membranas bacterianas. Sin embargo, los resultados de la presente muestran que incluso los fármacos que no son muy hidrófilos pueden difundir a través de la membrana de un derivado inanimado de una célula bacteriana, como una minicélula. Las minicélulas de control que no se incubaron con el fármaco no mostraron ningún fondo de autofluorescencia.

#### **Ejemplo 2. Empacado eficaz del fármaco antineoplásico hidrófobo Paclitaxel en minicélulas intactas de origen bacteriano**

Este ejemplo demuestra que se pueden empacar fármacos hidrófobos en el citoplasma de minicélulas intactas de origen bacteriano. Dado que la membrana superficial de la minicélula está compuesta por una bicapa fosfolipídica, la difusión de fármacos muy hidrófobos a través de la barrera es inesperada.

El taxol (Paclitaxel; marca registrada de Bristol-Myers Squibb Company) es un diterpeno tricíclico originalmente aislado de la corteza del tejo del Pacífico, y más recientemente de las agujas del tejo occidental *Taxus brevifolia*. Paclitaxel es uno de los antineoplásicos más importantes, tiene una actividad antitumoral prometedora, especialmente contra el cáncer de ovario, de mama y de pulmón (Aldarondo y Markman, 2002). Paclitaxel es un antimitótico que se une a la tubulina en una estequiometría 1:1 donde los heterodímeros de tubulina estabilizan los microtúbulos y conducen a un alto porcentaje de las células a detenerse en la fase G2/M, progresar lentamente en el ciclo celular sin citocinesis, formar células multinucleadas poliploides y sufrir apoptosis. Paclitaxel tiene una solubilidad en agua extremadamente baja de 0.00025 mg/ml y debe ser solubilizado en ciertos cosolventes como 50% de Cremophor EL y 50% de etanol.

Para demostrar que un fármaco hidrófobo como Paclitaxel podía ser transportado al citoplasma de la minicélula, se usó un derivado fluorescente de Paclitaxel, Paclitaxel conjugado a verde de Oregón® 488 (Molecular Probes, Eugene, OR, EE.UU.; absorbancia 496 nm, emisión 524 nm). Se adoptaron dos métodos diferentes para solubilizar el fármaco: (i) en etanol (para dar una solución madre 7.58 mM), y (ii) en etanol:cremophor EL (1:1 vol/vol; solución madre 3.79 mM). Cada solución madre se diluyó 1:10 (vol/vol) en PBS para dar soluciones madre 758  $\mu$ M y 379  $\mu$ M, respectivamente. Las últimas soluciones madre se agregaron a la suspensión de minicélulas ( $10^9$  minicélulas) en una dilución 1:20 para dar una concentración final de Paclitaxel conjugado a verde de Oregón® 488 en el ambiente extracelular de las minicélulas de 40  $\mu$ M y 20  $\mu$ M, respectivamente. Las minicélulas se incubaron con el fármaco a

37 °C toda la noche con rotación y luego se lavaron con ultrafiltración como se describió en el ejemplo 1 para Doxorubicina y Vinblastina. Las minicélulas se resuspendieron y se observaron por microscopía de fluorescencia, también como se describió en el ejemplo 1.

5 Los resultados revelaron que todas las minicélulas mostraron fluorescencia verde brillante, lo que sugiere que ambos métodos permitieron la transferencia de Paclitaxel desde el medio extracelular a través de la membrana de la minicélula al citoplasma de la misma. Esto fue sorprendente porque no se esperaba que fármacos altamente hidrófobos pudieran difundir en el citosol de la minicélula a través de la membrana de bicapa fosfolipídica (hidrófoba) de ésta. Además, análogamente a las observaciones de los experimentos del ejemplo 1, la inversión del gradiente osmótico durante los exhaustivos pasos de lavado no provocó eflujo del fármaco fuera del citoplasma de la minicélula.

15 Los resultados de los ejemplos 1 y 2 demuestran que las técnicas simples descritas antes, se pueden emplear para empacar fácilmente fármacos tanto hidrófilos como hidrófobos en vehículos de minicélulas de administración de fármacos.

### **Ejemplo 3. Métodos para determinar la concentración de fármaco en minicélulas intactas de origen bacteriano**

20 Este ejemplo demuestra un método para determinar la concentración de un fármaco en minicélulas intactas de origen bacteriano. Más particularmente, el ejemplo describe un método para determinar la concentración de Doxorubicina presente en minicélulas<sub>DOX</sub>, y demuestra el efecto de la concentración de Doxorubicina en una solución de carga. La aplicación de minicélulas con fármaco empacado con fines terapéuticos requiere la capacidad para caracterizar una entidad farmacológica empacada, que incluye determinar la cantidad de fármaco empacado.

25 Anteriormente, sin embargo, no había ningún método para romper efectivamente minicélulas intactas de origen bacteriano o células bacterianas y extraer las moléculas del fármaco empacado.

30 Las abreviaturas utilizadas a continuación incluyen (i) HCl; Ácido clorhídrico; (BDH AR MERCK, Australia), (ii) MeCN; Acetonitrilo, calidad residuo de pesticidas (Burdick & Jackson, MI, EE.UU.), (iii) IPA; Alcohol isopropílico o 2-propanol, calidad residuo de pesticidas (Burdick & Jackson), MQ; agua pulida RO MilliQ (R ≥ 1018 Q), C18 y RP18; se refieren a la química del empacado de la fase estacionaria presente en la columna de cromatografía (en este caso es una cadena de hidrocarburo de 18 carbonos de longitud unida al grupo silanol final de las partículas de sílice de 5 micrómetros (µm) de diámetro), (iv) HPLC & LC; cromatografía líquida de alto rendimiento, (v) MS; Espectrometría de masas, (vi) MS/MS; Colisión inducida por fragmentación de un ion precursor elegido para producir un ion producto definido (útil en la eliminación de efectos de matriz y aumento de la relación señal/ruido), (vii) ESI; Ionización por electronebulización (el ion actual se genera en nebulización termoneumática en la cabeza de la entrada del MS).

40 Se incubaron por separado 10<sup>9</sup> minicélulas intactas en una solución de Doxorubicina con concentraciones finales de 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200 y 250 µg/mL. Las mezclas se incubaron a 37 °C toda la noche con rotación. Las minicélulas se recogieron por centrifugación a 13 200 rpm/5 min y se resuspendieron en BSG estéril. La suspensión de minicélulas se colocó en una cámara de filtración Amicon (tamaño de poro 0.2 µm) y se lavó 10 veces con 10 ml de BSG por lavado. Se recogieron las minicélulas y se dividieron en duplicados de 5 x 10<sup>8</sup> minicélulas para la extracción de Doxorubicina.

45 Las minicélulas se centrifugaron a 13 200 rpm, y se descartó el sobrenadante. A cada sedimento, se le agregaron 500 µL de HCl-IPA 97 mM, seguido de 5 ciclos de 1 minuto de agitación en vórtex y 1 minuto de aplicación de ultrasonido. Se agregó MQ (500 µL) y se repitieron los 5 ciclos de 1 minuto de agitación en vórtex y 1 minuto de aplicación de ultrasonido. El extracto se centrifugó durante 5 minutos a 13 200 rpm para sedimentar los residuos, y el sobrenadante se transfirió a un inserto y vial de vidrio de HPLC de 150 µl. Como la Doxorubicina tiene autofluorescencia, se desarrolló y realizó un análisis de HPLC basado en fluorescencia del fármaco extraído, de la manera siguiente. Las características del método de HPLC incluyeron (i) Fase móvil: formiato de amonio 100 mM + 0.05% de trietilamina (pH = 3.5):MQ:MeCN fue 28:42:30 a 1 mL/min, (ii) Fase estacionaria: Merck Lichrosphere RP18, 5 µm, 4.0 mm x 250 mm, (iii) Temperatura de la columna: 40 °C, (iv) Volumen de inyección: 15 µL, (v) Detección: Fluorescencia - Excitación 480 nm, Emisión 550 nm, (vi) Sistema de HPLC: se usó un sistema Shimadzu 10AVP, que comprendía un automuestreador, desgasificador del solvente, bomba cuaternaria, calentador de la columna (40 °C) y detector de fluorescencia, versión del software de corrida 7.2 SPI rev B. Shimadzu Corporation (Kyoto Japón).

60 Las mediciones de Doxorubicina se hicieron usando tanto HPLC como LC-MS para confirmar que los datos eran confiables. El procedimiento de LC-MS y las características clave incluyeron (i) Fase móvil: formiato de amonio 5 mM (pH = 3.5): MeCN = 76:24 a 0.2 mL/min, (ii) Fase estacionaria: Phenomenex Luna C18 (2), 5 µm, 2.0 mm x 150 mm, (iii) Temperatura de la columna: 30 °C, (iv) Volumen de inyección: 2 µL, (v) Sistema LC y MS: ambos sistemas LC y MS fueron de Thermo-Finnigan (Boston, MA, EE.UU.). El sistema de LC estaba compuesto por un

automuestreador con calentador de columna integrado y bomba. El eluyente de la columna fue transferido directamente a la fuente de ionización por electronebulización del espectrómetro de masas de trampa de iones Thermo-Finnigan LCQ-Deca, (vi) Detección: el detector de MS se operó en modo de ion positivo y modo de barrido MS/MS. El ion precursor se fijó a  $m/z = 543.9$ , produciendo un ión producto a  $m/z = 396.8$ . El ion producto se rastreó con fines de cuantificación.

Las tres determinaciones fluorescentes y los resultados de la MS se graficaron juntos (Figura 1) para indicar sus determinaciones de [DOX] equivalentes (dentro de las barras de error de las mediciones). Los resultados mostraron una clara correlación entre la concentración de Doxorubicina extraída de las minicélulas<sub>DOX</sub> y la concentración de carga externa de Doxorubicina. Estos experimentos se repitieron 3 veces con resultados semejantes. Además, las técnicas se adaptaron para determinar la concentración de otros antineoplásicos como Paclitaxel, Irinotecán, 5-Fluorouracilo y Cisplatino empacados en minicélulas intactas.

#### **Ejemplo 4. Los fármacos y la unión de los ligandos superficiales no causan la inestabilidad de la minicélula ni la pérdida de estructuras integradas a la membrana.**

Este ejemplo demuestra que el empaquetado de fármacos en minicélulas y la unión de ligandos a la superficie de las minicélulas con fármaco empacado no causa inestabilidad de las minicélulas, escapes de fármaco ni pérdida de estructuras integradas a la membrana de las minicélulas. El resultado es sorprendente porque se esperaría que los fármacos en el citoplasma, particularmente los antineoplásicos altamente nocivos, desestabilizaran la membrana de bicapa de la minicélula.

Se diseñó un estudio para determinar si el empaquetado de fármacos en minicélulas y/o la unión de ligandos biespecíficos a estructuras superficiales (p. ej. el componente antígeno O de LPS) de las minicélulas causaría escape de fármacos y/o pérdida de estructuras integradas a la bicapa de la minicélula con el ligando biespecífico (por ejemplo, shedding de LPS). Se empacaron minicélulas ( $5 \times 10^8$ ) con Doxorubicina o con Paclitaxel conjugado a verde de Oregón® 488 (Molecular Probes, Eugene, OR, EE.UU.) como se describió antes. La concentración de fármaco en las minicélulas<sub>DOX</sub> y en las minicélulas<sub>Pac</sub> se determinó como se describió en el ejemplo 3, y los resultados mostraron 425 ng de DOX y 245 ng de Paclitaxel, respectivamente.

Se construyó un BsAb con especificidades anti-antígeno O de *S. typhimurium* y anti-EGFR como se describe en PCT/US2004/041010. En resumen, se construyó un anticuerpo biespecífico (BsAb) uniendo un anticuerpo monoclonal (MAb) anti-antígeno O de *S. typhimurium* (IgG1; Biotess) y un MAb dirigido contra un receptor de superficie de la célula diana que es anti-EGFR humano de ratón (IgG2a; Oncogene) o anti receptor de *HER2/neu* humano de ratón (IgG1; Serotec). Los dos anticuerpos se reticularon a través de sus regiones Fc, utilizando la proteína recombinante purificada A/G (Pierce Biotechnology). En resumen, se agregó proteína A/G (100 µg/ml de concentración final) a 0.5 ml de una solución premezclada que contenía 20 µg/ml de cada uno de los MAb anti-antígeno O de *S. typhimurium* y anti-EGFR humano y se incubaron toda la noche a 4 °C. El exceso de anticuerpos se eliminó por incubación con perlas magnéticas conjugadas a proteína G y mezclando suavemente a temperatura ambiente durante 40 min. Después de la separación magnética de las perlas, el complejo proteína A/G-BsAb se incubó con  $5 \times 10^8$  minicélulas con fármaco empacado durante 1 h a temperatura ambiente para recubrir las minicélulas con el anticuerpo a través de la unión del brazo Fab específico del antígeno O al LPS de la superficie. Se usó Alexa-Fluor 488® (Molecular Probes; fluorescencia verde) o Alexa Fluor® 594 (Molecular Probes; fluorescencia roja) para conjugar al BsAb. Se mezclaron las minicélulas<sub>DOX</sub> con BsAb conjugado a Alexa-Fluor 488® y se mezclaron las minicélulas<sub>Pac</sub> con BsAb conjugado a Alexa Fluor® 594. Las diversas preparaciones de minicélulas se observaron con un microscopio de fluorescencia Leica empleando un objetivo de 100x y los filtros adecuados para la fluorescencia roja y verde.

Los resultados mostraron que la unión de BsAb a la superficie de la minicélula<sub>DOX</sub> y la minicélula<sub>Pac</sub> fue intensa, apareciendo como un anillo completo alrededor del citoplasma de la minicélula. Los fármacos individuales Doxorubicina y Paclitaxel también se observaron dentro del citoplasma de la minicélula. Los fármacos se extrajeron de las minicélulas como se describió antes y se determinaron las concentraciones de los mismos. Las concentraciones de los fármacos fueron las mismas en las minicélulas<sub>DOX</sub> y las minicélulas<sub>Pac</sub> en comparación con las <sup>EGFR</sup>minicélulas<sub>DOX</sub> y las <sup>EGFR</sup>minicélulas<sub>Pac</sub> (es decir, 425 ng de Doxorubicina y 245 ng de Paclitaxel, respectivamente).

Se obtuvieron resultados similares usando otros BsAbs, como un anti-antígeno O/anti-*HER2/neu*. Esto sugiere que los métodos son compatibles con el desarrollo de un vector de administración de fármacos seguro, porque el empaquetado de fármacos y la unión de BsAb no producen inestabilidad del vector ni escape del fármaco desde la minicélula intacta.

#### **Ejemplo 5. Administración dirigida *in vitro* de Doxorubicina a células de cáncer de cerebro humano no fagocíticas a través de minicélulas con Doxorubicina empacada y dirigidas por ligando**

Este ejemplo demuestra que un antineoplásico, Doxorubicina, empacado en minicélulas intactas que llevan un ligando biespecífico unido a la superficie de la célula, puede (a) unirse específicamente a la superficie de una célula diana de mamífero no fagocítica, el receptor EGF en células de cáncer de cerebro humano, y (b) administrar el fármaco intracelularmente en la célula de mamífero luego de la endocitosis y la ruptura de las minicélulas con Doxorubicina empacada.

Se purificaron minicélulas derivadas de *S. typhimurium minCDE* y se empacaron con Doxorubicina, como se describió en el ejemplo 1.

Se construyó un anticuerpo biespecífico como se describió antes y en la solicitud de patente de Estados Unidos N° 10/602,021 y como se describió brevemente en el ejemplo 4.

El anticuerpo monoclonal anti-EGFR se eligió porque las células diana que se iban a analizar eran células de cáncer de cerebro humano U87-MG (ATCC, Rockville, MD, EE.UU.; línea celular de astrocitoma epitelial maligno humano) que se sabe que sobreexpresan el receptor EGF en la superficie celular.

El anticuerpo biespecífico se marcó con una tintura fluorescente para permitir la observación y el rastreo, mediante microscopía confocal de fluorescencia, de las minicélulas dirigidas. El procedimiento fue el siguiente. Se utilizó el kit de marcado de proteínas Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, Eugene, OR, EE.UU.) para marcar el anticuerpo biespecífico. Se conjugó la tintura Alexa Fluor 488 (absorbancia 494 nm, emisión 519 nm; fluorescencia verde) a través de los grupos amina libres del anticuerpo biespecífico según las instrucciones del fabricante.

Se cultivaron células de astrocitoma U87-MG en cubreobjetos de 15 mm en placas de cultivo tisular de 12 pocillos (Cellstar; Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Alemania). Las células se cultivaron en medio RPMI 1640 con 5% de suero de ternero cosmo (Hyclone, Logan, UT, EE.UU.) y glutamina 2 mM y se incubaron a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub>. Las células se cultivaron hasta 40% de confluencia y los pocillos por cuatuplicado se trataron de la manera siguiente: (a) células sin tratar como controles negativos, (b) 10<sup>8</sup> minicélulas vacías no dirigidas, (c) 10<sup>8</sup> minicélulas vacías dirigidas, (d) 10<sup>8</sup> minicélulas con Doxorubicina empacada no dirigidas, y (e) 10<sup>8</sup> minicélulas con Doxorubicina empacada dirigidas. La reacción de incubación se terminó después de 8 h en 2 pocillos de cada muestra y las muestras por duplicado restantes se terminaron después de 24 h. Luego de la incubación, las células se lavaron cuatro veces con PBS y se fijaron con formaldehído al 4% durante 10 min. El fijador se lavó tres veces con PBS y los cubreobjetos se invirtieron sobre portaobjetos de vidrio con glicerol. Los cubreobjetos se sellaron con agarosa al 1%.

Los portaobjetos se observaron por microscopía confocal de fluorescencia (Fluoview, Olympus America, Melville, NY, EE.UU.). Se obtuvieron imágenes de fluorescencia y por contraste diferencial (DIC) y los resultados revelaron que en el transcurso de las 8 horas de incubación, en las minicélulas con Doxorubicina empacada dirigidas (que llevaban el anticuerpo biespecífico conjugado a Alexa Fluor 488; verde fluorescencia) se observó que la mayoría de las células estaban cubiertas por varios puntos fluorescentes verdes, mientras que las no dirigidas (carecían del anticuerpo biespecífico marcado con fluorescencia) mostraron sólo algunos puntos verdes fluorescentes en muy pocas células. Esto sugirió que el anticuerpo biespecífico permitió específicamente que las minicélulas con Doxorubicina empacada se adhirieran fuertemente a la superficie de las células de astrocitoma, presumiblemente a través del receptor EGF. Luego de 24 horas de coincubación de las células de astrocitoma y las minicélulas con Doxorubicina empacada (dirigidas y no dirigidas), los resultados, cuando se observaron para determinar fluorescencia roja (la autofluorescencia de la Doxorubicina es roja), mostraron que la mayoría de las células de astrocitoma presentaban puntos fluorescentes de color rojo brillante sobre la superficie de la célula y muchas células mostraban fluorescencia roja difusa dentro del citoplasma celular, según se determinó observando secciones a lo largo de la célula por microscopía confocal de fluorescencia. Este resultado contrastó con el de las células de astrocitoma incubadas durante 24 horas con minicélulas con Doxorubicina empacada no dirigidas, en las que sólo se pudieron observar unos pocos puntos fluorescentes rojos (adhesión no específica de las minicélulas) en unas pocas células. Esto sugiere que muchas de las minicélulas con Doxorubicina empacada habían sido internalizadas, muy probablemente a través de endocitosis mediada por el receptor EGF, y que algunas minicélulas se habían roto y liberado la Doxorubicina dentro del citoplasma de las células de astrocitoma. Los resultados se confirmaron posteriormente cuando se fusionaron las imágenes de fluorescencia verde y fluorescencia roja para revelar que la mayoría de los puntos verdes se colocalizaban con los puntos rojos, dando lugar a puntos amarillos. La fluorescencia roja difusa observada anteriormente dentro del citoplasma de las células de astrocitoma seguía siendo roja, lo que sugiere que la Doxorubicina (autofluorescencia roja) ya no estaba empacada dentro de las minicélulas (reveladas verde por el anticuerpo biespecífico localizado en la superficie de las minicélulas), lo que sugiere además que algunas minicélulas que habían sido internalizadas por endocitosis se habían roto y liberado la Doxorubicina dentro del citoplasma de las células de astrocitoma.

### **Ejemplo 6. Eficacia de la administración de fármacos mediada por minicélulas a células de mamífero no fagocíticas**

Este ejemplo demuestra la eficacia de la administración de fármacos mediada por minicélulas a células de mamífero

no fagocíticas. Se usó un ensayo de citotoxicidad colorimétrico (Promega; CellTiter 96 Aqueous One™). Se trataron células de adenocarcinoma de mama humano MDA-MB-468 con <sup>EGFR</sup>minicélulas<sub>DOX</sub> o controles que contenían Doxorubicina libre y <sup>no dirigidas</sup>minicélulas<sub>DOX</sub>. Se sembraron células MDA-MB 468 a una concentración de  $5 \times 10^6$  células en matraces T75 y se incubaron durante 48 horas para obtener  $\sim 1 \times 10^7$  células/matraz. Se cambió el medio y las células se trataron con  $10^9$  <sup>no dirigidas</sup>minicélulas<sub>DOX</sub> o <sup>EGFR</sup>minicélulas<sub>DOX</sub>. También se incluyó Doxorubicina libre (50 ng/ml) como control positivo. Las células se incubaron durante 24 horas, se lavaron bien con 3 cambios de PBS y se tripsinizaron. Las células viables se contaron en un hemocitómetro usando el método de exclusión con azul de tripiano. Se distribuyeron alícuotas de  $1 \times 10^4$  células/ml por pocillo en placas de 24 pocillos (6 pocillos por tratamiento) que se incubaron durante 3, 4, 5 y 6 días con cambio de medio cada día. Se realizó ensayo MTS en cada momento según las instrucciones del fabricante. En resumen, se agregaron 100  $\mu$ l de MTS en cada pocillo y se controló el desarrollo de color en el transcurso de 2.5 h a 4 h. Se transfirieron 100  $\mu$ l de cada pocillo a una placa de 96 pocillos y se leyó la absorbancia a 490 nm.

Los resultados mostraron (Figura 2) que la citotoxicidad de las <sup>EGFR</sup>minicélulas<sub>DOX</sub> fue similar a la de la Doxorubicina libre, lo que sugiere que las <sup>EGFR</sup>minicélulas<sub>DOX</sub> administraron Doxorubicina en su forma activa a las células MDA y que la eficacia de la administración de fármaco fue superior a 95%. Las <sup>no dirigidas</sup>minicélulas<sub>DOX</sub> no mostraron ninguna toxicidad sobre las células cancerosas, lo que sugiere que el mecanismo de administración dirigida fue importante para la seguridad de la farmacoterapia basada en minicélulas, porque no parece que las células de mamífero no fagocíticas no hicieran específicamente la endocitosis de las minicélulas.

#### **Ejemplo 7. Administración altamente eficaz del antineoplásico Doxorubicina a través de minicélulas con fármaco empacado dirigidas a xenoinjertos de cáncer de mama humano en ratones atímicos**

Este ejemplo demuestra que las minicélulas intactas con Doxorubicina empacada y dirigidas por ligando biespecífico pueden causar la regresión de xenoinjertos de tumor de células de cáncer de mama humano establecidos en ratonas atímicas de 6 semanas de vida.

Como se describió antes, las minicélulas se obtuvieron de una cepa *minCDE*-mutante de *S. typhimurium* y se purificaron empleando un procedimiento de centrifugación en gradiente / filamentación / filtración / eliminación de endotoxina. Las minicélulas purificadas se empacaron con el antineoplásico Doxorubicina como se describió en el ejemplo 1.

Se construyó un anticuerpo biespecífico como se describió en el ejemplo 3. Se eligió un anticuerpo monoclonal anti-EGFR porque las células con xenoinjerto eran células de cáncer de mama humano MDA-MB-468 que se sabe que sobreexpresan el receptor de EGF en la superficie celular.

Se incubaron las minicélulas recombinantes ( $10^{10}$ ) con el anticuerpo biespecífico proteína A/G durante 1 hora a temperatura ambiente, para recubrir las minicélulas con el anticuerpo a través de su región Fab anti-LPS.

Los ratones utilizados en este ejemplo se compraron a Animal Resources Centre (Perth, WA, Australia), y todos los experimentos con animales se llevaron a cabo cumpliendo con las pautas de atención y uso de animales de laboratorio y con la aprobación del Comité de ética para la experimentación animal. Los experimentos se realizaron en las instalaciones para animales pequeños acreditadas por NSW Agriculture en EnGeneIC Pty Ltd (Sidney, Nueva Gales del Sur, Australia). Se cultivaron células de adenocarcinoma de mama humano (MDA-MB-468, ATCC; Células epiteliales mamarias humanas; no fagocíticas) en cultivo tisular hasta confluencia total en matraces T-75 en medio RPMI 1640 complementado con 5% de suero fetal bovino GIBCO-BRL  $\mu$ Life Technologies, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EE.UU.), y glutamina (Invitrogen) en atmósfera humedecida de 95% de aire y 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C. Se inyectaron por vía subcutánea  $1 \times 10^6$  células en 50  $\mu$ l de medio exento de suero junto con 50  $\mu$ l de matrigel de factor de crecimiento reducido (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, EE.UU.) entre los omoplatos de cada ratón usando una aguja de calibre 23. Los tumores se midieron dos veces por semana, usando un calibrador digital electrónico (precisión de 0.001), producto de Mitutoyo (Japón) y se calculó la media del volumen del tumor empleando la fórmula: longitud (mm) x ancho<sup>2</sup> (mm) X 0.5 = volumen (mm<sup>3</sup>). 16 días post-implantación, los tumores alcanzaron volúmenes entre 50 mm<sup>3</sup> y 80 mm<sup>3</sup>, y los ratones se distribuyeron al azar en 7 grupos diferentes de 11 ratones por grupo.

El experimento se diseñó de la manera siguiente. El grupo 1 (control) no recibió tratamiento. El grupo 2 (control) recibió Doxorubicina libre (5  $\mu$ g/g de peso corporal del ratón) por vía intratumoral. Este control se incluyó para determinar el efecto de la Doxorubicina libre sobre las células tumorales y para evaluar los efectos secundarios tóxicos. El grupo 3 (control) fue igual al grupo 2, excepto que la Doxorubicina se administró por vía intravenosa. El grupo 4 (control) recibió el BsAb anti-antígeno O/anti-EGFR y Doxorubicina libre por vía intravenosa para demostrar el efecto del BsAb en ausencia de minicélulas. Los grupos 5 y 6 recibieron <sup>no dirigidas</sup>minicélulas<sub>DOX</sub> por vía intravenosa e intratumoral, respectivamente, para determinar si las minicélulas con empacado de fármaco pero no dirigidas podían efectuar la estabilización del tumor. Los grupos 7 y 8 recibieron <sup>EGFR</sup>minicélulas<sub>DOX</sub> dirigidas por EGFR por vía intravenosa e intratumoral, respectivamente, Para determinar si las minicélulas con fármaco empacado dirigidas

por receptor podían efectuar la estabilización del tumor. El grupo 8 se incluyó para determinar si las minicélulas con Doxorubicina empacada dirigidas, administradas en la vena de la cola podían seguir la secuencia de eventos necesaria para alcanzar la estabilización y/o la regresión del tumor, es decir, penetrar la vasculatura permeable en el sitio del tumor (región del omóplato), difundir a través del microambiente del tumor, unirse específicamente a las células de cáncer de mama humano, sufrir endocitosis, romperse intracelularmente y liberar la carga útil de fármaco en su forma bioactiva en el citoplasma de la célula cancerosa para provocar la muerte de la célula y por consiguiente la estabilización y/o la regresión del tumor. Las minicélulas se administraron a una dosis de  $10^8$  y todos los tratamientos se hicieron los días 17, 24, 27 y 56 post establecimiento del xenoinjerto. Todas las mediciones fueron realizadas por un investigador a ciegas respecto a los tratamientos administrados. El análisis estadístico se realizó mediante análisis de varianza (ANOVA) y  $P < 0.05$  Se consideró como estadísticamente significativo.

Los resultados mostraron (Figura 3) que sólo se observó una estabilización/regresión altamente significativa ( $p = 0.0004$ ) del tumor con el tratamiento con  $^{EGFR}$ minicélulas<sub>DOX</sub>, administrado ya sea por vía intravenosa o intratumoral. No se observó regresión del tumor con las <sup>no dirigidas</sup>minicélulas<sub>DOX</sub>, lo que sugiere que la administración dirigida mediada por BsAb fue esencial. El día 63, el tratamiento para el grupo de las minicélulas<sub>DOX</sub> se cambió a tratamiento con  $^{EGFR}$ minicélulas<sub>DOX</sub> para determinar si los volúmenes tumorales grandes ( $800 \text{ mm}^3$  a  $1200 \text{ mm}^3$ ) podían reducirse con el tratamiento dirigido. El resultado fue una regresión tumoral drástica; hacia el día 79, con sólo dos tratamientos con  $^{EGFR}$ minicélulas<sub>DOX</sub>, los volúmenes tumorales habían retrocedido a un volumen entre  $100 \text{ mm}^3$  y  $150 \text{ mm}^3$ . El experimento completo se realizó 3 veces, obteniéndose cada vez resultados similares. Esto mostró que las minicélulas dirigidas por BsAb podían administrar específicamente un antineoplásico a un xenoinjerto de tumor humano *in vivo*.

El resultado es una primera demostración de administración dirigida de un fármaco *in vivo* a células de mamífero no fagocíticas mediada por minicélulas intactas con fármaco empacado de origen bacteriano.

Curiosamente, la Doxorubicina libre administrada en la vena de la cola de los ratones (grupos 3 y 4) mostró una reacción grave en el sitio de la inyección, un efecto secundario bien conocido de las inyecciones intravenosas de Doxorubicina libre en los seres humanos. Esta reacción, conocida como flebitis, se cree que es causada por la extravasación del fármaco en el sitio de la inyección y que está asociada a la destrucción de células normales en la región localizada. En contraste, los ratones que recibieron minicélulas con Doxorubicina empacada dirigidas o no dirigidas no mostraron ninguna reacción adversa en el sitio de la inyección, lo que sugiere que el empacado de la Doxorubicina en las minicélulas evitó la reactividad de la Doxorubicina libre con el tejido cutáneo en el sitio de inyección. Además, a diferencia de los vectores de administración liposómicos, por ej., DOXIL (doxorubicina liposómica), el fármaco no se escapa de las minicélulas.

Estos resultados sugieren lo siguiente: (a) las minicélulas son capaces de empacar un fármaco potencialmente muy tóxico como la Doxorubicina en el citoplasma de la minicélula y el fármaco no parece escaparse fuera de la membrana de la minicélula. Por ello, la falta de reactividad cutánea en el sitio de inyección en la vena de la cola (grupos 5 y 7) que se observó con la Doxorubicina libre (grupos 3 y 4), (b) las minicélulas con Doxorubicina empacada son seguras al menos en ratones atímicos cuando son inyectadas por vía intravenosa o intratumoral (grupo 5 y 8), lo que sugiere que el procedimiento de eliminación de la endotoxina libre (lipopolisacárido) adoptado e inventado previamente por los inventores de la presente (solicitud de patente de Estados Unidos número PCT/IB02/04632) es suficiente para proporcionar una dosis de minicélulas suficientemente exenta de endotoxina para ser segura por administración intravenosa o intratumoral subcutánea, (c) las minicélulas dirigidas parecen ser suficientemente pequeñas para penetrar la neovasculatura perforada del tumor, de modo de permitir el ingreso de las minicélulas con Doxorubicina empacada al microambiente tumoral, (d) las minicélulas con Doxorubicina empacada dirigidas parecen unirse específicamente al receptor de EGF que se sabe que es sobreexpresado en la superficie de las células MDA-MB-468 y luego de la endocitosis, las minicélulas se rompen y liberan la Doxorubicina, provocando la muerte de las células tumorales y la regresión observada del tumor (grupo 7; Figura 3), (e) luego de la inyección intravenosa las minicélulas con Doxorubicina empacada y dirigidas alcanzan el microambiente tumoral en una concentración significativa para lograr la regresión del tumor. En consecuencia, las minicélulas no parecen haber sido eliminadas por las células fagocíticas profesionales circulantes en cantidades significativas para obviar el efecto terapéutico observado.

#### **Ejemplo 8. Administración altamente eficaz del antineoplásico hidrófobo, Paclitaxel a través de minicélulas con fármaco empacado dirigidas a xenoinjertos de cáncer de mama humano en ratones atímicos.**

Este ejemplo demuestra la administración altamente eficaz del antineoplásico hidrófobo, Paclitaxel, a xenoinjertos de cáncer de mama humano en ratones atímicos a través de minicélulas con fármaco empacado y dirigidas. El experimento que se muestra en el ejemplo 7 se repitió usando  $^{EGFR}$ minicélulas<sub>Paclitaxel</sub> como tratamiento experimental. Los tratamientos incluyeron, (i) G1 - sólo tumor, (ii) G2 - Paclitaxel libre ( $400 \mu\text{g}$ ) administrado por vía intratumoral, (iii) G3 - Paclitaxel libre ( $400 \mu\text{g}$ ) administrado por vía intravenosa, (iv) G4 - BsAb anti-antígeno O/anti-EGFR y Paclitaxel libre ( $400 \mu\text{g}$ ) administrados por vía intravenosa, (v) G5 - <sup>no dirigidas</sup>minicélulas<sub>Pac</sub> administradas por vía intravenosa, (vi) G6 - <sup>no dirigidas</sup>minicélulas<sub>Pac</sub> administradas por vía intratumoral, (vii) G7 -  $^{EGFR}$ minicélulas<sub>Pac</sub>

administradas por vía intravenosa, (viii) G8 - <sup>EGFR</sup>minicélulas<sub>Pac</sub> administradas por vía intratumoral. Los diversos tratamientos se administraron los días 15, 21, 26, 29 y 33. Se usaron  $1 \times 10^8$  minicélulas en cada tratamiento.

Los resultados mostraron (Figura 4) una estabilización/regresión altamente significativa ( $p = 0.0004$ ) del tumor en ratones tratados con <sup>EGFR</sup>minicélulas<sub>Pac</sub> y, una vez más, no importó si el tratamiento se había administrado por vía intravenosa o intratumoral. Los tratamientos de control incluyendo <sup>no dirigidas</sup>minicélulas<sub>Pac</sub>, BsAb y Paclitaxel libre tuvieron un efecto despreciable sobre el crecimiento del tumor. Durante todo el experimento, los ratones no mostraron signos manifiestos de toxicidad como fiebre, letargo, pérdida de apetito o incluso la muerte. El experimento se repitió 3 veces con resultados similares.

Este resultado es particularmente significativo, porque otros vectores de administración de fármacos, como liposomas, nanopartículas, etc., no han empacado exitosamente cantidades terapéuticamente significativas de fármacos altamente hidrófobos como Paclitaxel. En la mayoría de los casos, se hicieron intentos de cambiar la estructura química del vector o el fármaco para permitir el empacado del fármaco, resultando a menudo en pérdida de la bioactividad. Nuestro resultado es el primero que muestra que no sólo dichos fármacos pueden ser fácilmente empacados en minicélulas intactas, sino que se pueden administrar de forma segura específicamente a células diana enfermas *in vivo* para lograr un efecto terapéutico.

#### **Ejemplo 9. Demostración de la versatilidad de la administración dirigida de fármacos a base de minicélulas a células de mamífero**

Este ejemplo demuestra lo siguiente: (i) los vectores de minicélulas con fármaco empacado dirigidos son suficientemente versátiles para lograr un efecto terapéutico en una serie de células no fagocíticas diferentes, (ii) el mecanismo de administración dirigida es suficientemente versátil para permitir el uso de diferentes receptores diana de la superficie celular en las células enfermas y no está restringido al receptor de EGF, y (iii) el vector de minicélulas en sí mismo es suficientemente versátil para permitir el uso de minicélulas derivadas de diferentes géneros bacterianos.

En un experimento de xenoinjerto en un solo ratón atímico, (i) se usaron células de cáncer de ovario humano (SKOV3; ATCC. EE.UU.) para establecer el xenoinjerto de tumor, (ii) se construyó el BsAb de administración dirigida usando MAb anti-antígeno O y Mab anti-HER2/*neu* (Se sabe que el último receptor se sobreexpresa en la superficie de células SKOV3), y (iii) las minicélulas utilizadas para el tratamiento se derivaron de cepas *minCDE* de *S. typhimurium* y de *E. coli*. Se incluyeron como controles <sup>no dirigidas</sup>minicélulas<sub>DOX</sub>, BsAb (anti-HER2/anti-antígeno O) y Doxorubicina libre.

Los resultados mostraron (Figura 5) una significativa estabilización del tumor en ratones tratados con <sup>HER2</sup>minicélulas<sub>DOX</sub> derivadas de *S. typhimurium minCDE* o *E. coli minCDE* ( $p = 0.004$ ). Los xenoinjertos de SKOV3 crecieron mucho más rápido que los xenoinjertos de MDA-MB-468, y el experimento sólo se pudo seguir hasta 31 días post establecimiento del xenoinjerto porque los animales de control habían alcanzado el punto de muerte o eutanasia.

Estos resultados demostraron (i) que se pueden usar minicélulas intactas para administrar fármacos *in vivo* a una serie de células de mamífero no fagocíticas diferentes, (ii) que los vectores de minicélulas intactas se pueden dirigir a una diversidad de receptores de la superficie celular encontrados en las células enfermas, y (iii) que las minicélulas se pueden derivar de diferentes especies o géneros de bacterias, pero que funcionan de manera semejante, particularmente con respecto a la administración de fármacos a células diana *in vivo*.

#### **Ejemplo 10. La relación entre una dosis de minicélulas con fármaco empacado dirigidas y el efecto terapéutico sobre xenoinjertos de tumor humano en ratones atímicos.**

Este ejemplo demuestra la relación dosis-efecto para minicélulas con fármaco empacado. Más específicamente, el ejemplo muestra la dosis de minicélulas con fármaco empacado dirigidas, necesaria para lograr el efecto terapéutico máximo sobre xenoinjertos de tumor humano en ratones atímicos.

Se establecieron células MDA-MB-468 (adenocarcinoma de mama humano) como xenoinjertos entre los omoplastos de ratones Balb/c nu/nu. Se empacaron minicélulas derivadas de *S. typhimurium minCDE* con Doxorubicina usando dos concentraciones externas de Doxorubicina diferentes, 60  $\mu\text{g/ml}$  y 200  $\mu\text{g/ml}$  como se describió en el ejemplo 3. Se purificaron las minicélulas<sub>DOX</sub> (Ejemplo 1) y las muestras se analizaron por HPLC para determinar la concentración de Doxorubicina empacada en  $10^8$  minicélulas. Los resultados mostraron que a las concentraciones externas de Doxorubicina de 60  $\mu\text{g/ml}$  y 200  $\mu\text{g/ml}$ ,  $10^8$  minicélulas empacaron 85 ng y 660 ng de Doxorubicina, respectivamente.

Entonces las minicélulas<sub>DOX</sub> se dirigieron al EGFR que se sobreexpresa en las células MDA-MB-468 y se prepararon seis dosis intravenosas diferentes para los ratones, (i) G1 -  $10^8$  <sup>EGFR</sup>minicélulas<sub>DOX</sub> que transportaban un total de 660

5 ng de Doxorrubicina, (ii) G2 -  $10^8$  EGFR<sup>+</sup> minicélulas<sub>DOX</sub> que transportaban un total de 85 ng de Doxorrubicina, (iii) G3 -  $10^7$  EGFR<sup>+</sup> minicélulas<sub>DOX</sub> que transportaban un total de 66 ng de Doxorrubicina, (iv) G4 -  $10^7$  EGFR<sup>+</sup> minicélulas<sub>DOX</sub> que transportaban un total de 8.5 ng de Doxorrubicina, (v) G5 -  $10^6$  EGFR<sup>+</sup> minicélulas<sub>DOX</sub> que transportaban un total de 6.6 ng de Doxorrubicina, y (vi) G6 -  $10^6$  EGFR<sup>+</sup> minicélulas<sub>DOX</sub> que transportaban un total de 0.85 ng de Doxorrubicina. Luego del establecimiento de los xenoinjertos con volúmenes tumorales entre 50 mm<sup>3</sup> y 80 mm<sup>3</sup>, se administraron por vía intravenosa las diversas dosis a los ratones. Se midieron los volúmenes tumorales como se describió previamente.

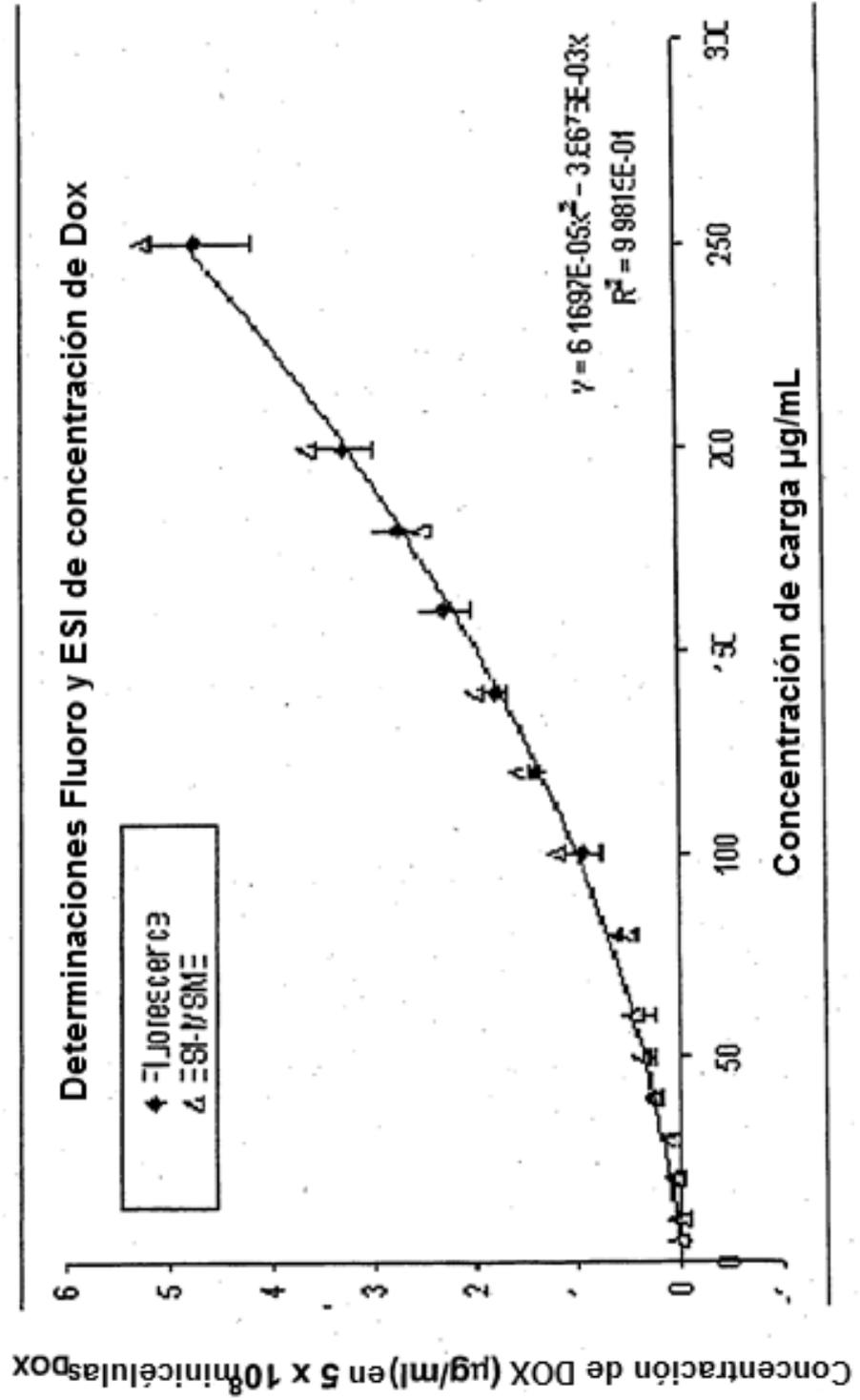
10 Los resultados mostraron (Figura 6) una clara relación entre la dosis de minicélulas y el efecto terapéutico. En términos de estabilización/regresión del tumor,  $10^8$  EGFR<sup>+</sup> minicélulas<sub>DOX</sub> fueron más eficaces que  $10^7$  EGFR<sup>+</sup> minicélulas<sub>DOX</sub>, que a su vez fueron más eficaces que  $10^6$  EGFR<sup>+</sup> minicélulas<sub>DOX</sub>. Curiosamente, no hubo mayor diferencia en la concentración de Doxorrubicina entre las minicélulas administradas a los grupos 3 y 4 (6.6 ng y 8.5 ng, respectivamente) y los grupos 5 y 6 (66 ng y 85 ng). Sin embargo, el tratamiento en G4 fue más eficaz que en G3 y análogamente tratamiento en G6 fue más eficaz que en G5. Esto sugiere que dentro del intervalo de  
15 concentraciones de minicélulas y fármacos analizado en este experimento, el efecto terapéutico se correlacionó con la cantidad de minicélulas en lugar de con la concentración de fármaco transportada dentro de las minicélulas.

## REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende (i) minicélulas intactas de origen bacteriano, que tienen paredes celulares intactas, cargadas con una cantidad terapéuticamente eficaz de un antineoplásico, (ii) un portador farmacéuticamente aceptable para ellas, y (iii) un ligando biespecífico capaz de unirse a un componente de superficie de dichas minicélulas y a un componente de superficie de una célula de mamífero no fagocítica.
2. La composición de la reivindicación 1, en la que dicho antineoplásico se elige del grupo que consiste en Actinomicina-D, Alkeran, Ara-C, Anastrozol, Asparaginasa, BiCNU, Bicalutamida, Bleomicina, Busulfán, Capecitabina, Carboplatino, Carboplatino, Carmustina, CCNU, Clorambucilo, Cisplatino, Cladribina, CPT-11, Ciclofosfamida, Citarabina, Arabinósido De Citosina, Citoxano, Dacarbazina, Dactinomicina, Daunorrubicina, Dexrazoxano, Docetaxel, Doxorubicina, DTIC, Epirubicina, Etilenoimina, Etopósido, Floxuridina, Fludarabina, Fluorouracilo, Flutamida, Fotemustina, Gemcitabina, Herceptin, Hexametilamina, Hidroxiurea, Idarrubicina, Ifosfamida, Irinotecán, Lomustina, Mecloretamina, Melfalán, Mercaptopurina, Metotrexato, Mitomicina, Mitotano, Mitoxantrona, Oxaliplatino, Paclitaxel, Pamidronato, Pentostatina, Plicamicina, Procarbazina, Rituximab, Esteroides, Estreptozocina, STI-571, Estreptozocina, Tamoxifeno, Temozolomida, Tenipósido, Tetrazina, Tioguanina, Tiotepa, Tomudex, Topotecán, Treosulfán, Trimetrexato, Vinblastina, Vincristina, Vindesina, Vinorelbina, VP-16 y Xeloda.
3. La composición de la reivindicación 1, en la que dicho antineoplásico es Doxorubicina o Paclitaxel.
4. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que dicho componente de superficie de una célula de mamífero no fagocítica es un receptor capaz de activar la endocitosis mediada por receptor.
5. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde dicha composición contiene menos de aproximadamente 1 célula bacteriana progenitora contaminante cada  $10^{10}$  minicélulas.
6. La composición de la reivindicación 5, donde dicha composición contiene menos de aproximadamente 1 célula bacteriana progenitora contaminante cada  $10^{11}$  minicélulas.
7. Un método para cargar minicélulas intactas de origen bacteriano que tienen paredes celulares intactas, con una cantidad terapéuticamente eficaz de un antineoplásico, que comprende el paso de crear un gradiente de concentración de dicho fármaco entre un medio extracelular que contiene dichas minicélulas y el citoplasma de las minicélulas, de modo que dicho fármaco se desplace en sentido descendente de dicho gradiente de concentración hacia el citoplasma de las minicélulas.
8. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1, que se puede obtener por el método de la reivindicación 7, donde dicha composición contiene un ligando biespecífico que es capaz de unirse a un componente de superficie de dichas minicélulas y a un componente de superficie de una célula de mamífero no fagocítica.
9. La composición de la reivindicación 8, en la que dicho antineoplásico se elige del grupo que consiste en Actinomicina-D, Alkeran, Ara-C, Anastrozol, Asparaginasa, BiCNU, Bicalutamida, Bleomicina, Busulfán, Capecitabina, Carboplatino, Carboplatino, Carmustina, CCNU, Clorambucilo, Cisplatino, Cladribina, CPT-11, Ciclofosfamida, Citarabina, Arabinósido De Citosina, Citoxano, Dacarbazina, Dactinomicina, Daunorrubicina, Dexrazoxano, Docetaxel, Doxorubicina, DTIC, Epirubicina, Etilenoimina, Etopósido, Floxuridina, Fludarabina, Fluorouracilo, Flutamida, Fotemustina, Gemcitabina, Herceptin, Hexametilamina, Hidroxiurea, Idarrubicina, Ifosfamida, Irinotecán, Lomustina, Mecloretamina, Melfalán, Mercaptopurina, Metotrexato, Mitomicina, Mitotano, Mitoxantrona, Oxaliplatino, Paclitaxel, Pamidronato, Pentostatina, Plicamicina, Procarbazina, 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. La composición de la reivindicación 8, en la que dicho antineoplásico es Doxorubicina o Paclitaxel.
11. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10 para usar *in vitro*.
12. El uso de una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en la preparación de un medicamento destinado el tratamiento de una enfermedad o la modificación de una característica por administración de dicho medicamento a una célula, un tejido o un órgano.
13. El uso de acuerdo con la reivindicación 12, en el que dicha enfermedad es cáncer.
14. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para usar en el tratamiento de una enfermedad o la modificación de una característica por administración de dicho medicamento a una célula, un tejido o un órgano.

15. La composición de acuerdo con la reivindicación 14, donde dicha enfermedad es cáncer.

Figura 1



**Figura 2**

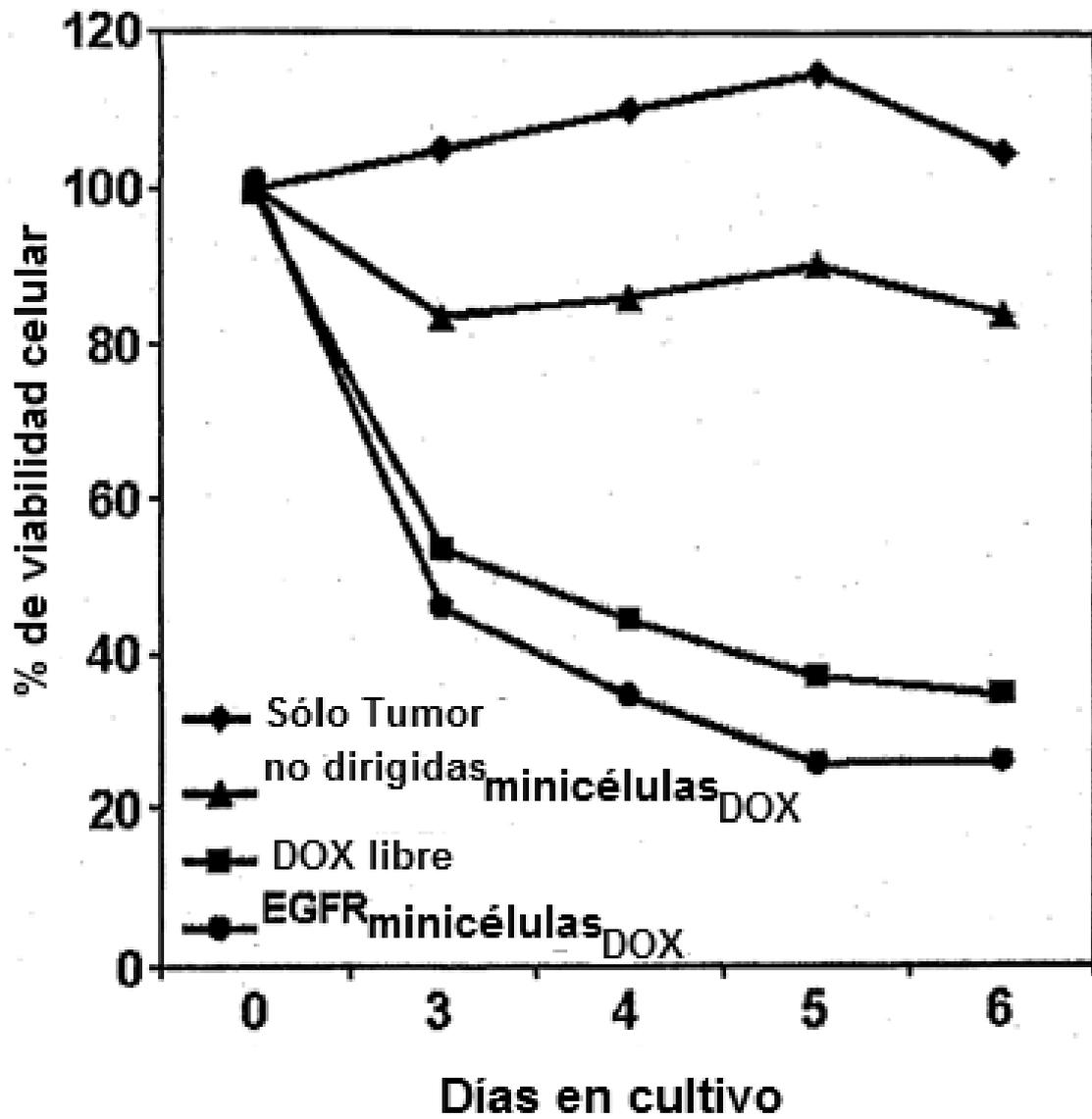


Figura 3

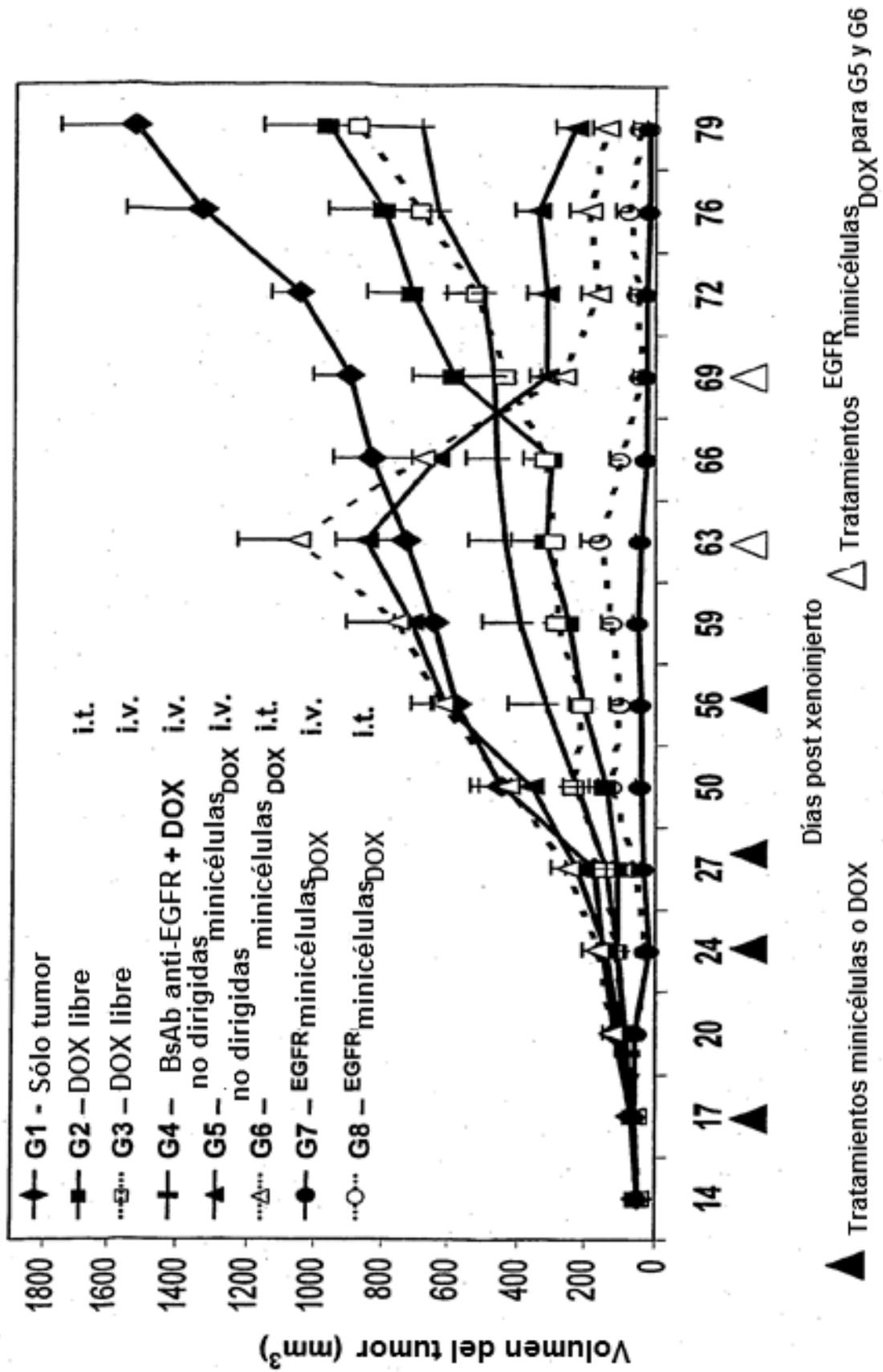


Figura 4

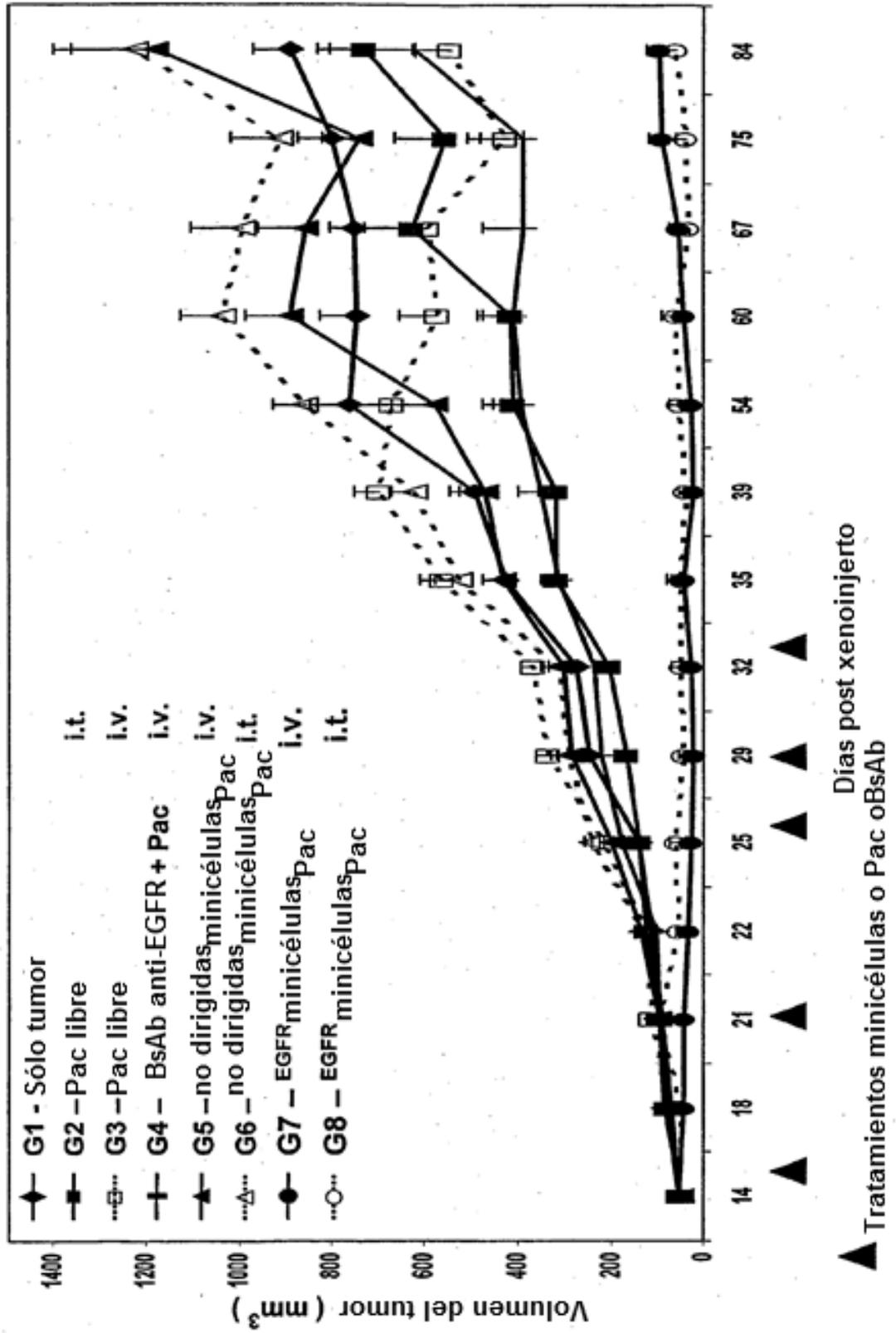


Figura 5

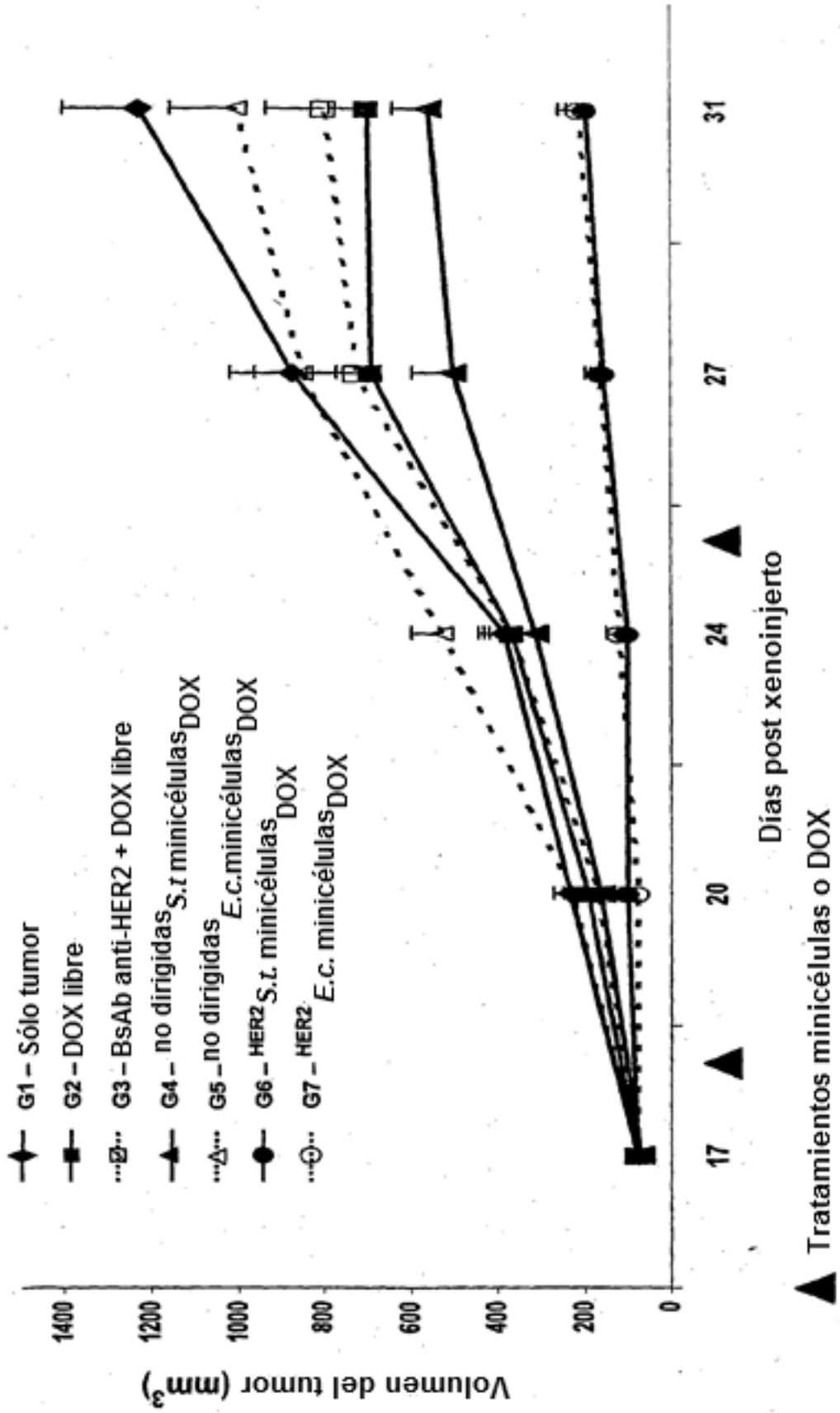


Figura 6

