

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 610 703**

51 Int. Cl.:

A61K 47/48 (2006.01)

C07K 16/12 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.06.2007 E 13191266 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.10.2016 EP 2712618**

54 Título: **Administración dirigida de fármacos, ácidos nucleicos terapéuticos y ácidos nucleicos funcionales a células mamíferas mediante células bacterianas muertas intactas**

30 Prioridad:

23.06.2006 US 815883 P

30.03.2007 US 909078 P

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

03.05.2017

73 Titular/es:

ENGINEIC MOLECULAR DELIVERY PTY LTD.

(100.0%)

Building 2, 25 Sirius Road Lane, Cove West

NSW 2066, AU

72 Inventor/es:

BRAHMBHATT, HIMANSHU y

MACDIARMID, JENNIFER

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 610 703 T3

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

DESCRIPCIÓN

Administración dirigida de fármacos, ácidos nucleicos terapéuticos y ácidos nucleicos funcionales a células mamíferas mediante células bacterianas muertas intactas

Antecedentes de la invención

5 La presente invención se refiere al campo de administración dirigida, mediante células bacterianas muertas intactas, de moléculas bioactivas, incluidos ácidos nucleicos terapéuticos, ácidos nucleicos funcionales, fármacos, péptidos, proteínas, carbohidratos y lípidos, a células hospedantes mamíferas.

Una serie de obstáculos siguen siendo un reto para la administración dirigida de moléculas bioactivas a células mamíferas (p. ej., células cancerosas), particularmente *in vivo*. Esos obstáculos incluyen (a) composición, características funcionales y estabilidad de los vehículos de administración, (b) empaquetado de concentraciones terapéuticamente significativas de moléculas bioactivas, (c) dirigir las células patológicas deseadas *in vivo*, (d) superar una serie de barreras intracelulares y administrar exitosamente concentraciones terapéuticas de moléculas bioactivas a dianas intracelulares, (e) evitar una gama de elementos inmunes del hospedante tales como anticuerpos, complemento y macrófagos que pueden destruir un vector antes de que llegue a una diana, (f) cruzar la barrera endotelial de las paredes de los vasos, particularmente en el sitio de una masa tumoral, (g) migrar a través de varias capas de células para llegar a una diana (p. ej., se sabe que un tumor sólido es una estructura organizada que contiene tanto células tumorales como células normales; en consecuencia un vector debe atravesar varias capas de células normales para acceder a las células malignas), (h) migrar a través de una matriz extracelular (ECM) comprendida por glucoproteínas, glucosaminoglucanos sulfatados, hialuronano, proteoglucanos y colágeno que rellena el espacio entre las células y en consecuencia obstaculiza el transporte de un vector, y (i) abordar la hipertensión intersticial (presión hidrostática elevada fuera de los vasos sanguíneos) en el microentorno del tumor, que puede limitar el acceso de moléculas bioactivas.

Se ha propuesto una serie de distintos vectores para administración de ácidos nucleicos y de fármacos, incluidos vectores víricos, no víricos y no vivos y víricos no vivos. Los vectores no víricos y no vivos se han adaptado para administración de ácidos nucleicos y de fármacos. Los otros dos tipos de vectores se han adaptado para administración de ácidos nucleicos. Los vectores vivos no víricos se están desarrollando principalmente para funciones de inactivación de células tumorales. Si bien todos estos vectores poseen ventajas, también poseen desventajas.

Se han desarrollado vectores víricos, tales como retrovirus, adenovirus, virus adeno-asociados, virus de la varicela, virus de herpes simples y lentivirus, para administración de genes. No obstante, los vectores víricos son incapaces de administrar genes sistémica y específicamente a células tumorales primarias y/o con metástasis sin infectar a los tejidos normales (Akporiaye y Hersh, 1999; Biederer et al., 2002; Green y Seymour, 2002). Además, la capacidad de difusión extremadamente limitada de los viriones dentro de los espacios extracelulares obstaculiza significativamente la diseminación de vectores víricos. Asimismo, los virus son antigénicos, y por lo tanto dan origen a respuestas inmunes del hospedante. Dichas respuestas inmunes incluyen tanto respuestas adaptativas específicas como respuestas innatas no específicas (Chen et al., 2003; Ferrari et al., 2003; Wakimoto et al., 2003). Estas últimas cumplen una función importante en la eliminación de vectores adenovíricos (Liu y Muruve, 2003) y HSV (Wakimoto et al., 2003).

Los vectores no víricos, no vivos se ejemplifican mediante polímeros catiónicos (poliplejos), lípidos catiónicos (liposomas, lipoplejos) y nanopartículas sintéticas (nanoplejos). Son más versátiles que los vectores víricos y ofrecen varias ventajas distintivas debido a que su composición molecular puede ser controlada; dado que la elaboración y el análisis de dichos vectores es bastante simple, pueden alojar una amplia gama de tamaños de transgenes (Kreiss et al., 1999; de Jong et al., 2001) y son menos inmunogénicos (Whitmore et al., 1999, 2001; Dow et al., 1999; Ruiz et al., 2001). La eficiencia de la administración de genes con vectores no víricos, no vivos es significativamente menor, no obstante que con los vectores víricos. Se necesitan por lo menos 10⁶ copias de plásmidos para transfectar una sola célula, con aproximadamente 10²-10⁴ copias realmente conformando el núcleo para expresión transgénica (Feigner y Ringold, 1989; James y Giorgio, 2000; Tachibana et al., 2002). Esta eficiencia es atribuible a la incapacidad de los vectores no víricos, no vivos de superar los enormes desafíos enfrentados entre un sitio de administración y localización en el núcleo de células diana incluidos, (a) la estabilidad físico-química de ADN y su vehículo de administración en el espacio extracelular, (b) captación celular por endocitosis, (c) escape de los compartimientos endosómicos antes de circular hacia los lisosomas y transporte citosólico, y (d) localización nuclear del plásmido para transcripción. Además de estos obstáculos físico-químicos, existen barreras biológicas, tales como respuestas inmunogénicas al vector propiamente dicho y la estimulación inmune por ciertas secuencias de ADN que contienen un motivo CpG central no metilado (Yew et al., 1999; Scheule, 2000; Ruiz et al., 2001).

55 Como una alternativa a vehículos de administración de ácidos nucleicos no vivos/fármacos, también se han desarrollado los vectores bacterianos para terapia dirigida a tumores (Pawalek et al., 2003; Soghomonyan et al., 2005). Estos vectores no portan una carga de ácidos nucleicos o fármacos, pero preferencialmente se acumulan en células tumorales, se replican de forma intracelular y destruyen las células infectadas (Pawalek et al., 1997). Se cree que este fenómeno es facilitado por un sistema bacteriano complejo para introducir las proteínas bacterianas

directamente en las células mamíferas, lo que puede resultar en la inducción de apoptosis (Chen et al., 1996; Monack et al., 1996; Zhou et al., 2000). Actualmente, Bifidobacterium (Yazawa et al., 2000; 2001; Li et al., 2003), Clostridium (Minton et al., 1995; Fox et al., 1996; Lemmon et al., 1997; Theys et al., 2001; Dang et al., 2001; Nuyts et al., 2002a; 2002b; Liu et al., 2002) Salmonella (Pawelek et al., 1997; Low et al., 1999; Platt et al., 2000; Luo et al., 2001; Rosenberg et al., 2002) y Vibrio (Yu et al., 2004) se encuentran bajo investigación como vectores bacterianos vivos selectivos de tumores.

Las bacterias atenuadas vivas también se han explorado como vehículos para administrar ácidos nucleicos (Paglia et al., 2000; Weiss y Chakraborty 2001; Yuhua et al., 2001), que pueden codificar inhibidores angiogénicos (Lee et al., 2005a; 2005b;

Li et al., 2003), enzimas convertidoras de profármacos (King et al., 2002) o citocinas (Yamada et al., 2000). Las desventajas importantes de este enfoque incluyen (a) las bacterias recombinantes vivas gradualmente pierden el ADN plasmídico *in vivo*, principalmente debido a la ausencia de presión de selección y segregación de plásmidos asociada, (b) las bacterias que portan ADN plasmídico tienden a tener un índice de crecimiento inferior y parecen acumularse a niveles inferiores y residir por un periodo de tiempo más corto dentro de los tumores que las bacterias sin plásmidos, (c) los vectores bacterianos gramnegativos vivos pueden causar respuesta de endotoxinas severa en hospedantes mamíferos, posiblemente debido a la diseminación *in vivo* de la endotoxina (lipopolisacárido; LPS), y evocan una respuesta del receptor de tipo toll debido a la invasión celular, (d) la mayoría de las bacterias vivas dirigidas al tumor se acumulan y crecen en los focos necróticos y relativamente hipóxicos dentro de los tumores, pero no en tumores bien oxigenados en el reborde de los nódulos crecientes en donde las células tumorales son normalmente más agresivas, (e) el riesgo asociado con la posible reversión a un fenotipo virulento de estas bacterias es de gran preocupación (Dunham, 2002), y (f) el riesgo de infectar las células normales puede conducir a bacteremia y choque séptico asociado. Esto último puede ser particularmente un problema en pacientes inmunocomprometidos, tales como pacientes con cáncer terminal.

Dado que los problemas siguen obstaculizando el éxito de los agentes terapéuticos contra el cáncer en particular, existe una necesidad urgente de estrategias de administración dirigida que administren selectivamente agentes bioactivos a células tumorales y órganos diana, o que protejan a los tejidos normales de los agentes antineoplásicos administrados. Dichas estrategias deberían mejorar la eficacia del tratamiento, aumentando los índices terapéuticos de los agentes antineoplásicos, y a la vez minimizando los riesgos de la toxicidad relacionada con la terapia.

La presente invención describe un vehículo de administración versátil para mejora de fármacos, estrategias de administración de ácidos nucleicos y ácidos nucleicos funcionales, especialmente, aunque sin limitarse a ello, en el contexto de quimioterapia contra el cáncer.

Compendio de la invención

Para abordar estas y otras necesidades, la presente invención da a conocer, en un aspecto, una composición para uso en el tratamiento de una enfermedad, en donde la composición comprende:

- (a) una pluralidad de células bacterianas muertas intactas, en donde cada célula bacteriana muerta de dicha pluralidad posee una pared celular intacta y/o una membrana celular, que contiene material genético que es endógeno a las especies bacterianas y que comprende (i) un ácido nucleico terapéutico que codifica un producto, tal como un péptido, polipéptido o proteína, en donde dicha producción se desea en una célula diana, (ii) un fármaco que es una sustancia fisiológicamente o farmacéuticamente activa que produce un efecto local o sistémico deseado en mamíferos y seres humanos o (iii) una molécula de ácido nucleico funcional que, tras la introducción en una célula hospedante, interfiere específicamente con la expresión de una proteína,
- (b) un vehículo farmacéuticamente aceptable para ello, y
- (c) un ligando biespecífico unido a cada célula bacteriana muerta intacta.

Como se indica, las células bacterianas muertas contienen un ácido nucleico terapéutico, un fármaco o un ácido nucleico funcional. Con respecto a esto último, en una realización el ácido nucleico funcional está libre de plásmido. En este sentido, los ácidos nucleicos funcionales se empaquetan directamente en las células bacterianas muertas atravesando la membrana intacta de las células bacterianas, sin usar constructos de expresión basados en plásmidos, ni la maquinaria de expresión de una célula hospedante. Dichos ácidos nucleicos funcionales libres de plásmidos se ejemplifican mediante ADN o ARN mono, bi o multicatenario. En una realización, las células bacterianas muertas contienen ácido nucleico funcional libre de plásmido que es ARN regulador. En una realización preferida, la composición está esencialmente libre de endotoxina. Se describen también ligandos biespecíficos útiles para dirigir células bacterianas muertas hacia células hospedantes mamíferas. 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 una primera rama que porta especificidad hacia una estructura superficial bacteriana y una segunda rama que porta especificidad hacia una estructura superficial de células mamíferas. Asimismo, la primera rama y la segunda rama del ligando biespecífico pueden ser mono-específicas o multivalentes.

Una estructura superficial bacteriana deseable para la unión al ligando es un componente O-polisacárido de un lipopolisacárido (LPS). Las estructuras superficiales de las células mamíferas deseables para unión al ligando son receptores, preferiblemente aquellos capaces de activar la endocitosis mediada por el receptor.

5 De acuerdo con otro aspecto, se describe un método de administración, que comprende poner una pluralidad de células bacterianas muertas en contacto con células mamíferas que son fagocitosis o endocitosis-competentes, de modo tal que las células bacterianas muertas son fagocitadas por las células mamíferas y liberan su intracelularidad de carga. La carga puede comprender un ácido nucleico terapéutico, un ácido nucleico funcional o un fármaco.

10 En una realización descrita en este documento, un método para administrar un ácido nucleico funcional comprende (a) proveer una pluralidad de células bacterianas muertas en un vehículo farmacéutico, en donde cada célula bacteriana muerta de la pluralidad comprende (i) un ácido nucleico funcional o (ii) un plásmido compuesto por un segmento que codifica un ácido nucleico funcional y luego (b) poner en contacto dichas células bacterianas muertas de la pluralidad con células mamíferas diana, de modo tal que dichas células mamíferas fagociten a dicha célula bacteriana muerta, mediante lo cual dicho ácido nucleico funcional es liberado al citoplasma de la célula diana. En un aspecto, las células bacterianas muertas están libres de plásmidos, mientras que en otro, el ácido nucleico funcional es ARN regulador.

15 De acuerdo con otro aspecto, se describe un método de administración dirigida que comprende poner en contacto ligandos biespecíficos con (i) células bacterianas muertas intactas que contienen una carga deseada y (ii) células mamíferas, preferiblemente células mamíferas no fagocíticas. Los ligandos biespecíficos tienen especificidad hacia un componente superficial en las células bacterianas muertas intactas y un componente superficial en las células mamíferas, tal como un receptor. En consecuencia, los ligandos causan que la célula bacteriana muerta se una a las células mamíferas, que las células bacterianas muertas sean fagocitadas por las células mamíferas y que la carga contenida en las células bacterianas muertas sea liberada en el citoplasma de la célula mamífera.

La carga puede comprender un ácido nucleico terapéutico, un ácido nucleico funcional o un fármaco.

25 Incluso en otro aspecto, se describe un método para superar la resistencia a los fármacos o la resistencia a apoptosis y tratar un tumor maligno en un sujeto, administrando un ácido nucleico funcional a una célula diana. El método comprende poner en contacto una célula bacteriana muerta que contiene (i) una molécula de ácido nucleico funcional o (ii) un plásmido comprendido por un segmento que codifica una molécula de ácido nucleico funcional con una célula mamífera diana. La célula mamífera fagocita a la célula bacteriana muerta. El ácido nucleico funcional es liberado en el citoplasma, transportado al núcleo y expresado por la célula diana.

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

También se describen métodos para cargar células bacterianas muertas con un fármaco. Dicho método implica crear un gradiente de concentración del fármaco entre un medio extracelular que contiene las células bacterianas muertas y el citoplasma de las células bacterianas. El fármaco naturalmente reduce este gradiente de concentración, hacia el citoplasma de la célula bacteriana muerta. La fuga del fármaco del citoplasma bacteriano se previene debido a que las células bacterianas son metabólicamente inactivas.

35 Otro método para cargar células bacterianas muertas con un fármaco implica cultivar una célula bacteriana bajo condiciones tales que la célula bacteriana transcribe y traduce un ácido nucleico terapéutico que codifica el fármaco, de modo tal que el fármaco sea liberado en el citoplasma de la célula bacteriana, y luego inactivar la célula bacteriana para formar una o más células bacterianas muertas que contienen el fármaco en su citoplasma.

40 De acuerdo con otro aspecto, la presente memoria contempla un método para formular una célula bacteriana muerta con un ácido nucleico funcional libre de plásmido. El método comprende co-incubar una pluralidad de células bacterianas muertas con un ácido nucleico funcional, tal como ARN regulador como siRNA, miRNA o shRNA, en un tampón. En algunas realizaciones, la co-incubación puede implicar agitación moderada mientras que en otras la co-incubación es estática. En algunos aspectos, la co-incubación dura aproximadamente media hora, mientras que en otros, dura aproximadamente una hora. En una realización, el tampón comprende disolución salina tamponada, por ejemplo, una disolución de tampón de fosfato 1X. En otra realización, la co-incubación se lleva a cabo a una temperatura de aproximadamente 4°C a aproximadamente 37°C, aproximadamente 20°C a aproximadamente 30°C, aproximadamente 25°C o aproximadamente 37°C. La co-incubación puede comprender aproximadamente 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} , 10^{12} o 10^{13} células bacterianas muertas.

45 La presente memoria contempla el uso de células bacterianas muertas intactas y ligandos biespecíficos en la preparación de un medicamento, para uso en un método para tratar una enfermedad o modificar un rasgo por administración del medicamento a una célula, tejido u órgano. En el medicamento, las células bacterianas muertas contienen una molécula de ácido nucleico terapéutica, un fármaco o una molécula de ácido nucleico funcional, y, opcionalmente, ligandos biespecíficos que son capaces de unirse a las células bacterianas muertas y dirigir células mamíferas no fagocíticas. Dichos medicamentos son útiles para tratar diversas afecciones y enfermedades aumentando la expresión o función de una proteína deseada, o inhibiendo la expresión o función de una proteína diana. Ilustrativos de dichas afecciones y enfermedades son, un cáncer y una enfermedad adquirida, tal como sida,

neumonía, enfisema y tuberculosis. Alternativamente, el tratamiento puede afectar un rasgo, tal como la fertilidad, o una respuesta inmune asociada con un alérgeno o un agente infeccioso.

5 Se describe también un método farmacéuticamente aceptable para purificar células bacterianas muertas intactas. El método combina (i) inactivar células bacterianas vivas con antibióticos, (ii) filtración de flujo cruzado y/o filtración en línea (*dead-end*), para eliminar sedimentos celulares libres de endotoxinas, ácidos nucleicos libres, ampollas de la membrana bacteriana, contaminante del medio y (iii) secuestro basada en anticuerpos, para eliminar la endotoxina libre residual.

Breve descripción de los dibujos

10 La Figura 1 muestra efectos antitumorales altamente significativos mediante células bacterianas muertas intactas empaquetadas con fármacos quimioterapéuticos dirigidos a anticuerpos biespecíficos. El xenoinjerto de cáncer de mama humano (MDA-MB-468) se estableció subcutáneamente (entre los omóplatos) en ratones Balb/c nu/nu y cuando se alcanzaron volúmenes del tumor de ~70 mm³, los ratones se trataron (n= 11 ratones por grupo) por vía intravenosa (i.v.) con doxorubicina libre (G2) o células *S. Typhimurium* muertas intactas no dirigidas empaquetadas con dox (G3), o con células bacterianas *S. Typhimurium* muertas intactas dirigidas por EGFR empaquetadas con dox (G4). Los ratones G1 eran controles y recibieron disolución fisiológica estéril (i.v.). Los tratamientos se administraron en los días marcados por un triángulo en el eje x y se midió el volumen del tumor como se muestra en el eje y. El resultado demostró un efecto antitumoral altamente significativo cuando se usó *S. typhimurium*_{dox} muerta con ^{EGFR} (G4) como un tratamiento, mientras que los ratones G2 y G3 no demostraron efectos antitumorales. Se expone la desviación estándar para cada medición.

20 La Figura 2 muestra gráficamente que las células bacterianas muertas intactas empaquetadas con paclitaxel o siRNA inhiben el crecimiento de tumores de células de cáncer de colon humano (HCT116) *in vivo*.

25 La Figura 3 muestra la reversión de la resistencia a los fármacos en ratones que portan xenoinjertos de cáncer de colon humano (Caco-2), usando un protocolo de tratamiento dual, en donde el primer tratamiento comprende *S. typhimurium* muerta empaquetada con EGFR que porta anti-MDR-1 shRNA y el segundo tratamiento comprende *S. typhimurium* empaquetada con EGFR muerta que porta o bien Irinotecán o 5-fluorouracil (5-FU). El primer tratamiento y el segundo tratamiento se exponen con un triángulo y una flecha, respectivamente, debajo del eje x.

Descripción detallada

30 Los presentes inventores han determinado que las células bacterianas intactas son vehículos eficaces para la administración dirigida de ácidos nucleicos terapéuticos, ácidos nucleicos funcionales y fármacos a las células enfermas, particularmente células cancerosas, tanto *in vitro* como *in vivo*. Una serie de descubrimientos sorprendentes fundamentan esa determinación.

35 Por ejemplo, los inventores descubrieron que cuando las composiciones comprenden (a) células bacterianas muertas intactas que contienen una carga de ácido nucleico terapéutico, fármaco o ácido nucleico funcional (b) ligandos de direccionamiento biespecíficos, y (c) un vehículo farmacéuticamente aceptable en contacto con células enfermas *in vitro* o *in vivo*, los vehículos celulares bacterianos inactivados intactos se someten a endocitosis con gran eficiencia en las células mamíferas no fagocíticas diana. Este descubrimiento fue sorprendente porque si bien los ligandos biespecíficos se han usado para dirigir vehículos de administración víricos y no víricos a células mamíferas no fagocíticas (Wickham et al., 1996; Nettelbeck et al, 2001; Boucher et al, 2003; Ogris & Wagner, 2002), se cree que la endocitosis mediada por el receptor no funcionaría para partículas tan grandes como las células bacterianas.

40 Por ejemplo, los vectores adenovíricos han sido redirigidos a los receptores de la superficie celular mamífera diana, tales como endoglina en células endoteliales, e internalizados mediante vesículas recubiertas de clatrina en la membrana plasmática de las células mamíferas. Wickham et al., 1996; Nettelbeck et al, 2001; Boucher et al, 2003. Las vesículas recubiertas de clatrina se asemejan a una taza que fagocita el vector, pero se entiende que el tamaño de la taza tiene un factor limitativo. Las vesículas recubiertas de clatrina tienen un tamaño limitado de 85-110 nm, debido al tamaño del recubrimiento de clatrina. Swanson y Watts, 1995. Las células bacterianas, en contraste, tienen por lo menos 400 nm de diámetro y 1.000 nm de largo. En consecuencia, no se esperaba que dicho planteamiento de direccionamiento funcionara en células bacterianas muertas.

50 El conocimiento con respecto a otros grandes vectores respaldó la expectativa de que las células bacterianas muertas no serían internalizadas a través de vesículas recubiertas de clatrina. Por ejemplo, grandes lipoplejos (vectores no víricos de hasta 500 nm) preferencialmente ingresarían en las células mediante endocitosis independiente de receptores y de clatrina, mientras que los lipoplejos más pequeños (menos de 200 nm) se pueden internalizar mediante un procedimiento dependiente de clatrina no específico. Simoes et al, 1999. Asimismo, grandes virus, tales como el virus de la variolovacuna, en el orden de 350 nm x 250 nm de tamaño, no infectan las células mamíferas mediante una ruta recubierta con clatrina. Essani y Dales, 1979.

De modo similar, las células mamíferas no fagocíticas no pueden fagocitar grandes patógenos, como las células bacterianas. Solamente los fagocitos profesionales como los macrófagos fagocitan a dichos patógenos, y el proceso

de fagocitosis es independiente de clatrina y de receptores, lográndose mediante fagocitosis. La interacción de grandes patógenos con la superficie celular induce una cascada de señalización, que conduce a reordenamientos de actina en la membrana plasmática para formar una gran taza fagocítica, que fagocita a la bacteria. Dramsi y Cossart, 1998. Las cascadas de señalización que son responsables, en la entrada bacteriana, para reordenamientos que se activa en la membrana plasmática, no se entienden bien. Galan, 1996; Menard et al., 1996; Finlay y Cossart, 1997; Dramsi y Cossart, 1998.

Las investigaciones específicas del efecto del tamaño de partícula sobre la endocitosis mediada por receptores demuestran que el proceso es fuertemente dependiente del tamaño. Por ejemplo, Aoyama et al., 2003, estudiaron el efecto del tamaño de partícula sobre la administración de genes glucovíricos y concluyeron que el tamaño de partícula óptimo para la endocitosis mediada por receptores es ~25 nm. Véanse también Nakai et al, 2003; Osaki et al., 2004. Gao et al., 2005, confirmaron esa conclusión.

Asimismo, aunque se describe que los ligandos específicos se han usado para redirigir vectores víricos, el método no siempre ha sido exitoso en el contexto de la administración de genes. En el intento de redirigir virus de sus receptores naturales a receptores alternativos, se ha demostrado que la unión a la superficie celular es insuficiente para el ingreso vírico sostenido y la expresión génica. Además, cuando se modificaron las proteínas de fagocitación del virus para redireccionamiento, exhibieron baja actividad de fusión, que resultó en la entrada vírica ineficiente en las células. Zhao et al., 1999. En ausencia de estrategias de direccionamiento específico, las estrategias han dependido de la inyección directa a un sitio localizado. Akporiaye y Hersh, 1999.

Por lo tanto, la técnica sugirió que los ligando biespecíficos no permitirían que los vehículos celulares bacterianos inactivados ingresaran en células mamíferas no fagocíticas. Para respaldar incluso más este punto, los inventores descubrieron que las células bacterianas muertas no dirigidas son incapaces de adherirse específicamente y administrar una carga a células mamíferas no fagocíticas, incluso después de repetidos intentos con periodos de incubación prolongada en un número de líneas de células mamíferas. En particular, las células bacterianas muertas no dirigidas no son internalizadas por las células mamíferas no fagocíticas. En contraste, las células bacterianas muertas son fácilmente fagocitadas por fagocitos profesionales como los macrófagos. Esto corrobora los hallazgos precoces de que las micropartículas hasta 12 µm son fagocitadas por fagocitos profesionales (Kanke et al., 1983) y de que la absorción máxima de micropartículas en macrófagos ocurre con partículas de < 2 µm (Tabata y Ikada, 1988; 1990). A diferencia de los vectores víricos que se adhieren especialmente a los receptores víricos y desencadenan su internalización, por lo tanto, las células bacterianas muertas no tienen mecanismo similar de invadir células mamíferas no fagocíticas ingresantes.

En contra de estos antecedentes, los inventores también descubrieron que los ligandos biespecíficos pueden dirigir la endocitosis de células bacterianas muertas intactas dentro de células mamíferas no fagocíticas. Los datos preliminares sugieren que la internalización de células bacterianas puede ocurrir mediante la ruta dependiente de los receptores y de la macropinocitosis, aunque los solicitantes no están influenciados por dicha teoría.

Los inventores descubrieron también que después de la endocitosis, las bacterias muertas se degradan completamente en vacuolas intracelulares, presumiblemente compartimientos endo-lisosómicos. Esto fue sorprendente porque se creía que los mecanismos de degradación rigurosos que son capaces de degradar grandes partículas biológicas como las células bacterianas y parasitarias operaban solamente en fagocitos profesionales, como los macrófagos. Se creía que esos mecanismos permitían el procesamiento y la presentación completa de antígenos por fagocitos profesionales. Dado que la mayoría de las células no fagocíticas no procesan ni presentan antígenos, se creía que contenían solamente sistemas de procesamiento de antígenos leves que se utilizaban principalmente para reciclar componentes celulares.

Después de ser internalizados por endocitosis mediada por receptores, los vectores son cercados por membranas endosómicas o lisosómicas, y por lo tanto se separan del citoplasma. Esto constituye un impedimento importante para la administración de carga, especialmente debido a que los compartimientos endosómicos y lisosómicos pueden volverse altamente cáusticos y degradar más de 99% de una carga, tal como los ácidos nucleicos en un vector. Los vectores de administración génica exitosos tienen mecanismos que permiten que los ácidos nucleicos ingresen en el citoplasma, pero los expertos no esperarían que las minicélulas tuvieran dichos mecanismos.

Los virus, por ejemplo, han desarrollado procesos sofisticados para ingresar en el citoplasma de las células mamíferas. Los retrovirus fagocitados, tales como VIH-1, adquieren acceso al citoplasma por fusión directa con la membrana plasmática. Stein et al., 1987. Los virus no fagocitados utilizan diversas estrategias para penetran en la membrana endosómica después de la endocitosis. Por ejemplo, los virus de la gripe incluyen la fusión de las membranas endosómicas y víricas, que es desencadenada por el entorno ácido del endosoma. Marsh y Helenius, 1989. A pH bajo, la glucoproteína hemaglutinina (HA) de la fagocitación del virus de la gripe predominante se somete a cambios de conformación, conduciendo a la prominencia de un pico hidrófobo hacia la membrana endosómica que inicia la fusión de la membrana. Bullough et al., 1994. Se cree que los adenovirus escapan hacia el citosol mediante un mecanismo ligado a la acidificación del endosoma. El pH bajo tiene varios efectos sobre la cápsida adenovírica. Por ejemplo, la proteína penton de la cápsida se somete a cambios de conformación que exponen las regiones hidrófobas para interacción de las membranas endosómicas. Seth et al., 1985. Además, la

actividad de proteasa intrínseca de la cápsida adenovírica también parece contribuir al escape endosómico. Greber et al., 1996.

Para vectores liposómicos, la barrera de la membrana endosómica sigue limitando la eficiencia de la administración del gen. Se entiende que la liberación exitosa de ácidos nucleicos liposómicos resulta de la ruptura de la membrana del endo-lisosoma. Xu & Szoka, 1996; El Ouahabi et al., 1997; Zelphati & Szoka, 1996a; Wattiaux et al, 2000. Se cree que la ruptura de la membrana endo-lisosómica ocurre mediante un movimiento transbicapa flip-flop de lípidos, lo que lleva a la desestabilización y penetración de la membrana de ADN desnudo en el citoplasma. Zelphati y Szoka, 1996a; 1996b; Mui et al., 2000. Los estudios también han demostrado que la liberación citoplásmica de contenidos liposómicos implica (a) neutralización de la carga de un agente catiónico de formación de complejo con macromoléculas aniónicas tales como lípidos aniónicos y proteoglicanos, (b) la fusión mediada por lípidos catiónicos, y (c) la desestabilización de la membrana por lípidos sensibles al pH. Wrobel & Collins, 1995; Meyer et al., 1997; Clark & Hersh, 1999. Estudios adicionales han demostrado que una mezcla de lípido neutro (DOPE) con lípido catiónico facilita la ruptura e incrementa la cantidad de contenidos liposómicos en el citoplasma, ya que DOPE promueve la fusión de partículas de liposomas con membranas endosómicas. Farhood et al., 1995; Fasbender et al., 1997; Hafez et al., 2001. Además, se han utilizado los dendrímeros catiónicos de PEI y poliamina para facilitar la ruptura de la membrana endolisosómica, ya que tienen una amplia capacidad como tampones que provocan la expansión y ruptura de los endosomas. Klemm, 1998; Sonawane et al., 2003. Se puede incorporar una funcionalidad adicional a los vectores de liposomas en la forma de una proteína formadora de poros endosomolíticos de monocitogenes de *Listeria*, listeriolisina O (LLO). Lorenzi y Lee, 2005. LLO es capaz de romper la membrana endosómica, permitiendo así el escape de contenidos endosómicos en el citoplasma. Lee et al., 1996.

Por lo tanto, las descripciones actuales sugieren que los mecanismos sofisticados son necesarios para permitir que cierta carga del vector escape de la membrana lisosómica. La célula bacteriana muerta es una partícula no viva y no porta ninguna función desestabilizante de la membrana lisosómica. Los inventores descubrieron que si las células bacterianas muertas portan por lo menos 70 a 100 copias de ADN plasmídico, entonces parte de este ADN puede escapar de la membrana endosómica sin la necesidad de desestabilizar ni romper la membrana endosómica. Esto sugiere que si bien la mayor parte del ADN plasmídico es propenso a degradarse en las vacuolas endo-lisosómicas, fue posible sobrepasar el sistema y permitir así que parte del ADN escape intacto al citoplasma de células mamíferas. Además, los inventores descubrieron que si bien no se cree que las células mamíferas no fagocíticas posean mecanismos de procesamiento lisosómico rigurosos que podrían degradar estructuras de múltiples componentes complejas como las células bacterianas, esto puede no ser cierto. La perspectiva actual específica que la degradación intracelular de dichas estructuras complejas como las células bacterianas está limitada a las células fagocíticas profesionales que son capaces de procesamiento y presentación de antígenos completa.

En un aspecto relacionado, los inventores descubrieron que una concentración importante de fármaco bioactivo portado por células bacterianas muertas empaquetadas con fármaco y dirigidas a un ligando biespecífico también escapa de la membrana endo-lisosómica e ingresa en el citoplasma de la célula mamífera. Adicionalmente, descubrieron que las células bacterianas muertas son altamente versátiles en su capacidad de empaquetar una diversidad de fármacos distintos (p. ej., fármacos hidrófilos, hidrófobos y anfipáticos tales como doxorubicina, paclitaxel, cisplatino, carboplatino, 5- fluorouracil e irinotecán) y han descubierto que todos se empaquetan fácilmente en células bacterianas muertas en concentraciones terapéuticamente significativas.

Los inventores descubrieron también que cuando las células bacterianas muertas empaquetadas en un fármaco y dirigidas a anticuerpos (para simplicidad, también denominadas "terapéuticas") se administraron por vía intravenosa a ratones atímicos que portaban xenoinjertos de tumor humano, se extravasaron de las paredes de los vasos sanguíneos que rodeaban la masa tumoral e ingresaron en el microentorno del tumor.

El direccionamiento de sistemas basados en partículas en el contexto de terapia del cáncer ha explotado la vasculatura del tumor con fugas (Jain, 1998) y la carencia de un drenaje linfático eficaz (Maeda y Matsumura, 1989; Seymour, 1992; Yuan et al., 1994), que resulta en un mejor efecto de permeabilidad y retención (EPR) (Maeda, 2001) de las partículas circulantes (direccionamiento pasivo). Los vasos de tumores tienen un diámetro irregular, un patrón de ramificación anormal, y no encajan bien en la clasificación usual de arteriolas, capilares o vénulas. Warren, 1979; Less et al., 1991, 1997; Konerding et al., 1995. De particular importancia funcional, los vasos de tumores tienen fugas inusuales. Peterson y Appelgren, 1977; Gerlowski y Jain, 1986; Jain, 1987, 1997; Dvorak et al., 1988. La hiperpermeabilidad de los microvasos de tumores a las grandes moléculas se ha observado en numerosos estudios. Gerlowski y Jain, 1986; Jain, 1987; Jain 1996. No obstante, el límite de tamaño superior para agentes que pueden atravesar los vasos de distintos tumores y cómo se regula no se entiende bien. Un estudio midió el tamaño umbral del poro de un carcinoma de colon humano desarrollado subcutáneamente en ratones inmunodeficientes entre 400-600 nm. Yuan et al., 1995. Otros informaron que algunos tumores poseen un tamaño umbral del poro de solamente 100 nm. Hobbs et al, (1998). Por consiguiente, fue sorprendente hallar que las células bacterianas muertas intactas de más de 1.000 μm son capaces de extravasar la pared celular endotelial que rodeaba a los tumores. Este descubrimiento permite el uso de células bacterianas muertas intactas para terapia de tumores *in vivo*.

Adicionalmente, se sugirió que el microentorno del tumor anormal se caracteriza por hipertensión intersticial (presión hidrostática elevada fuera de los vasos sanguíneos; Less et al, 1992; Jain, 2001) que limita el acceso de agentes terapéuticos antineoplásicos. Por ejemplo, se informó que cuando se estudiaron tumores de cáncer de mama (MDA-

MD-231) consolidados en forma ortotópica en ratones SCID después de una inyección intravenosa de agente de contraste Gadolinio dietilenoetriammina-penta-acetato, hubo una reducción en el ingreso del agente de contraste al tumor. Dadiani et al., 2004. Los autores de ese informe especularon que el incremento observado en la hipertensión intersticial sugiere que la alta presión intersticial fuerza el fluido a reingresar en los vasos sanguíneos, incrementando así la relación de flujo saliente a flujo entrante. Cabe destacar que los inventores descubrieron que las células bacterianas muertas no son obstaculizadas por dicha hipertensión intersticial, pero son capaces de lograr efectos antitumorales altamente significativos (Fig. 1).

La siguiente descripción señala la invención asociada con estos descubrimientos, sin limitar la descripción de las realizaciones particulares, la metodología, los protocolos o reactivos descritos. Asimismo, la terminología utilizada en este documento describe realizaciones particulares solamente, y no limita el alcance de la invención. A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos utilizados en esta descripción tienen el mismo significado que utilizan comúnmente los expertos en la técnica relevante. Además, las formas en singular “un” “una” y “el” “la” incluyen la referencia al plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

La invención se define en las reivindicaciones.

15 Composiciones que comprenden células bacterianas muertas intactas

En un aspecto, se describe una composición que comprende células bacterianas muertas intactas y un vehículo farmacéuticamente aceptable para ello. Las células bacterianas muertas pueden contener un ácido nucleico terapéutico, un fármaco, una molécula de ácido nucleico funcional o una combinación de estos.

Células bacterianas muertas intactas

20 Las células bacterianas muertas son células procariotas no vivas de bacterias, cianobacterias, eubacterias y arqueobacterias, como se define en la segunda edición del Manual Systematic Biology de Bergey. Dichas células se consideran “intactas” si poseen una pared celular y/o una membrana celular intacta y contienen material genético (ácido nucleico) que es endógeno a las especies bacterianas.

Ácidos nucleicos terapéuticos y productos de expresión terapéuticos

25 Una molécula de ácido nucleico terapéutico codifica un producto, tal como un péptido, polipéptido o proteína, cuya producción se desea en una célula diana. Por ejemplo, el material genético de interés puede codificar una hormona, receptor, enzima o (poli) péptido de valor terapéutico. Dichos métodos pueden resultar en la expresión pasajera de ADN transferido no integrado, replicación extracromosómica y expresión de replicones transferidos tales como episomas, o integración de material genético al ADN genómico de las células hospedantes.

30 La frase “moléculas de ácido nucleico” y el término “polinucleótidos” denotan formas poliméricas de nucleótidos de cualquier longitud, o bien ribonucleótidos o desoxinucleótidos. Incluyen ADN o ARN mono, bi o multicatenario, ADN genómico, ADNc, híbridos de ADN-ARN o un polímero que comprende bases de purina y pirimidina u otras bases de nucleótidos naturales, química o bioquímicamente modificadas, no naturales o derivadas. El esqueleto de un polinucleótido puede comprender azúcares y grupos fosfato, como es típico para ARN y ADN, o azúcar modificado o sustituido o grupos fosfato. Alternativamente, el esqueleto del polinucleótido puede comprender un polímero de subunidades sintéticas tales como fosforamiditas y por lo tanto puede ser un oligodesoxinucleósido fosforamidato o un oligómero de fosforamidato-fosforodiéster mixto. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y análogos de nucleótidos, uracilo, otros azúcares y grupos de unión tales como fluororribosa y tioato, y ramificaciones de nucleótidos. Un polinucleótido puede además ser modificado, tal como por conjugación con un componente de etiquetado. Otros tipos de modificaciones pueden incluir topes, sustitución de uno o más de los nucleótidos naturales con un análogo, y la introducción de medios para conectar el polinucleótido con proteínas, iones metálicos, componentes de etiquetado, otros polinucleótidos o un soporte sólido.

35 “Polipéptido” y “proteína” se utilizan de manera intercambiable en este documento para hacer referencia a una forma polimérica de aminoácidos de cualquier longitud, que puede incluir aminoácidos traducidos, no traducidos, químicamente modificados, bioquímicamente modificados y derivados. Un polipéptido o proteína puede ocurrir en forma natural, recombinante o sintética, o en cualquiera de sus combinaciones. Asimismo, un polipéptido o proteína puede comprender un fragmento de una proteína o péptido natural. Un polipéptido o proteína puede ser una molécula sencilla o puede ser un complejo multi-molecular. Además, dichos polipéptidos o proteínas pueden tener esqueletos de péptidos modificados. Los términos incluyen proteínas de fusión, incluidas proteínas de fusión con una secuencia de aminoácidos heteróloga, fusiones con secuencias líderes heterólogas y homólogas, con o sin residuos metionina N-terminales, proteínas marcadas inmunológicamente y similares.

45 El término “expresión” en general se refiere al proceso mediante el cual una secuencia de polinucleótidos se somete a transcripción y traducción exitosas de modo tal que se expresan niveles detectables de la secuencia de aminoácidos o proteína. En determinados contextos de este documento, expresión se refiere a la producción de ARNm. En otros contextos, expresión se refiere a la producción de proteína.

La transcripción o traducción de una molécula de ácido nucleico terapéutico puede ser útil para tratar el cáncer o una enfermedad adquirida, tal como sida, neumonía, enfisema, o para corregir errores congénitos del metabolismo, tales como fibrosis quística. La transcripción o traducción de un ácido nucleico terapéutico puede también afectar la esterilización anticonceptiva, incluida la esterilización anticonceptiva de animales salvajes. Los trastornos inflamatorios mediados por alérgenos y mediados por agentes infecciosos también pueden contrarrestarse administrando, mediante la presente invención, una molécula de ácido nucleico terapéutica que, tras la expresión en un paciente, afecta la respuesta(s) inmune asociada con el alérgeno y el agente infeccioso, respectivamente. Una molécula de ácido nucleico terapéutica también puede tener un producto de expresión, o puede haber un producto de etapa posterior de modificación post-traducción del producto de expresión, que reduce las secuelas inmunológicas relacionadas con el trasplante o que ayuda a facilitar el crecimiento y la regeneración del tejido.

Los términos “cáncer”, “neoplasia,” “tumor”, “malignidad” y “carcinoma”, utilizados en forma intercambiable en este documento, hacen referencia a células o tejidos que exhiben un fenotipo de crecimiento aberrante caracterizado por una pérdida significativa de control de la proliferación celular. Los métodos y composiciones descritos por la invención se aplican particularmente a células pre-cancerosas, malignas, pre-metastásicas y no metastásicas.

Una molécula de ácido nucleico terapéutica puede ser la contraparte normal de un gen que expresa una proteína que funciona de modo anormal o que está presente en niveles anormales en una patología, como es el caso, por ejemplo, con el regulador de conductancia transmembrana en la fibrosis quística (Kerem et al., 1989; Riordan et al., 1989; Rommens et al., 1989), con β -globina en anemia de células falciformes, y con cualquier α -globina, 13-globina y γ -globina en talasemia. Por lo tanto, una producción excesiva de α -globina frente a β -globina que caracteriza a la β -talasemia se puede mejorar con genoterapia, de acuerdo con la presente invención, usando una célula bacteriana muerta intacta modificada para contener un plásmido que incorpora una secuencia que tiene una transcripción de ARN antisentido vis-à-vis una secuencia diana del ARNm de α -globina.

En el tratamiento del cáncer, una molécula de ácido nucleico terapéutica adecuada para uso de acuerdo con la presente invención podría tener una secuencia que corresponde a o deriva de un gen asociado con supresión de tumores, tal como el gen p53, el gen de retinoblastoma y el gen que codifica el factor de necrosis tumoral. Una amplia variedad de tumores sólidos -- cáncer, papilomas y verrugas -- deberían ser tratables con este planteamiento, 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 de los plexos coroides y papiloma laríngeo. Los ejemplos de verrugas son verrugas genitales, verrugas plantares, epidermodisplasia verruciforme y verrugas malignas.

Una molécula de ácido nucleico terapéutica para uso en la presente invención también puede comprender un segmento de ADN que codifica una enzima que convierte un profármaco inactivo en uno o más metabolitos citotóxicos de modo que tras la introducción *in vivo* del profármaco, la célula diana no es forzada, tal vez con células aledañas, a suicidarse. Las aplicaciones preclínicas y clínicas de dicho “gen suicida”, que pueden ser de origen no humano o de origen humano, son analizadas por Spencer (2000), Shangara et al. (2000) y Yazawa et al. (2002). Son ilustrativos de genes suicidas aquellos que codifican HSV-timidina cinasa (tk), citosina desaminasa (CDA) + uracil fosforribosil-transferasa, xantina-guanina fosforribosil-transferasa (GPT), nitrorreductasa (NTR), purina nucleósido fosforilasa (PNP, DeoD), citocromo P450 (CYP4B1), carboxipeptidasa G2 (CPG2) y D-aminoácido oxidasa (DAAO), respectivamente. Los genes suicidas de origen humano se ejemplifican mediante genes que codifican carboxipeptidasa A1 (CPA), desoxicitidina cinasa (dCK), citocromo P450 (CYP2B1,6), LNGFR/FKBP/Fas, FKBP/Caspasas y ER/p53, respectivamente.

Una terapia de genes suicidas podría aplicarse al tratamiento del sida. Esta estrategia ha sido ensayada con vectores suicidas que expresan un producto génico tóxico ni bien las células mamíferas tratadas se infectan con VIH-1. Estos vectores usan los elementos reguladores de VIH-1, Tat y/o Rev, para inducir la expresión de un gen tóxico tal como una toxina de a-difteria, citosina desaminasa o interferón- α 2 después de la infección con VIH-1. Véanse Curiel et al., 1993; Dinges et al., 1995; Harrison et al., 1992a; Harrison et al., 1992b; Ragheb et al., 1999.

El ácido nucleico terapéutico utilizado en la invención típicamente está contenido en un plásmido dentro de la célula bacteriana muerta. El plásmido también puede contener un segmento de ácido nucleico adicional que funciona como elemento regulador, tal como un promotor, un terminador, un potenciador o una secuencia de señal, y que está operativamente unido al segmento de ácido nucleico terapéutico. Un promotor adecuado puede ser específico del tejido o incluso específico del tumor, como lo indique el contexto terapéutico.

El ácido nucleico terapéutico puede codificar un gen suicida o una contraparte normal de un gen que expresa una proteína que funciona de modo anormal o está presente en niveles anormales en la célula mamífera. Asimismo, el ácido nucleico terapéutico puede estar contenido en un plásmido comprendido por múltiples secuencias de aminoácidos. Además, el plásmido puede contener un elemento regulador y/o un elemento indicador.

El término “gen” se refiere a una secuencia de polinucleótidos que comprende secuencias control y codificantes necesarias para la producción de un polipéptido o precursor. El polipéptido puede estar codificado por una secuencia codificante de longitud total o por cualquier porción de la secuencia codificante. Un gen puede constituir una

secuencia codificante ininterrumpida o puede incluir uno o más intrones, unidos por las mismas uniones de empalme apropiadas. Asimismo, un gen puede contener una o más modificaciones o bien en las regiones codificantes o en las no traducidas que podrán afectar la actividad biológica o la estructura química del producto de expresión, el índice de expresión o el modo de control de la expresión. Dichas modificaciones incluyen, aunque sin limitarse a ello, mutaciones, inserciones, eliminaciones y sustituciones de uno o más nucleótidos. En este sentido, dichos genes modificados pueden denominarse “variantes” del gen “natural”.

La expresión “célula hospedante” hace referencia a una célula que puede ser, o que ha sido, utilizada como receptora de un vector recombinante u otra transferencia de polinucleótidos, e incluye la descendencia de la célula original que ha sido transfectada. La descendencia de una sola célula puede no necesariamente ser completamente idéntica en morfología o en el complemento de ADN genómico o total a la célula madre original debido a mutación natural, accidental o intencional.

Elementos reguladores

Una molécula de ácido nucleico que se ha de introducir mediante el planteamiento de la presente invención puede también tener un segmento codificante deseado unido operativamente a un elemento regulador, tal como un promotor, un terminador, un potenciador y/o una secuencia de señal. Un promotor adecuado puede ser específico de tejidos o incluso específico de tumores, según lo dicte el contexto terapéutico.

Un promotor es “específico de tejidos” cuando se activa preferencialmente en un tejido determinado y, en consecuencia, es eficaz para promover la expresión en el tejido diana de una secuencia estructural operativamente unida. La categoría de los promotores específicos de tejidos incluye, por ejemplo, el promotor específico de hepatocitos para albúmina y antitripsina $\alpha 1$., respectivamente; la región de control del gen de elastasa I, que es activo en células pancreáticas acinares; la región de control del gen de insulina, activo en células beta pancreáticas; la región de control del virus de tumor mamario de ratón, que es activo en células de testículo, mama, linfocitos y mastocitos; la región de control del gen de proteína básica mielina, activo en oligodendrocitos en el cerebro; y la región de control del gen de la hormona liberador gonadotrópica, que es activo en células del hipotálamo. Véanse Frain et al. (1990), Ciliberto et al. (1985), Pinkert et al., (1987), Kelsey et al. (1987), Swift et al. (1984), MacDonald (1987), Hanahan, (1985), Leder et al. (1986), Readhead et al. (1987) y Mason et al. (1986).

Hay también promotores que se expresan preferencialmente en ciertas células tumorales o en células tumorales per se, y que son útiles para tratar distintos tipos de cáncer de acuerdo con la descripción de la invención. La clase de promotores que son específicos para células cancerosas se ilustra mediante el promotor de tirosinasa, para dirigir melanomas; el promotor MUC 1 /Df3, para dirigir carcinoma de mama; el promotor híbrido myoD potenciador/SV40, que dirige la expresión hacia rhabdomyosarcoma (RMS); el promotor del antígeno carcinoembrionario (CEA), que es específico de células que expresan CEA tales como células de cáncer de colon, y el promotor del gen de hexocinasa de tipo II, para dirigir carcinomas de pulmón de células pequeñas. Véanse Hart (1996), Morton & Potter (1998), Kurane et al. (1998) y Katabi et al. (1999).

Los promotores que son dependientes o bien de ARN polimerasa (pol) II o de pol II son promotores preferidos para transcripción génica. Los promotores altamente preferidos para transcripción de shRNA son los promotores de ARN III polimerasa H1 y U6.

Se puede usar una secuencia de señal para efectuar la segregación de un producto de expresión o la localización de un producto de expresión a un compartimento celular particular. Por lo tanto, una molécula de polinucleótidos terapéutica administrada mediante células bacterianas muertas puede incluir una secuencia de señal, en un marco de lectura correcto, de modo tal que el producto de expresión de interés sea segregado por una célula fagocitante o su progenie, influenciando así a las células circundantes, para que mantengan el paradigma del tratamiento elegido. Las secuencias de señal ilustrativas incluyen la secuencia de segregación de hemolisina C-terminal descrita en la patente de Estados Unidos núm. 5.143.830, la secuencia de segregación BAR1, descrita en la patente de Estados Unidos núm. 5.037.743, y la porción de la secuencia de señal del polipéptido zsig32, descrita en la patente de Estados Unidos núm. 6.025.197.

Elementos indicadores

Una molécula de ácido nucleico que se ha de introducir mediante el planteamiento de la presente invención puede incluir un elemento indicador. Un elemento indicador confiere en su hospedante recombinante un fenotipo fácilmente detectable o característico, típicamente codificando un polipéptido, no producido de otro modo por el hospedante, que puede detectarse, tras la expresión, por análisis histológico o análisis *in situ*, tal como por técnicas de imágenes *in vivo*. Por ejemplo, un elemento indicador administrado por una célula bacteriana muerta intacta, de acuerdo con la presente invención, podría codificar una proteína que produce, en la célula hospedante fagocitante, un cambio colorimétrico o fluorimétrico detectable mediante análisis *in situ* y que es una función cuantitativa o semi-cuantitativa de la activación de la transcripción. Ilustrativas de estas proteínas son las esterasas, fosfatasas, proteasas y otras enzimas, cuya actividad genera un cromóforo o fluoróforo detectable.

Los ejemplos preferidos son E. coli β -galactosidasa, que produce un cambio de color mediante escisión de un sustrato indigogénico, indolil- β -D-galactósido y una luciferasa, que oxida un aldehído de cadena larga (luciferasa bacteriana) o un ácido carboxílico heterocíclico (luciferina), con la liberación concomitante de luz.

5 También es útil en este contexto un elemento indicador que codifica la proteína fluorescente verde (GFP) de la medusa, *Aequorea victoria*, como lo describen Prasher et al. (1995). El campo de la tecnología asociada a GFP se ilustra en dos solicitudes PCT publicadas, en el documento WO 095/21191 (describe una secuencia de polinucleótidos que codifica una apoproteína GFP de 238 aminoácidos que contiene un cromóforo formado a partir de los aminoácidos 65 a 67) y WO 095/21191 (describe una modificación del ADNc para el apopéptido de *A. victoria* GFP, que proporciona un péptido que tiene propiedades fluorescentes alteradas), y en un informe de Heim et al. 10 (1994) de una GFP mutante, caracterizada por una mejoría de 4 a 6 veces en amplitud de excitación.

Otro tipo de elemento indicador está asociado con un producto de expresión que torna la célula bacteriana muerta recombinante resistente a una toxina. Por ejemplo, el gen neo protege a un hospedante contra niveles tóxicos del antibiótico G418, mientras que un gen que codifica dihidro folato reductasa confiere resistencia a metotrexato, y el gen de cloranfenicol acetiltransferasa (CAT) confiere resistencia al cloranfenicol.

15 Otros genes para uso como elemento indicador incluyen aquellos que pueden transformar una célula bacteriana muerta hospedante para expresar antígenos de superficie celular distinguida, p. ej., proteínas de fagocitación vírica tales como VIH gpl20 o herpes gD, que son fácilmente detectables con inmunoensayos.

Fármacos

20 Los fármacos útiles en la invención pueden ser cualquier sustancia fisiológica o farmacológicamente activa que produzca un efecto local o sistémico deseado en animales, particularmente en mamíferos y seres humanos. Los fármacos pueden ser compuestos inorgánicos u orgánicos, sin limitación, incluidos péptidos, proteínas, ácidos nucleicos y moléculas pequeñas, cualquiera de los cuales puede estar caracterizado o no caracterizado. Pueden tener diversas formas, tales como moléculas inalteradas, complejos moleculares, sales farmacológicamente activas, tales como hidrocloreto, hidrobromuro, sulfato, laurato, palmitato, fosfato, nitrito, nitrato, borato, acetato, maleato, 25 tartrato, oleato, salicilato y similares. Para fármacos ácidos, se pueden emplear las sales de metales, aminas o cationes orgánicos, por ejemplo, amonio cuaternario. Los derivados de fármacos, tales como bases, ésteres y amidas también se pueden utilizar. Un fármaco que es insoluble en agua se puede utilizar en la forma de su derivado soluble en agua, o como su derivado de base, que en cualquier caso, o mediante su administración, es convertido por enzimas, hidrolizado por el pH corporal o por otros procesos metabólicos a la forma terapéuticamente activa original. 30

Los fármacos útiles incluyen agentes quimioterapéuticos, agentes inmunosupresores, citocinas, agentes citotóxicos, compuestos nucleolíticos, isótopos radiactivos y enzimas activadoras de profármacos, que pueden ser naturales o producirse por métodos sintéticos o recombinantes.

35 Los fármacos afectados por resistencia a múltiples fármacos clásicos tienen particular utilidad en la invención, como los vinca alcaloides (p. ej., vinblastina y vincristina), las antraciclinas (p. ej., doxorubicina y daunorubicina), inhibidores de transcripción de ARN (p. ej., actinomicina D) y fármacos estabilizadores de microtúbulos (p. ej., paclitaxel). (Ambudkar et al, 1999).

40 En general, los agentes para quimioterapia del cáncer son fármacos preferidos. Los fármacos para quimioterapia del cáncer útiles incluyen mostazas de nitrógeno, nitrosoureas, etilenimina, alcanosulfonatos, tetrazina, compuestos de platino, análogos de pirimidina, análogos de purina, antimetabolitos, análogos de folato, antraciclinas, taxanos, vinca-alcaloides, inhibidores de topoisomerasa y agentes hormonales. Los fármacos para quimioterapia ilustrativos son Actinomicina-D, Alkeran, Ara-C, Anastrozol, Asparaginasa, BiCNU, Bicalutamida, Bleomicina, Busulfán, Capecitabina, Carboplatino, Carmustina, CCNU, Clorambucil, Cisplatino, Cladribina, CPT-11, Ciclofosfamida, Citarabina, Citosina arabinósido, Citoxan, Dacarbazina, Dactinomicina, Daunorubicina, 45 Dexrazoxano, Docetaxel, Doxorubicina, DTIC, Epirubicina, Etilenimina, Etopósido, Floxuridina, Fludarabina, Fluorouracil, Flutamida, Fotemustina, Gemcitabina, Herceptina, Hexametilamina, Hidroxiurea, Idarubicina, 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, Thoguanina, Tiotepa, 50 Tomudex, Topotecán, Treosulfán, Trimetrexato, Vinblastina, Vincristina, Vindesina, Vinorelbina, VP-16 y Xeloda.

Los fármacos para quimioterapia del cáncer útiles también incluyen agentes alquilantes tales como Tiotepa y ciclofosfamida; alquilsulfonatos tales como Busulfán, Improsulfán y Piposulfán; aziridinas tales como Benzodopa, Carboquone, Meturedopa, y Uredopa; etileniminas y metilamelaminas que incluyen altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilenfosforamida y trimetilolomelamina; mostazas de nitrógeno tales como Clorambucil, 55 Clomafazina, Colofosfamida, Estramustina, Ifosfamida, mecloretamina, mecloretamina óxido hidrocloreto, Melfalán, Novembiehin, Fenesterina, Prednimustina, Trofosfamida, mostaza de uracil; nitrosoureas tales como Cannustina, Clorozotocin, Fotemustina, Lomustina, Nimustina y Ranimustina; antibióticos tales como Aclacinomicinas, Actinomicina, Autramicina, Azaserina, Bleomicinas, Cactinomicina, Caliqueamicina, Carabicina, Carminomicina,

Carzinofilina, Cromoinicinas, Dactinomicina, Daunorrubicina, Detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, Doxorubicina, Epirubicina, Esorubicina, Idambicina, Marcelomicina, Mitomicinas, ácido micofenólico, Nogalamicina, Olivomicinas, Peplomycin, Pottfiromicina, Puromicina, Quelamicina, Rodorrubicina, Estreptonigrina, Estreptozocin, Tubercidin, Ubenimex, Zinostatina y Zorrubicina; anti-metabolitos tales como Metotrexato y 5-fluorouracil (5-FU); análogos de ácido fólico tales como Denopterin, Metotrexato, Pteropterin y Trimetrexato; análogos de purina tales como Fludarabina, 6-mercaptopurina, Tiamiprina y Tioguanina; análogos de pirimidina tales como Ancitabina, Azacitidina, 6-azauridina, Carmofur, Citarabina, Didesoxiuridina, Doxifluridina, Encocitabina, Floxuridina y 5-FU; andrógenos tales como Calusterona, Propionato de Dromostanolona, Epitiostanol, Rnepitiostano y Testolactona; anti-adrenérgicos tales como aminoglutetimida, Mitotano y Trilostano; reforzador de ácido fólico tal como ácido frolínico; aceglatona; aldofosfamida glucósido; ácido aminolevulínico; Amsacrina; Bestrabucil; Bisantreno; Edatraxato; Defofamina; Demecolcina; Diaziquone; Elfortitina; acetato de eliptinio; Etoglucid; nitrato de galio; hidroxiourea; Lentinan; Lonidamina; Mitoguazona; Mitoxantrona; Mopidamol; Nitracrina; Pentostatina; Fenamet; Pirarrubicina; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; Procarbazona; PSK®; Razoxana; Sizofrran; Espirogermanio; ácido tenuazónico; triaziquone; 2, 2', 2''-trichlorotrietilamina; Uretano; Vindesina; Dacarbazina; Doxifluridina; Mitobronitol; Mitolactol; Pipobroman; Gacitosina; Arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamida; thotEPa; taxoides, p. ej., Paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ) y Doxetaxel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer, Antony, Francia); Clorambucil; Gemcitabina; 6-tioguanina; Mercaptopurina; Metotrexato; análogos de platino tales como Cisplatino y Carboplatino; Vinblastina; platino; etopósido (VP-16); Ifosfamida; Mitomicina C; Mitoxantrona; Vincristina; Vinorelbina; Navelbina; Novantrona; Tenipósido; Daunomicina; Aminopterina; Xeloda; Ibandronato; CPT-11; inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilomitina (DMFO); ácido retinoico; Esperamicinas; Capecitabina; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los mencionados. También se incluyen agentes anti-hormonales que actúan para regular o inhibir la acción de las hormonas sobre los tumores tales como anti-estrógenos, incluidos, por ejemplo Tamoxifeno, Raloxifeno, inhibidores de aromatasas 4(5)-imidazoles, 4 Hidroxitamoxifeno, Trioxifeno, Keoxifeno, Onapristona y Toremifeno (Fareston); y anti-andrógenos tales como Flutamida, Nilutamida, Bicalutamida, Leuprolida y Goserrelina; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

Los fármacos útiles también incluyen citocinas. Los ejemplos de dichas citocinas son linfocinas, monocinas y hormonas de polipéptidos tradicionales. Incluida entre las citocinas se encuentran las hormonas del crecimiento como la hormona de crecimiento humana, la hormona del crecimiento humana N-metionilo y la hormona del crecimiento bovina; hormona paratiroidea; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; prorelaxina; hormonas glucoproteína tales como hormona estimulante de folículos (FSH), hormona estimulante de tiroides (TSH) y hormona luteinizante (LH); factor de crecimiento hepático; factor de crecimiento de fibroblastos; prolactina; lactógeno placentario; factor de necrosis tumoral y α y β ; sustancia anti-mulleriana; péptido asociado a gonadotropina de ratón; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular; integrina; trombopoyetina (TPO); factores de crecimiento nervioso tales como NGF- β ; factor de crecimiento de plaquetas; factores de crecimiento de transformación (TGF) tales como TGF- α y TGF- β ; factor de crecimiento de tipo insulina I y II; eritropoyetina (EPO); factores osteoinductivos; interferones tales como interferón- α , β y γ ; factores estimulantes de colonias (CSF) tales como macrófago-CSF (M-CSF); granulocito-macrófago-CSF (GM-CSF); y granulocito-CSF (G-CSF); interleucinas (IL) tales como IL-1, IL-1a, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12, IL-15; un factor de necrosis tumoral tal como TNF- α o TNF- β ; y otros factores de polipéptidos incluidos LIF y el kit ligando (KL). Tal como se emplea en esta memoria, el término citocina incluye proteínas de fuentes naturales o de cultivo celular recombinante y equivalentes biológicamente activos de las citocinas de secuencia natural.

Los fármacos pueden ser profármacos, subsiguientemente activados por una enzima activadora de profármacos que convierte un profármaco como un agente quimioterapéutico de peptidilo en un fármaco antineoplásico activo. Véanse, p. ej., los documentos WO 88/07378; WO 81/01145; la patente de Estados Unidos núm. 4.975.278. En general, el componente enzimático incluye cualquier enzima capaz de actuar en un profármaco en un modo tal como para convertirlo en su forma citotóxica más activa.

Para los propósitos de la invención, una célula bacteriana muerta intacta contiene un fármaco si contiene un ácido nucleico que codifica un fármaco. Por ejemplo, un plásmido puede codificar un fármaco que se expresa dentro de las células mamíferas diana. Esto hace posible la administración endógena de fármacos, que posee ventajas frente a la naturaleza transitoria de la administración exógena.

Ácidos nucleicos funcionales

["Ácido nucleico funcional" hace referencia a una molécula de ácido nucleico que, tras la introducción en una célula hospedante, interfiere específicamente con la expresión de una proteína. En general, las moléculas de ácido nucleico funcional tienen la capacidad de reducir la expresión de una proteína interactuando directamente con un transcrito que codifica la proteína. El ARN regulador, tal como siRNA, shRNA, ARN cortos (típicamente menos de 400 bases de longitud), micro-ARN (miRNA), ribozimas y ARN señuelo, y ácidos nucleicos antisentido constituyen ácidos nucleicos funcionales ilustrativos.

"ARN regulador" denota una categoría inclusiva de ARN que afectan la expresión por interferencia del ARN, supresión de expresión génica u otro mecanismo. Por consiguiente, además de shRNA, siRNA, miRNA y ssRNA antisentido, la categoría de ARN regulador incluye ribozimas y ARN señuelo, entre otros.

Dianas de ácidos nucleicos funcionales

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

Las proteínas que contribuyen a la resistencia a los fármacos constituyen dianas preferidas de ácidos nucleicos funcionales. Las proteínas pueden contribuir a resistencia a los fármacos adquirida o resistencia a los fármacos intrínseca. Cuando las células enfermas, tales como células tumorales, responden inicialmente a los fármacos, pero se tornan resistentes en ciclos de tratamiento subsiguientes, se adquiere el fenotipo resistente. Las dianas útiles implicadas en resistencia a los fármacos adquirida incluyen transportadores cassette de unión a ATP tales como P-glicoproteína (P-gp, P-170, P-gly, MDR1, ABCB1, proteína asociada a MDR, proteína de resistencia a múltiples fármacos 1), MDR-2 y MDR-3. MRP2 (proteína asociada a resistencia a múltiples fármacos), BCR-ABL (*breakpoint cluster region* – proto-oncogén Abelson), una proteína asociada a resistencia a STI-571, proteína relacionada con resistencia pulmonar, ciclooxigenasa-2, factor kappa nuclear, XRCC 1 (grupo de complemento cruzado de rayos x 1), ERCC1 (gen de complemento cruzado de escisión), GSTP 1 (Glutación S-transferasa), P-tubulina mutante y factores de crecimiento tales como IL-6 son dianas adicionales implicadas en resistencia a los fármacos adquirida. Cuando las células no tratadas previamente no responden a uno o más fármacos, el fenotipo de resistencia es intrínseco. Un ejemplo de una proteína que contribuye a resistencia intrínseca es LRP (proteína relacionada con resistencia pulmonar).

Las dianas particularmente útiles que contribuyen a resistencia a los fármacos incluyen transportadores de cassettes de unión a ATP tales como P-glicoproteína, MDR-2, MDR-3, BCRP, APT 11 a y LRP.

Los agentes útiles también incluyen proteínas que contribuyen a resistencia a apoptosis. Estos incluyen Bcl-2 (linfoma/leucemia de células B), Bcl-XL, A1/Bfl1, cinasa de adhesión focal, Dihidrodiol deshidrogenasa y proteína mutante p53.

Las dianas útiles incluyen además proteínas supresoras de tumores oncogénicas y mutantes. Los ejemplos incluyen β -Catenin, PKC- α (proteína cinasa C), C-RAF, K-Ras (V12), ARN helicasa caja Dead DP97, DNMT1 (ADN metiltransferasa), FLIP (inhibidor proteico de Flice), C-Sfc, 53BP1, proteína del grupo Polycomb EZH2 (homólogo del potenciador de zeste) ErbB1, HPV-16 E5 y E7 (papilomavirus humano temprano 5 y temprano 7), Fortilin & MCI1P (proteína de leucemia de mielocitos 1), DIP 13 α (proteína de interacción con DDC 13a), MBD2 (dominio de unión a metil CpG), p21, KLF4 (factor de tipo Kruppel 4), tpt/TCTP (proteína de tumores controlada por traducción), SPK1 & SPK2 (esfingosina cinasa), P300, PLK1 (cinasa de tipo Polo 1), Trp53, Ras, ErbB1, VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular), BAG-1 (atanogen asociado a BCL2 1), MRP2, BCR-ABL, STI-571 proteína asociada a resistencia, proteína relacionada con resistencia pulmonar, ciclooxigenasa-2, factor kappa nuclear, XRCC1, ERCC1, GSTP1, β -tubulina mutante y factores de crecimiento.

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

Debido a la heterogeneidad de las células tumorales, una serie de distintas vías de resistencia a los fármacos o de resistencia a apoptosis pueden ser operativas en las células diana. Por lo tanto, los ácidos nucleicos funcionales utilizados en estos métodos descritos en la invención pueden requerir cambios con el transcurso del tiempo. Por ejemplo, si las muestras de biopsia revelan nuevas mutaciones que resultan en resistencia a los fármacos adquirida, se pueden diseñar y codificar siRNA específicos en un plásmido de expresión adecuado, que se transforma en una cepa bacteriana productora de células bacterianas muertas, que se usa para producir células bacterianas muertas recombinantes que se administran para abordar la resistencia a los fármacos adquirida.

Moléculas de siRNA

Las moléculas de ARN de interferencia corta (siRNA) son útiles para efectuar interferencia de ARN (RNAi), un mecanismo de silenciamiento de genes post-traducción. Como se describe en la invención, los siRNA hacen referencia a moléculas de ARN bicatenario o moléculas de ARN de horquilla monocatenario de aproximadamente 10 a aproximadamente 30 nucleótidos de longitud, que se denominan por su capacidad de interferir específicamente con la expresión de proteínas. Preferiblemente, las moléculas de siRNA bicatenarias tienen 12-28 nucleótidos de longitud, más preferiblemente 15-25 nucleótidos de longitud, incluso más preferiblemente 19-23 nucleótidos de longitud y lo más preferiblemente 21-23 nucleótidos de longitud. En consecuencia, las moléculas de siRNA preferidas tienen 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 28 o 29 nucleótidos de longitud.

La longitud de una cadena designa la longitud de una molécula de siRNA bicatenaria. Por ejemplo, un siRNA bicatenario que se describe como de 21 ribonucleótidos de largo (un 21-mer) podría comprender dos cadenas opuestas de ARN que se anelan en 19 pares de base contiguos. Los dos ribonucleótidos restantes en cada cadena formarían una "proyección." Cuando un siRNA contiene dos cadenas de diferentes longitudes, la cadena más larga

designa la longitud del siRNA. Por ejemplo, un dsRNA que contiene una cadena que tiene 21 nucleótidos de largo y una segunda cadena que tiene 20 nucleótidos de largo, constituye un 21-mer.

Son convenientes los siRNA bicatenarios que comprenden una proyección. La proyección puede estar en el extremo 5' o 3' de una cadena. Preferiblemente, está en el extremo 3' de la cadena de ARN. La longitud de una proyección puede variar, pero preferiblemente tiene aproximadamente 1 a aproximadamente 5 bases, y más preferiblemente aproximadamente 2 nucleótidos de longitud. Preferiblemente, el siRNA de uso en la presente invención comprenderá una proyección en 3' de aproximadamente 2 a 4 bases. Más preferiblemente, la proyección en 3' tiene 2 ribonucleótidos de largo. Incluso más preferiblemente, los 2 ribonucleótidos que comprenden la proyección en 3' son uridina (U).

Los siRNA utilizados en la invención están diseñados para interactuar con una secuencia de ribonucleótidos diana, lo que significa que complementan una secuencia diana lo suficiente como para hibridarse a la secuencia diana. En una realización, la invención describe una molécula de siRNA que comprende una secuencia de ribonucleótidos por lo menos 70%, 75%, 80%, 85% o 90% idéntica a una secuencia de ribonucleótidos diana del complemento de una secuencia de ribonucleótidos diana. Preferiblemente, la molécula de siRNA es por lo menos 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a la secuencia de ribonucleótidos diana o al complemento de la secuencia de ribonucleótidos diana. Lo más preferiblemente, un siRNA será 100% idéntico a la secuencia de nucleótidos diana o al complemento de la secuencia de ribonucleótidos. No obstante, las moléculas de siRNA con inserciones, eliminaciones o mutaciones puntuales sencillas relativas a una diana también pueden ser eficaces.

Las herramientas para ayudar en el diseño de siRNA están fácilmente disponibles al público. Por ejemplo, una herramienta de diseño de siRNA basada en un ordenador está disponible en internet ingresando en www.dharmacon.com.

En este contexto, los shRNA comprenden una cadena sencilla de ARN que forma una estructura en tallo-bucle, en donde el tallo consiste en las cadenas sentido y antisentido complementarias que comprenden un siRNA bicatenario, y el bucle es un enlazador de tamaño variable. La estructura del tallo de los shRNA en general tiene entre aproximadamente 10 y aproximadamente 30 nucleótidos de largo. Preferiblemente, el tallo de las moléculas de shRNA tiene 12-28 nucleótidos de largo, más preferiblemente 15-25 nucleótidos de largo, incluso más preferiblemente 19-23 nucleótidos de largo y lo más preferiblemente 21-23 nucleótidos de largo. Por lo tanto, las moléculas de shRNA preferidas comprenden tallos que tienen 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 28 o 29 nucleótidos de longitud.

Ribozimas

Las ribozimas son moléculas de ARN que tienen una actividad enzimática que puede escindir repetidamente otras moléculas de ARN en un modo específico de una secuencia base de nucleótidos. Dichas moléculas de ARN enzimáticas pueden dirigirse prácticamente a cualquier transcrito de ARN, y la escisión eficiente puede lograrse *in vitro*.

Se conocen en la actualidad seis variedades básicas de ARN enzimáticos naturales. Cada uno puede catalizar la hidrólisis de enlaces fosfodiéster de ARN en trans (y por lo tanto puede escindir otras moléculas de ARN) bajo condiciones fisiológicas. En general, los polinucleótidos enzimáticos actúan uniéndose primero a un ARN diana. Dicha unión ocurre a través de la porción de unión diana de un polinucleótido enzimático que se mantiene próximo a una porción enzimática de la molécula que actúa para escindir el ARN diana. Por consiguiente, el polinucleótido enzimático reconoce primero y luego se une a un ARN diana a través de pares de bases complementarios, y una vez unido al sitio correcto, actúa enzimáticamente para cortar el ARN diana. La escisión estratégica de dicho ARN diana destruirá su capacidad de dirigir la síntesis de una proteína codificada. Después de que un polinucleótido enzimático se ha unido y escindido su diana de ARN, es liberado de ese ARN para buscar otra diana y puede unirse repetidamente y escindir nuevas dianas.

La naturaleza enzimática de una ribozima es ventajosa. Ya que una sola molécula de ribozima es capaz de escindir muchas moléculas de ARN diana, las concentraciones eficaces de ribozima pueden ser bastante bajas.

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

Las ribozimas utilizadas en la invención pueden comprender oligonucleótidos modificados (p. ej., mejor estabilidad, direccionamiento, etc.). Las secuencias de ácidos nucleicos que codifican las ribozimas pueden estar bajo el control de un promotor constitutivo fuerte, tal como, por ejemplo, el promotor de ARN Polimerasa II o ARN polimerasa III, de

modo que las células transfectadas produzcan cantidades suficientes de la ribozima para destruir los mensajes endógenos diana e inhibir la traducción.

Oligonucleótidos antisentido

5 Los oligonucleótidos antisentido utilizados en la invención se hibridan específicamente con un ácido nucleico que codifica una proteína, e interfieren con la transcripción o traducción de la proteína. En una realización, un oligonucleótido antisentido dirige ADN e interfiere con su replicación y/o transcripción. En otra realización, un oligonucleótido antisentido se hibrida específicamente con ARN, incluido pre-ARNm y ARNm. Dichos oligonucleótidos antisentido pueden efectuar, por ejemplo, la translocación del ARN al sitio de traducción de la proteína, la traducción de proteína del ARN, el empalme del ARN para producir una o más especies de ARNm, y la actividad catalítica que puede estar implicada o que puede ser facilitada por el ARN. El efecto general de dicha interferencia consiste en modular, reducir o inhibir la expresión de la proteína diana.

10 “Oligonucleótido” hace referencia a un polinucleótido que comprende, por ejemplo, entre aproximadamente 10 nucleótidos (nt) y aproximadamente 1000 nt. Los oligonucleótidos para uso en la invención tienen entre aproximadamente 10 nt y aproximadamente 150 nt. El oligonucleótido puede ser un oligonucleótido natural o un oligonucleótido sintético. Los oligonucleótidos se pueden modificar.

15 “Oligonucleótido modificado” y “polinucleótido modificado” hacen referencia a oligonucleótidos o polinucleótidos con una o más modificaciones químicas en el nivel molecular de las estructuras moleculares naturales de todas o algunas de las bases, restos azúcar, enlaces fosfato internucleosídicos, además de moléculas que tienen sustituciones añadidas o una combinación de modificaciones en estos sitios. Los enlaces fosfato internucleosídicos pueden ser fosfodiéster, fosfotriéster, fosforamidato, siloxano, carbonato, carboximetiléster, acetamidato, carbamato, tioéter, fosforoamidato puente, metileno fosfonato puente, fosfortioato, metilfosfonato, fosforoditioato, fosfortioato puente o enlaces internucleotídicos sulfona, o enlaces 3'-3', 5'-3' o 5'-5', y combinaciones de dichos enlaces similares. El enlace fosfodiéster se puede reemplazar con un enlace sustituto, tal como fosfortioato, metilamino, metilfosfonato, fosforoamidato y guanidina, y la subunidad ribosa de los polinucleótidos puede también sustituirse (p. ej., hexosa fosfodiéster; ácidos nucleicos peptídicos). Las modificaciones pueden ser internas (individuales o repetidas) o al final(s) de la molécula de oligonucleótido, y pueden incluir adiciones a la molécula de los enlaces fosfato internucleosídicos, como modificaciones de desoxirribosa y fosfato que se escinden o reticularse a las cadenas opuestas o a enzimas u otras proteínas asociadas. Las expresiones “oligonucleótidos modificados” y “polinucleótidos modificados” también incluyen oligonucleótidos o polinucleótidos que comprenden modificaciones a los restos azúcar (p. ej., ribonucleótidos sustituidos en 3 o monómeros de desoxirribonucleótidos), cualquiera de los cuales puede estar unido a otro mediante enlaces 5' a 3'.

20 Existen varios sitios dentro de un gen que se pueden utilizar para diseñar un oligonucleótido antisentido. Por ejemplo, un oligonucleótido antisentido puede unirse a la región que abarca el codón de inicio de la traducción, también conocido como codón de partida, del marco de lectura abierto. En este sentido, “codón de partida” y “codón de inicio de la traducción” en general se refieren a la porción de dicho ARNm o gen que abarca entre por lo menos aproximadamente 25 y por lo menos aproximadamente 50 nucleótidos contiguos en cualquier dirección (es decir, 5' o 3') desde un codón de inicio de la traducción.

25 Otro sitio para interacción antisentido que ha de ocurrir es el codón de finalización del marco de lectura abierto. Las expresiones “región del codón finalizador” y “región del codón de finalización de la traducción” se refieren en general a una porción de dicho ARNm o gen que abarca por lo menos aproximadamente 25 a por lo menos aproximadamente 50 nucleótidos contiguos en cualquier dirección desde un codón de terminación de la traducción.

30 El marco de lectura abierto o la región codificante pueden también ser dirigidos efectivamente. En general se entiende que el marco de lectura abierto hace referencia a la región entre el codón de inicio de la traducción y el codón de finalización de la traducción. Otra región diana es la región no traducida 5', que es la porción de un ARNm en la dirección 5' del codón de inicio de la traducción. Incluye los nucleótidos entre el sitio cap 5' y el codón de inicio de la traducción de un ARNm o nucleótidos correspondientes en el gen.

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

40 Un oligonucleótido antisentido puede también dirigir la región cap 5' de un ARNm. La región cap 5' comprende un residuo guanosina N7-metilado unido al residuo más 5' del ARNm vía un enlace 5'-5' trifosfato. Se considera que la región cap 5' incluye la estructura cap 5' propiamente dicha y también los primeros 50 nucleótidos adyacentes a la región cap.

45 Si bien algunos transcritos de ARNm eucariotas se traducen directamente, muchos contienen una o más regiones de intrones, que se escinden de un transcrito antes de que se traduzca. El resto de las regiones de exones (y por lo tanto traducidas) se empalman unas con otras para formar una secuencia de ARNm continua. Los sitios de empalme de ARNm, es decir, las uniones intrón-exón, representan posibles regiones diana, y son particularmente útiles en

situaciones en las que el empalme aberrante está implicado en la enfermedad, o en las que la producción excesiva de un producto de empalme de ARNm particular está implicada en la enfermedad. A su vez, las uniones de fusión aberrantes debido a reordenamientos son también dianas posibles para oligonucleótidos antisentido.

5 Con estos distintos sitios diana en consideración, se deben elegir los oligonucleótidos antisentido que son suficientemente complementarios a los polinucleótidos diana. "Complementaridad" hace referencia a la compatibilidad topológica o compatibilidad de las superficies de interacción de dos moléculas. Debe haber un grado suficiente de complementariedad o apareamiento preciso de modo tal que ocurra una unión estable y específica entre el oligonucleótido y la diana de polinucleótido. Cabe destacar que la secuencia de un oligonucleótido antisentido no necesita ser 100% complementaria a aquella de su polinucleótido diana para ser específicamente susceptible de hibridación. Un oligonucleótido antisentido es específicamente susceptible de hibridación cuando la unión del oligonucleótido antisentido al polinucleótido diana interfiere con la función normal del polinucleótido diana causando una pérdida de utilidad, y hay un grado suficiente de complementariedad para evitar la unión no específica del oligonucleótido antisentido a secuencias no diana bajo condiciones en las que se desea la unión específica, es decir, bajo condiciones fisiológicas en el caso de ensayos *in vivo* o tratamiento terapéutico, y en el caso de ensayos *in vitro*, bajo las condiciones en las que se realizan los ensayos.

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

20 Los oligonucleótidos antisentido utilizados de acuerdo con la presente invención pueden convenientemente y rutinariamente elaborarse a través de la técnica conocida de síntesis de fase sólida. Varios proveedores venden los equipos para dicha síntesis, incluidos, por ejemplo, Applied Biosystems (Foster City, CA). Cualquier otro método para dicha síntesis conocido en la técnica puede emplearse adicional o alternativamente. Se conoce el uso de técnicas similares para preparar oligonucleótidos tales como los fosforotioatos y derivados alquilados.

Ácidos nucleicos que codifican ácidos nucleicos funcionales

25 Para los fines de la invención, una célula bacteriana muerta intacta contiene un ácido nucleico funcional si contiene un ácido nucleico que codifica un ácido nucleico funcional. Por ejemplo, un plásmido puede codificar un ácido nucleico funcional que se expresa dentro de células diana mamíferas. Esto hace que sea posible la administración endógena de ácidos nucleicos funcionales, que tiene ventajas frente a la naturaleza transitoria de la administración exógena.

30 Por lo tanto, las células bacterianas muertas intactas pueden portar ADN plasmídico que codifica una o más secuencias de siRNA destinada a silenciar los genes de resistencia a los fármacos o de resistencia a apoptosis. Con el uso de células bacterianas muertas que codifican múltiples ácidos funcionales, es posible tratar las células que expresan mecanismos de resistencia a múltiples fármacos. Diferentes secuencias de siRNA pueden expresarse individualmente de diferentes promotores. Por ejemplo, siRNA que dirige Pgp ARNm puede expresarse a partir del promotor U6 y siRNA que dirige Bcl-2 ARNm puede expresarse a partir del promotor H1. Estos cassettes de expresión múltiple preferiblemente son portados en un solo plásmido, pero pueden también estar en distintos plásmidos. Distintas secuencias de siRNA pueden también expresarse a partir de un solo promotor, en donde el plásmido recombinante porta un cassette de expresión comprendido por múltiples secuencias que codifican siRNA, que están unidas mediante secuencias de polinucleótidos no codificantes. Un terminador de transcripción de un solo gen puede disponerse debajo del cassette de expresión completa.

45 En una estrategia, un plásmido codifica las cadenas sentido y antisentido de un siRNA como dos transcritos independientes que, después de la expresión dentro de una célula diana, se hibridan para formar dúplex de siRNA funcionales. En una segunda estrategia preferida, un plásmido codifica uno o más siRNA, en donde cada uno se expresa como una sola transcripción que forma una estructura horquilla corta tallo-bucle de ARN. La estructura de horquilla puede ser procesada por una enzima Dicer en siRNA funcional.

Vehículos farmacéuticamente aceptables

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

50 Endotoxina

"Endotoxina" hace referencia a lipopolisacárido (LPS) libre. Por consiguiente, una composición que está "libre de endotoxina" carece de LPS que no está asociado con una membrana de células bacterianas. Una composición que está "esencialmente libre de endotoxina" carece de una cantidad o concentración suficiente de LPS para causar toxicidad en un mamífero, tal como un ser humano. Endotoxina/LPS que no está asociada con una membrana celular bacteriana también se denomina "endotoxina libre".

La endotoxina también puede ser eliminada de una composición por filtración a través de un filtro de 0,2 µm. La endotoxina libre y las micelas de endotoxina son más pequeñas que de 0,2 µm y en consecuencia se filtran fácilmente de una composición que retiene células bacterianas muertas, que son más grandes de 0,2 µm. A su vez, los anticuerpos monoclonales, anti-lípido A se pueden usar para unirse a la endotoxina libre. Los anticuerpos monoclonales anti-lípido A se pueden unir a un soporte sólido tal como una columna de cromatografía de afinidad o a esferas magnéticas mediante su componente Fc, dejando los fragmentos Fab de unión al lípido A libres para unirse a LPS libre.

Ligandos biespecíficos

Las composiciones para uso de la invención comprenden uno o más ligandos biespecíficos. Los ligandos útiles en la invención incluyen cualquier agente que se una a un componente superficial en una célula diana y a un componente superficial en una célula bacteriana muerta. Preferiblemente, el componente superficial en una célula diana es un receptor, especialmente un receptor capaz de mediar la endocitosis. Los ligandos pueden comprender un polipéptido y/o un componente de carbohidrato. Los anticuerpos son ligandos preferidos. Por ejemplo, un anticuerpo biespecífico que porta especificidades duales para un componente superficial en células bacterianas muertas intactas derivadas de bacterias y un componente superficial en células mamíferas diana, se pueden usar eficientemente para dirigir las células bacterianas muertas hacia las células mamíferas diana *in vitro* e *in vivo*. La categoría de ligandos útiles también incluye receptores, enzimas, péptidos de unión, proteínas de fusión/quiméricas y moléculas pequeñas.

La selección de un ligando particular se hace en función de dos criterios principales: (i) unión específica a uno o más dominios en la superficie de las células bacterianas muertas intactas y (ii) unión específica a uno o más dominios en la superficie de las células diana. Por lo tanto, los ligandos preferiblemente tienen una primera rama que porta especificidad para una estructura superficial de células bacterianas muertas intactas derivada de bacterias y una segunda rama que porta especificidad para una estructura superficial de células mamíferas. Cada una de las primera y segunda ramas puede ser multivalente. Preferiblemente, cada rama es mono-específica, incluso si es multivalente.

Para unión a células bacterianas muertas derivadas de bacterias, es conveniente que una rama del ligando sea específica para el componente de O-polisacárido de un lipopolisacárido hallado en la célula bacteriana madre. Otras estructuras superficiales de células bacterianas muertas que se pueden explotar para unión a ligandos incluyen polipéptidos y carbohidratos expuestos a superficies celulares en membranas exteriores, tales como pili, fimbrias, proteína de membrana exterior y fragmentos de péptidos expuestos a la superficie celular de los flagelos.

Para unión a células diana, una rama del ligando es específica de un componente superficial de una célula mamífera. Dichos componentes incluyen proteínas superficiales celulares, péptidos y carbohidratos, o bien caracterizados o no caracterizados. Los receptores de superficie celular, especialmente aquellos capaces de activar la endocitosis mediada por los receptores, son componentes superficiales celulares convenientes para direccionamiento. Dichos receptores, si se expresan en exceso en la superficie celular diana, confieren selectividad adicional para dirigir las células que se han de tratar, reduciendo de este modo la posibilidad de administrar a células no diana.

A modo de ejemplo, uno puede dirigir células tumorales, células metastásicas, células de la vasculatura, tales como células endoteliales y células de músculo liso, células de pulmón, células de riñón, células sanguíneas, células de médula ósea, células de cerebro, células de hígado, etc, o precursores de cualquier célula seleccionada, seleccionando 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 antígeno carcinoembrionario (CEA), que se expresa excesivamente en la mayoría de los carcinomas de colon, recto, mama, pulmón, páncreas y tubo digestivo (Marshall, 2003); receptores de heregulina (HER-2, neu o c-erbB-2), que frecuentemente se expresan en exceso en tumores de mama, ovario, colon, pulmón, próstata y cuello uterino (Hung et al., 2000); receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), que se expresa altamente en un rango de tumores sólidos que incluyen aquellos de mama, cabeza y cuello, pulmón de células no pequeñas y próstata (Salomon et al., 1995); receptor de asialoglucoproteína (Stockert, 1995); receptor de transferrina (Singh, 1999); receptor del complejo enzimático de serpina, que se expresa en hepatocitos (Ziady et al., 1997); receptor del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR), que se expresa en gran medida en células de adenocarcinoma ductal pancreático (Kleeff et al., 2002); receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR), para terapia génica anti-angiogénesis (Becker et al., 2002 y Hoshida et al., 2002); receptor de folato, que se expresa excesiva y selectivamente en 90% de los carcinomas de ovario no mucinosos (Gosselin y Lee, 2002); glicocáliz de la superficie celular (Batra et al., 1994); receptores de carbohidratos (Thumher et al., 1994); y receptor de inmunoglobulina polimérica, que es útil para la administración de genes a las células epiteliales respiratorias y atractivo para el tratamiento de enfermedades pulmonares tales como fibrosis quística (Kaetzel et al., 1997).

Los ligandos preferidos comprenden anticuerpos y/o derivados de anticuerpos. Tal como se emplea en la presente memoria, el término "anticuerpo" abarca una molécula de inmunoglobulina obtenida mediante la generación *in vitro* o *in vivo* de una respuesta inmunogénica. El término "anticuerpo" incluye anticuerpos policlonales, mono-específicos y monoclonales, así como también derivados de anticuerpos, tales como fragmentos de anticuerpos monocatenarios

(scFv). Los anticuerpos y derivados de anticuerpos útiles en la presente invención también se pueden obtener por técnicas de ADN recombinante.

Los anticuerpos de tipo silvestre tienen cuatro cadenas de polipéptidos, dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras idénticas. Ambos tipos de cadenas de polipéptidos tienen regiones constantes, que no varían o varían muy poco entre anticuerpos de la misma clase, y regiones variables. Las regiones variables son únicas de un anticuerpo particular y comprenden un dominio de unión al antígeno que reconoce un epítipo específico. Las regiones del dominio de unión al antígeno que están más directamente implicadas en la unión de anticuerpos son "regiones determinantes de complementaridad" (CDR).

El término "anticuerpo" también abarca derivados de anticuerpos, tales como fragmentos de anticuerpos que retienen 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 unida en puente mediante un enlace disulfuro), Fab' (un fragmento de anticuerpos que contiene un solo dominio de unión al antígeno que comprende un Fab y una porción adicional de la cadena pesada a través de la región bisagra, F(ab')₂ (dos moléculas Fab' unidas por enlaces disulfuro entre cadenas 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 puede estar dirigido a un epítipo distinto), y un scFv (la región determinante de unión al antígeno, variable, de una sola cadena ligera y pesada de un anticuerpo unido mediante una cadena de aminoácidos).

Cuando los anticuerpos, incluidos fragmentos de anticuerpos, constituyen una parte o todos los ligandos, preferiblemente son de origen humano o modificados para ser adecuados para uso en seres humanos. Los llamados "anticuerpos humanizados" se conocen en la técnica. Véase, p. ej., Osbourn et al., 2003. Han sido modificados por manipulación genética y/o tratamiento *in vitro* para reducir su antigenicidad en un ser humano. Los métodos para humanizar anticuerpos se describen, p. ej., en las patentes de Estados Unidos núm. 6.639.055, núm. 5.585.089 y núm. 5.530.101. En el caso más sencillo, los anticuerpos humanizados se forman injertando los bucles de unión al antígeno, conocidos como regiones determinantes de complementaridad (CDR), de un mAb de ratón hacia una IgG humana. Véanse Jones et al., 1986; Riechmann et al., 1988; y Verhoeyen et al., 1988. La generación de anticuerpos humanizados de alta afinidad, no obstante, en general requiere la transferencia de uno o más residuos adicionales de las llamadas regiones marco (FR) del mAb madre de ratón. Se han desarrollado varias variantes de la tecnología de humanización. Véase Vaughan et al., 1998.

También se pueden emplear en la invención anticuerpos humanos, en lugar de "anticuerpos humanizados". Tienen gran afinidad hacia sus respectivos antígenos y habitualmente se obtienen de bibliotecas de fragmentos variables monocatenarios muy grandes (scFvs) o bibliotecas de exhibición de fagos Fab. Véanse Griffiths et al., 1994; Vaughan et al., 1996; Sheets et al., 1998; de Haard et al., 1999; y Knappik et al., 2000.

Los ligandos útiles también incluyen anticuerpos monocatenarios biespecíficos, que típicamente son polipéptidos recombinantes que consisten en una porción de cadena ligera variable covalentemente conectada a través de una molécula enlazadora a una porción de la cadena pesada variable correspondiente. Véanse las patentes de Estados Unidos núm. 5.455.030, núm. 5.260.203, y núm. 4.496.778. Los anticuerpos biespecíficos también pueden prepararse por otros métodos. Por ejemplo, los heteroconjugados químicos pueden crearse uniendo químicamente anticuerpos intactos o fragmentos de anticuerpos de distintas especificidades. Véase Karpovsky et al., 1984. No obstante, dichos heteroconjugados son difíciles de elaborar en un modo reproducible y son por lo menos dos veces más grandes que los anticuerpos monoclonales normales. Los anticuerpos biespecíficos también pueden crearse por intercambio de disulfuro, lo que implica escisión enzimática y re-asociación de los fragmentos de anticuerpo. Véase Glennie et al., 1987.

Dado que los fragmentos Fab y scFv son monovalentes, a menudo tienen baja afinidad hacia estructuras diana. Por ende, los ligandos preferidos elaborados a partir de estos compuestos son modificados en conjugados diméricos, triméricos o tetraméricos para incrementar la afinidad funcional. Véanse Tomlinson y Holliger, 2000; Carter, 2001; Hudson y Souriau, 2001; y Todorovska et al, 2001. Dichas estructuras de conjugados pueden crearse por reticulaciones químicas y/o genéticas.

Los ligandos biespecíficos utilizados en la invención preferiblemente son mono-específicos en cada extremo, es decir, específicos para un solo componente en células bacterianas muertas en un extremo y específicos para un solo componente en células diana en el otro extremo. Los ligandos pueden ser multivalentes en uno o ambos extremos, por ejemplo, en la forma de los llamados 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 Fv. Asimismo, un triacuerpo resulta en la formación de un trímero trivalente de tres scFvs, produciendo tres sitios de unión, y un tetracuerpo resulta de la formación de un tetrámero tetravalente de cuatro scFvs, produciendo cuatro sitios de unión.

Varios anticuerpos monoclonales humanizados humanos y de ratón y sus fragmentos que tienen especificidad hacia receptores en células mamíferas han sido aprobados para uso terapéutico humano, y la lista se está expandiendo rápidamente. Véase Hudson y Souriau, 2003. Un ejemplo de dicho anticuerpo que se puede utilizar para formar una rama de un ligando biespecífico tiene especificidad hacia HER2: Herceptin™; Trastuzumab.

Las regiones variables de anticuerpos también se pueden condensar a una amplia gama de dominios de proteínas. La fusión a dominios de inmunoglobulina humana tales como IgG1 CH3 añade masa y promueve la dimerización. Véase Hu et al., 1996. La fusión a regiones bisagra Ig-Fc humanas puede añadir funciones efectoras. Además, la fusión a dominios de proteína heterólogos de proteínas multiméricas promueve la multidimerización. Por ejemplo, la fusión de un scFv corto a hélices anfipáticas cortas se ha usado para producir minianticuerpos. Véase Pack y Pluckthun, 1992. Los dominios de proteínas que forman heterodímeros, tales como fos/jun, pueden usarse para producir moléculas biespecíficas (Kostelny et al., 1992) y, alternativamente, dominios de homodimerización pueden modificarse genéticamente para formar heterodímeros por estrategias de modificación genética tales como “botón en ojal” (*knobs into holes*) (Ridgway et al., 1996). Finalmente, se pueden seleccionar pares de proteínas de fusión que proveen tanto multimerización como una función adicional, p. ej., estreptavidina. Véase Dubel et al., 1995.

Composiciones adicionales

En una realización, la composición comprende una célula bacteriana muerta que contiene una molécula de ácido nucleico funcional y un fármaco. La molécula de ácido nucleico funcional puede ser una que dirija la transcripción de una proteína que contribuya a la resistencia a los fármacos. Preferiblemente, la molécula de ácido nucleico funcional dirige la transcripción de una proteína que contribuye a la resistencia contra el mismo fármaco en la composición. El fármaco puede estar contenido dentro de una célula bacteriana muerta, incluso la misma célula bacteriana muerta que la molécula de ácido nucleico funcional, pero no es necesario que esté contenida.

Métodos de administración para células competentes de fagocitosis o endocitosis

En otro aspecto, se describe la administración mediante unión en puente de células bacterianas muertas derivadas de bacterias con células mamíferas competentes de fagocitosis o endocitosis. Dichas células mamíferas, que son capaces de fagocitar a células bacterianas madre en el modo de patógenos bacterianos intracelulares, a su vez fagocitan a las células bacterianas muertas, que liberan su carga en el citoplasma de las células mamíferas. Este planteamiento de administración se puede efectuar sin el uso de ligandos de direccionamiento.

Puede estar implicada una diversidad de mecanismos para fagocitar células bacterianas muertas por un tipo de célula determinada, y la presente invención no depende de ningún mecanismo particular en este sentido. Por ejemplo, la fagocitosis es un proceso bien documentado en el que los macrófagos y otros fagocitos, tales como neutrófilos, ingieren partículas extendiendo los pseudópodos sobre la superficie de la partícula hasta que la partícula está totalmente fagocitada. Si bien se describe como fagocitosis “no específica”, se ha demostrado la implicancia de receptores específicos en el proceso. Véanse Wright y Jong (1986); Speert et al. (1988).

Por lo tanto, una forma de fagocitosis implica la interacción entre los ligandos superficiales y los receptores de ligandos ubicados en las membranas de los pseudópodos (Shaw y Griffin, 1981). Se cree que esta etapa de sujeción, mediada por los receptores específicos, depende de las adhesinas de la superficie bacteriana. Con respecto a bacterias menos virulentas, tales como *E. coli* no enterotoxigénica, la fagocitosis también puede ocurrir en ausencia de ligandos superficiales para receptores de fagocitos. Véase Pikaar et al. (1995), por ejemplo. Por ende, la presente invención describe el uso de células bacterianas muertas que o bien poseen o carecen de adhesinas superficiales, para mantener la naturaleza de sus células bacterianas madre, o están fagocitadas por fagocitos (es decir, células hospedantes “fagocitosis-competentes”), de las cuales los neutrófilos y los macrófagos son los tipos principales en mamíferos.

Otro proceso de fagocitosis es la endocitosis, mediante la cual los patógenos intracelulares ejemplificados por especies de *Salmonella*, *Escherichia*, *Shigella*, *Helicobacter*, *Pseudomonas* y *Lactobacilli* obtienen ingreso a células epiteliales mamíferas y se replican allí. Dos mecanismos básicos en este sentido son la endocitosis mediada por receptores dependientes de clatrina, también conocida como “endocitosis de vesículas recubiertas” (Riezman, 1993), y la endocitosis independiente de clatrina (Sandvig y Deurs, 1994). Una de ellas o ambas pueden estar implicadas cuando una célula competente de fagocitosis que actúa por endocitosis (es decir, una célula hospedante “endocitosis-competente”) fagocita a las células bacterianas muertas de acuerdo con la invención. Las células endocitosis-competentes representativas son células epiteliales de mama, enterocitos en el tubo digestivo, células epiteliales estomacales, células epiteliales de pulmón y células epiteliales de las vías urinarias y la vejiga.

Cuando se efectúa la administración a una célula mamífera competente de fagocitosis sin el uso de un ligando de direccionamiento, la naturaleza de la aplicación contemplada influirá en la elección de la fuente bacteriana para las células bacterianas muertas empleadas. Por ejemplo, las especies *Salmonella*, *Escherichia* y *Shigella* portan adhesinas que son reconocidas por receptores que median la endocitosis en enterocitos en el tubo digestivo, y pueden ser adecuadas para administrar un fármaco que es eficaz para células de cáncer de colon. De modo similar, las células bacterianas muertas derivadas de *Helicobacter pylori*, que portan adhesinas específicas de células epiteliales estomacales, podrían ser adecuadas para administración destinada a células de cáncer de estómago. La inhalación o insuflación puede ser ideal para administrar células bacterianas muertas intactas derivadas de una especie *Pseudomonas* que porta adhesinas reconocidas por receptores en células epiteliales de pulmón. Las células bacterianas muertas derivadas de bacterias *Lactobacilli*, que portan adhesinas específicas de las células epiteliales de las vías urinarias y la vejiga, podrían ser muy adecuadas para administración intrauretral de un fármaco a un cáncer en las vías urinarias o en la vejiga.

En una realización, el método de administración es un método de administración de ácido nucleico terapéutico que comprende poner en contacto las células bacterianas muertas que contienen un plásmido comprendido por una secuencia de ácido nucleico con células mamíferas que son fagocitosis- o endocitosis-competentes, de modo tal que las células bacterianas muertas sean fagocitadas por las células mamíferas. El plásmido preferiblemente codifica un producto de expresión terapéutico. Después de que las células bacterianas muertas entran en contacto con las células mamíferas, estas últimas producen un producto de expresión de la secuencia de ácido nucleico terapéutico. El método de administración del ácido nucleico terapéutico puede ser *in vitro* o *in vivo*.

En otra realización, el método de administración es un método de administración de fármacos que comprende poner en contacto las células bacterianas muertas que contienen un fármaco con las células mamíferas que son fagocitosis o endocitosis-competentes, de modo tal que las células bacterianas muertas sean fagocitadas por las células mamíferas. El fármaco se libera luego al citoplasma de las células mamíferas. Alternativamente, las células bacterianas muertas pueden contener un plásmido que codifica un fármaco, en cuyo caso el plásmido opcionalmente comprende un elemento regulador y/o un elemento indicador. El método de administración del ácido nucleico terapéutico puede ser *in vitro* o *in vivo*.

En otra realización, el método de administración es un método de administración de un ácido nucleico funcional que comprende poner en contacto una célula bacteriana muerta que contiene o bien una molécula de ácido nucleico funcional o un plásmido que codifica una molécula de ácido nucleico funcional con células mamíferas que son fagocitosis - o endocitosis-competentes, de modo tal que las células bacterianas muertas sean fagocitadas por las células mamíferas. El ácido nucleico funcional o el plásmido es liberado entonces a la célula mamífera. En caso de que la célula bacteriana muerta contenga un plásmido que codifique una molécula de ácido nucleico funcional, el plásmido opcionalmente contendrá un elemento regulador y/o un elemento indicador y la célula mamífera preferiblemente expresará el ácido nucleico funcional. El método de administración del ácido nucleico funcional puede ser *in vitro* o *in vivo*.

Por lo tanto, en un aspecto, un método para administrar un ácido nucleico funcional implica el uso de células bacterianas muertas, que comprende ácido nucleico funcional libre de plásmido. En este sentido, los ácidos nucleicos funcionales se empaquetan directamente en las células bacterianas muertas, pasando a través de la membrana intacta de la célula bacteriana sin usar constructos de expresión basados en plásmidos ni máquinas de expresión de una célula hospedante. En una realización, por lo tanto, un método para administrar el ácido nucleico funcional comprende (a) proveer una pluralidad de células bacterianas muertas intactas en un vehículo farmacéuticamente aceptable, en donde cada célula bacteriana de la pluralidad abarca un ácido nucleico funcional libre de plásmido y (b) poner las células bacterianas intactas de la pluralidad en contacto con células mamíferas, de modo tal que las células mamíferas fagociten a las células bacterianas muertas de la pluralidad, mediante lo cual el ácido nucleico funcional es liberado al citoplasma de las células diana.

El calificador "libre de plásmido" indica la ausencia de un constructo, tal como un plásmido o un vector vírico, para expresión *in situ* de un ARN regulador.

Direccionamiento de células bacterianas muertas hacia células mamíferas específicas

En otro aspecto, se describe la administración dirigida mediada que emplea un ligando biespecífico. El ligando pone en contacto una célula bacteriana muerta con una célula mamífera diana, de modo tal que la célula mamífera fagocita a la célula bacteriana muerta, incluida la carga de la célula bacteriana muerta.

En una realización, el método de administración dirigida es un método de administración de un ácido nucleico terapéutico que comprende poner en contacto ligandos biespecíficos con células bacterianas muertas que contienen una secuencia de ácido nucleico terapéutico y células mamíferas no fagocíticas. Los ligandos biespecíficos causan que las células bacterianas intactas se unan a las células mamíferas, y que las células bacterianas muertas sean fagocitadas por las células mamíferas. Las células mamíferas pueden luego producir un producto de expresión del ácido nucleico terapéutico.

La eficiencia de la administración del ácido nucleico se refiere al número de copias de ADN plasmídico que portan las células bacterianas muertas. Se sabe que un cuello de botella de administración de ácido nucleico es que >99% del ADN internalizado es degradado en el endosoma o lisosoma, sin alcanzar el citoplasma de la célula diana. Como partículas no vivas, se espera que las células bacterianas muertas carezcan de funciones desestabilizantes o perturbadoras de la membrana endo-lisosómica de las células diana y es probable que posean mecanismos sofisticados para permitir que el ADN internalizado escape de la membrana endo-lisosómica. De conformidad con la presente invención, por lo tanto, se prefieren las células bacterianas muertas que portan por lo menos 70 a 100 copias de ADN plasmídico. Los inventores han utilizado dichas células bacterianas muertas para administración exitosa de ácidos nucleicos. El resultado exitoso sugiere que incluso si la mayoría del ADN plasmídico se degrada en las vacuolas endo-lisosómicas, es posible agobiar el sistema y hacer que cierto ADN escape intacto hacia el citoplasma de las células mamíferas.

En otra realización, el método de administración dirigida es un método de administración de fármacos que comprende poner en contacto en puente ligandos biespecíficos con células bacterianas muertas que contienen una

molécula del fármaco y células mamíferas no fagocíticas. Los ligandos biespecíficos hacen que las células bacterianas muertas se unan a las células mamíferas, y que las células bacterianas muertas sean fagocitadas por las células mamíferas. La molécula del fármaco se libera luego en el citoplasma de las células mamíferas.

5 Los inventores han descubierto que una concentración importante del fármaco portada por células bacterianas muertas dirigidas a ligandos biespecíficos que escapa de la membrana endo-lisosómica ingresa en el citoplasma de las células mamíferas. A su vez, las células bacterianas muertas son altamente versátiles en su capacidad de empaquetar una gama de fármacos diferentes, p. ej., hidrófilos, hidrófobos y anfifílicos, tales como doxorubicina, paclitaxel, cisplatino, carboplatino, 5-fluorouracilo, irinotecán. Todos estos fármacos son fácilmente empaquetados en células bacterianas muertas en concentraciones terapéuticamente significativas.

10 En otra realización, el método de administración dirigida es un método de administración de ácido nucleico funcional que comprende poner en contacto ligandos biespecíficos con (a) células bacterianas muertas que contienen una molécula de ácido nucleico funcional o un plásmido comprendido por un segmento que codifica una molécula de ácido nucleico funcional y (b) células mamíferas diana. Los ligandos biespecíficos causan que las células bacterianas muertas se unan a las células mamíferas, y que las células bacterianas muertas sean fagocitadas por las células mamíferas. Una vez que la célula bacteriana muerta queda fagocitada, la molécula de ácido nucleico funcional es liberada al citoplasma de la célula diana o expresada por la célula diana.

20 Estos métodos de administración dirigida se pueden llevar a cabo *in vivo* o *in vitro*, o tanto *in vivo* como *in vitro*. El contacto entre un ligando biespecífico, la célula bacteriana muerta y la célula mamífera puede ocurrir en una serie de formas diferentes. Para administración *in vivo*, es preferible administrar una célula bacteriana muerta que ya tenga el ligando biespecífico unido a ella. Por lo tanto, la célula bacteriana muerta, el ligando y la célula diana se ponen en contacto cuando la célula bacteriana muerta dirigida al ligando biespecífico llega a la célula diana *in vivo*. Alternativamente, el ligando biespecífico y la célula bacteriana muerta se pueden administrar por separado *in vivo*.

25 El contacto entre los ligandos biespecíficos, las células bacterianas muertas y las células mamíferas también puede ocurrir durante una o más incubaciones *in vitro*. En una realización, los tres elementos se incuban juntos a la vez. Alternativamente, se pueden llevar a cabo incubaciones en etapas. En un ejemplo de un planteamiento en etapas, las células bacterianas muertas y los ligandos bi-específicos se incuban primero juntos para formar las células bacterianas muertas dirigidas al ligando biespecífico, que luego se incuban con las células diana. En otro ejemplo, los ligandos biespecíficos se incuban primero con células diana, seguidos de incubación con células bacterianas muertas. Una combinación de una o más incubaciones *in vitro* y administraciones *in vivo* también pueden poner en contacto ligandos biespecíficos, células bacterianas muertas y células diana mamíferas.

30 Los inventores descubrieron que el planteamiento de administración dirigida es ampliamente aplicable a una gama de células mamíferas, incluidas células que normalmente son resistentes a adhesión específica y endocitosis de células bacterianas muertas. Por ejemplo, los ligandos de anticuerpos biespecíficos con especificidad anti-O-polisacárido en una rama y especificidad hacia el receptor anti-HER2, receptor anti-EGF o receptor anti-andrógenos en la otra rama une de manera eficiente células bacterianas muertas con los receptores respectivos en una gama de células no fagocíticas diana. Estas células incluyen células de cáncer de pulmón, ovario, cerebro, mama, próstata y piel. Asimismo, la unión eficiente precede a la endocitosis rápida de las células bacterianas muertas por cada una de las células no fagocíticas.

40 Las células diana de la invención pueden incluir cualquier célula en la cual se pueda introducir un ácido nucleico terapéutico, fármaco o ácido nucleico funcional. Las células diana deseables se caracterizan por expresión de un receptor de la superficie celular que, tras la unión de un ligando, facilita la endocitosis. Las células diana preferidas son no fagocíticas, lo que significa que las células no son fagocitos profesionales, tales como los macrófagos, las células dendríticas y los linfocitos agresores naturales (NK). Las células diana preferidas son también mamíferas.

45 Los métodos de administración utilizados en la invención se pueden emplear con el propósito de tratar afecciones. Los términos "tratamiento", "tratar" y similares hacen referencia a obtener un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado. El efecto puede ser profiláctico en términos de prevenir completa o parcialmente una enfermedad o su síntoma y/o puede ser terapéutico en términos de una estabilización parcial o completa o cura de una enfermedad y/o efecto adverso atribuible a la enfermedad. "Tratamiento" cubre cualquier tratamiento de una enfermedad en un mamífero, particularmente un ser humano, e incluye: (a) prevenir que ocurra la enfermedad o el síntoma en un sujeto que puede estar predispuesto a la enfermedad o el síntoma, pero que todavía no ha sido diagnosticado por padecerlo; (b) inhibir el síntoma de la enfermedad, es decir, detener su desarrollo; o (c) aliviar el síntoma de la enfermedad, es decir, causar la regresión de la enfermedad o el síntoma.

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

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

contacto la célula bacteriana muerta con una célula mamífera diana, de modo tal que la célula mamífera fagocite a la célula bacteriana muerta, y (c) administrar un fármaco a la célula mamífera diana. Preferiblemente, la etapa (c) se lleva a cabo después de las etapas (a) y (b), para permitir que el ácido nucleico funcional disminuya la resistencia al fármaco antes de la administración del fármaco. La administración del fármaco y la introducción del ácido nucleico funcional pueden ocurrir de forma consecutiva, en cualquier orden, o en forma simultánea.

5

Los fármacos pueden administrarse por cualquier método. Por ejemplo, los fármacos pueden administrarse por vía oral, parenteral (incluidas las vías subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal y por infusión), tópica, transdérmica o por inhalación. El modo de administración y la dosis adecuados de cada fármaco podrán ser fácilmente determinados por el experto en la técnica médica.

10 Si bien la administración del fármaco puede ocurrir por cualquier medio convencional, se prefiere la administración mediante células bacterianas muertas. En este sentido, los inventores han descubierto que las mismas células mamíferas pueden ser re-transfectadas exitosamente por células bacterianas muertas intactas que son empaquetadas con diferentes cargas. Por ejemplo, las células bacterianas empaquetadas con plásmido que codifican siRNA pueden transfectar una célula mamífera, después de lo cual las bacterias muertas empaquetadas con fármaco pueden administrarse a la misma célula mamífera. Este descubrimiento fue sorprendente, e indica que los procesos intracelulares asociados con la ruptura de células bacterianas muertas, la liberación endosómica de la carga a dianas intracelulares permanece totalmente funcional después de la primera tanda de transfección y administración de carga.

15

20 El fármaco puede empaquetarse en una célula bacteriana muerta separada del ácido nucleico funcional o plásmido que codifica el ácido nucleico funcional.

20

Alternativamente, el fármaco puede empaquetarse en la misma célula bacteriana muerta como la molécula de ácido nucleico funcional o el plásmido que codifica la molécula de ácido nucleico funcional. Ciertos fármacos pueden interactuar con ácidos nucleicos e impedir el empaquetado conjunto de fármaco y ácido nucleico en la misma célula bacteriana muerta. Por ejemplo, se sabe que la doxorubicina interactúa con el ADN.

25 Empaquetado de ácido nucleico funcional en células bacterianas muertas

25

El ácido nucleico funcional puede empaquetarse directamente en células bacterianas muertas intactas. El proceso sorteas las etapas previamente requeridas de, por ejemplo, clonar ácidos nucleicos que codifican ARN regulador en plásmidos de expresión, transformando bacterias madre que producen minicélulas con los plásmidos y generando minicélulas recombinantes. En cambio, el ácido nucleico funcional libre de plásmido puede empaquetarse directamente en las células bacterianas muertas co-incubando una pluralidad de células bacterianas muertas intactas con ácido nucleico funcional en un tampón.

30

En algunas realizaciones, la co-incubación puede implicar la agitación moderada, mientras que en otras, la co-incubación es estática. Una co-incubación de aproximadamente una hora es suficiente, pero periodos más cortos, tales como aproximadamente media hora, también pueden ser eficaces. En una realización, el tampón comprende disolución salina tamponada, por ejemplo una disolución tamponada con fosfato 1X. La disolución salina tamponada puede ser en la forma de gelatina. En otra realización, la co-incubación se lleva a cabo a una temperatura de aproximadamente 4°C a aproximadamente 37°C; aproximadamente 20°C a aproximadamente 30°C; aproximadamente 25°C; o aproximadamente 37°C. En otros aspectos, la co-incubación puede comprender aproximadamente 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} , 10^{12} o 10^{13} células bacterianas muertas. Los parámetros específicos de temperatura, tiempo, tampón, concentración de minicélulas, etc. se pueden optimizar para una combinación particular de condiciones.

35

40

Carga de bacterias muertas con fármacos

Preferiblemente, las células bacterianas muertas utilizadas en la invención contienen una cantidad suficiente de fármaco para ejercer el efecto fisiológico o farmacológico del fármaco en una célula diana. Además, preferiblemente los fármacos contenidos dentro de las células bacterianas muertas son heterólogos, o extraños a las células bacterianas muertas, lo que significa que las células bacterianas muertas normalmente no producen el fármaco.

45

Tanto los fármacos hidrófilos como los hidrófobos pueden ser empaquetados en células bacterianas muertas creando un gradiente de concentración del fármaco entre un medio extracelular que contiene células bacterianas muertas y el citoplasma de células bacterianas muertas. Cuando el medio extracelular contiene una concentración mayor que el citoplasma de las células bacterianas muertas, el fármaco naturalmente se mueve hacia este gradiente de concentración, hacia el citoplasma de las células bacterianas muertas. Cuando el gradiente de concentración se revierte, no obstante, el fármaco no se mueve de las células bacterianas muertas.

50

Para cargar células bacterianas muertas con fármacos que normalmente no son solubles en agua, los fármacos inicialmente pueden disolverse en un disolvente apropiado. Por ejemplo, el Paclitaxel puede disolverse en una mezcla 1:1 de etanol y cremophore EL (aceite de ricino polietoxilado), seguido de dilución en PBS para lograr una disolución de Paclitaxel parcialmente diluida en medio acuoso y que porta cantidades mínimas del disolvente orgánico para asegurar que el fármaco permanezca en disolución. Las células bacterianas muertas pueden

55

incubarse en este medio final para la carga del fármaco. Por lo tanto, los inventores descubrieron que incluso los fármacos hidrófobos pueden difundirse en el citoplasma de células bacterianas muertas para lograr una carga del fármaco citoplásmica terapéuticamente significativa. Esto es inesperado porque la membrana de la célula bacteriana muerta está compuesta por una bicapa hidrófoba, que se esperaría que evitara la difusión de las moléculas hidrófobas en el citoplasma.

Otro método para cargar células bacterianas muertas con un fármaco implica cultivar una célula bacteriana madre recombinante bajo condiciones en las que la célula bacteriana madre transcribe y traduce un ácido nucleico que codifica el fármaco, de modo tal que el fármaco es liberado al citoplasma de la célula bacteriana madre. Por ejemplo, un agrupamiento de genes que codifica la ruta biosintética celular de un fármaco deseado puede clonarse y transferirse a una cepa bacteriana madre capaz de producir células bacterianas muertas. La transcripción y traducción genética del agrupamiento de genes resulta en la biosíntesis del fármaco dentro del citoplasma de las células bacterianas madre, rellorando el citoplasma bacteriano con el fármaco. Cuando la célula bacteriana madre se divide y forma células bacterianas muertas de prole, las células bacterianas muertas también contienen el fármaco en su citoplasma. Las células bacterianas muertas pre-empaquetadas se pueden purificar mediante cualquier procedimiento de purificación de células bacterianas conocido en la técnica y anteriormente descrito.

De modo similar, otro método de carga de células bacterianas muertas con un fármaco implica cultivar una célula bacteriana muerta recombinante que contenga un plásmido de expresión que codifique el fármaco bajo condiciones tales que el gen que codifica el fármaco se transcriba y traduzca dentro de la célula bacteriana muerta.

Pureza de las composiciones

Las células bacterianas muertas utilizadas en la invención son sustancialmente libres de células bacterianas madre contaminantes, es decir, células bacterianas vivas. Por lo tanto, las composiciones de la invención que contienen células bacterianas muertas preferiblemente contienen menos de aproximadamente 1 célula bacteriana madre contaminante por 10^7 células bacterianas muertas, más preferiblemente contienen menos de aproximadamente 1 célula bacteriana madre contaminante por 10^8 células bacterianas muertas, incluso más preferiblemente contienen menos de aproximadamente 1 célula bacteriana madre contaminante por 10^9 células bacterianas muertas, incluso más preferiblemente contienen menos de aproximadamente 1 célula bacteriana madre contaminante por 10^{10} células bacterianas muertas y lo más preferiblemente contienen menos de aproximadamente 1 célula bacteriana madre contaminante por 10^{11} células bacterianas muertas.

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

Las células bacterianas en cultivo se pueden inactivar usando una serie de procedimientos diferentes que incluyen (a) tratamiento con un antibiótico al que es sensible la cepa bacteriana, (b) tratamiento con calor debajo del nivel al cual ocurre la coagulación de la proteína, y (c) tratamiento con disolventes como etanol a una concentración que no resulte en la pérdida de integridad de las células bacterianas y cierre de canales de proteínas en la membrana bacteriana. El proceso de inactivación de la célula bacteriana se conoce en la técnica de fabricación de vacunas bacterianas muertas. Preferiblemente, el proceso de inactivación de células bacterianas no implica la desnaturalización extensa de la configuración espacial de las moléculas; es decir, el proceso preferiblemente conserva la estructura tridimensional de las macromoléculas de las células bacterianas, tal como proteínas, polisacáridos y lípidos. Los expertos en la técnica conocen otros procedimientos que se pueden emplear para obtener la preparación bacteriana muerta definida anteriormente.

La ausencia de desnaturalización de la membrana en una preparación bacteriana muerta se puede verificar por cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, el ADN plasmídico se puede extraer de células bacterianas muertas recombinantes y secuenciarse para determinar la integridad del ADN. El contenido de plásmido se puede determinar por PCR en tiempo real y compararse con el contenido de plásmido en el mismo número de células bacterianas recombinantes. Si la integridad de la membrana no se conservó en el proceso de inactivación, entonces se esperaría que ocurra la pérdida de plásmido. Además, si un proceso de inactivación dañó el plásmido recombinante, entonces se observarían aberraciones en la secuencia de ADN. Se puede realizar también una prueba en donde el mismo número de células bacterianas vivas e muertas se verifique para la capacidad de empaquetar un fármaco terapéutico.

Las impurezas tales como medios, tampones, sedimentos celulares, ampollas de membrana, ácidos nucleicos libres y endotoxina libre se pueden eliminar de una preparación bacteriana muerta por filtración, tal como filtración a través de una filtración de flujo cruzado de $0,2 \mu\text{m}$. Se prefiere un tamaño de poro de filtro de aproximadamente $0,2 \mu\text{m}$ porque los contaminantes en general son más pequeños que $0,2 \mu\text{m}$. Por lo tanto, el uso de dicho tamaño de poro del filtro permite que los contaminantes sean filtrados, y que las células bacterianas muertas intactas sean retenidas. La filtración puede ser filtración atenuada o filtración de flujo cruzado. La filtración de flujo cruzado tiene la

ventaja de menos taponamiento del filtro. Además, es preferible realizar etapas de lavado con intercambio de tampón, que también pueden emplear un tamaño de poro del filtro de aproximadamente 0,2 µm.

Rutas de administración y forma de las composiciones

5 Las composiciones para uso de la invención se pueden administrar mediante varias rutas y varios sitios en el cuerpo de un mamífero, para lograr el efecto(s) deseado, ya sea local o sistémicamente. La administración se puede lograr, por ejemplo, por administración oral, por aplicación de la formulación a 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 diana. Por ejemplo, las células de fibrosis quística pueden dirigirse de manera eficiente por administración inhalada de las células bacterianas muertas dirigidas. De manera similar, las metástasis tumorales pueden ser más eficientemente tratadas mediante administración intravenosa de células bacterianas muertas dirigidas. El cáncer de ovario primario se puede tratar mediante administración intraperitoneal de células bacterianas muertas diana.

15 Las composiciones se pueden presentar en forma de dosificación unitaria, p. ej., en ampollas o viales, o en envases de múltiples dosis con o sin agregado de conservantes. La composición puede ser una disolución, una suspensión o una emulsión en vehículos oleosos o acuosos, y puede contener agente de formulación tales como agentes de suspensión, estabilización y/o dispersión. Una disolución adecuada es isotónica con la sangre del receptor y se ilustra mediante disolución salina, disolución de Ringer y disolución de dextrosa. Alternativamente, las composiciones pueden ser en forma de polvo liofilizado, para reconstitución con un vehículo adecuado, p. ej., disolución salina estéril, agua apirógena o disolución salina fisiológica. Las composiciones pueden además estar en la forma de una preparación de depósito. Dichas composiciones de larga duración pueden administrarse por implantación (por ejemplo, subcutánea o intramuscular) o por inyección intramuscular.

20 Con respecto a la administración de las composiciones de la invención, los términos "individuo", "sujeto", "hospedante" y "paciente", utilizados de manera intercambiable en este documento, se refieren a cualquier sujeto mamífero para el cual se desea un diagnóstico, tratamiento o terapia. En una realización preferida, el individuo, sujeto, hospedante o paciente es un ser humano. Se pueden incluir otros sujetos, pero no se limitan a, ganado, caballos, perros gatos, cobayas, conejos, ratas, primates y ratones.

Esquemas de administración

30 En general, las composiciones descritas en este documento se pueden usar en dosis apropiadas definidas por pruebas de rutina, para obtener un efecto fisiológico óptimo y a la vez minimizar cualquier toxicidad potencial. El esquema de dosificación puede seleccionarse de acuerdo con una diversidad de factores que incluyen la edad, el peso, el sexo, el estado médico del paciente; la gravedad de la afección que se ha de tratar, la ruta de administración y el funcionamiento renal y hepático del paciente.

35 La precisión óptima para lograr concentraciones de célula bacteriana muerta y terapéuticas dentro del intervalo que produce eficacia máxima con efectos colaterales mínimos puede requerir un esquema basado en la cinética de la célula bacteriana muerta y la disponibilidad terapéutica para sitios diana y células diana. La distribución, equilibrio y eliminación de una célula bacteriana muerta o terapéutica se pueden considerar al determinar la concentración óptima para un esquema de tratamiento. Las dosis de las células bacterianas muertas y terapéuticas se pueden ajustar cuando se emplean en combinación para lograr efectos deseados.

40 Asimismo, la administración de la dosis de las composiciones se puede optimizar utilizando un sistema de modelado de farmacocinética/farmacodinamia. Por ejemplo, se pueden escoger uno o más esquemas de dosificación y usarse un modelo de farmacocinética/farmacodinamia para determinar el perfil de farmacocinética/farmacodinamia de uno o más esquemas de dosificación. Luego, se puede seleccionar uno de los esquemas de dosificación para administración que logre la respuesta de farmacocinética/farmacodinamia deseada en función del perfil de farmacocinética/farmacodinamia particular. Véase, p. ej., el documento WO 00/67776.

45 Concretamente, las composiciones se pueden administrar por lo menos una vez por semana durante el curso de varias semanas. En una realización, las composiciones se administran por lo menos una vez por semana durante varias semanas a varios meses.

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

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

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

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

5 En el método en el que las células bacterianas muertas se administran antes de un fármaco, la administración del fármaco puede ocurrir en cualquier momento de varios minutos a varias horas después de la administración de las células bacterianas muertas. El fármaco puede alternativamente administrarse en cualquier momento de varias horas a varios días, posiblemente varias semanas a varios meses después de las células bacterianas muertas.

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

15 En otra realización, la célula bacteriana muerta se administra después del fármaco. La administración de la célula bacteriana muerta puede ocurrir en cualquier momento de varios minutos a varias horas después de la administración del fármaco. La célula bacteriana muerta puede alternativamente administrarse en cualquier momento de varias horas a varios días, posiblemente varias semanas a varios meses después del fármaco.

Ejemplos

Ejemplo 1. Las bacterias muertas se empaquetan exitosamente con el fármaco quimioterapéutico doxorubicina.

25 [0182] Se cultivó la cepa de *Salmonella typhimurium* durante una noche en caldo de soja tripticasa (TSB). La cepa luego se subcultivó (1:100) en 100 ml de TSB y se desarrolló hasta la fase logarítmica temprana ($OD_{600} = 0,406$). El recuento bacteriano se enumeró disponiendo en placas de agar TSB diluciones en serie y realizando un recuento de colonias después de la incubación durante toda la noche. El resultado demostró que el cultivo portaba $\sim 5 \times 10^8$ bacterias/ml. Para inactivar las células bacterianas, se incubaron 10 ml de cultivo durante 4 horas con 500 $\mu\text{g/ml}$ de gentamicina y 500 $\mu\text{g/ml}$ de cloranfenicol. Una muestra de 100 μl se dispuso en una placa de agar TSB para determinar que las células bacterianas habían sido muertas.

30 Las células bacterianas (1×10^9) se incubaron con 60 $\mu\text{g/ml}$ de doxorubicina durante 2 horas a 37°C en 1 ml 1 x BSG (gelatina y disolución salina tamponada). El exceso de fármaco se eliminó de las células bacterianas en seis etapas de lavado repetidas en donde las células se centrifugaron a 13.200 rpm durante cinco minutos seguidas de resuspensión en disolución de BSG fresca.

35 La doxorubicina se extrajo de las bacterias muertas después de cinco ciclos de agitar en vórtex y de sonicación en presencia de HCl-alcohol isopropílico 97 mM (HC1- IP A). Las muestras luego se diluyeron en un volumen equivalente de agua y se repitieron los cinco ciclos. Después de centrifugar a 13.200 rpm durante 5 min hasta obtener sedimentos, los sobrenadantes se recogieron para cuantificación del fármaco por HPLC. La fase móvil comprendía un amonio 100 mM + 0,05% trietilamina (pH, 3.5): MQ:MeCN (acetonitrilo) en una relación de 28:42,30. La fase estacionaria comprendía una columna Lichrosphere RP 18 (MERCK) a 40°C. La detección fue por excitación a 480 nm y emisión a 550 nm, usando un sistema Shimadzu 10AVP que comprendía un automuestreador, desgasificador de disolvente, bomba cuaternaria, calentador de columna (40°C) y detector de fluorescencia, versión de ejecución 7.2 SPI rev B software (Shimadzu Corporation).

El área debajo del pico se interpoló en una curva estándar para doxorubicina y los resultados demostraron que se empaquetaron $\sim 2 \mu\text{g}$ de doxorubicina en 1×10^9 células bacterianas muertas.

45 Ejemplo 2. Regresión/estabilización de tumores después de la administración intravenosa de células bacterianas muertas empaquetadas con doxorubicina dirigidas a EGFR en ratones lampiños que portan xenoinjertos de cáncer de mama humanos.

50 Este ejemplo demuestra que las células muertas intactas empaquetadas con doxorubicina y dirigidas al ligando pueden efectuar la regresión de xenoinjertos de tumores de células de cáncer de mama humanos establecidos en ratones lampiños hembra de 6 semanas de vida.

Como se ha descrito en el Ejemplo 1, se empaquetaron células muertas de *S. typhimurium* con el fármaco quimioterapéutico doxorubicina y se purificaron de endotoxina libre por centrifugación repetida y eliminación del sobrenadante.

Un anticuerpo biespecífico que porta especificidades anti-LPS y EGFR antihumanas se construyó de la siguiente manera. Se seleccionó un anticuerpo monoclonal anti-EGFR debido a que las células de xenoinjertos eran células de cáncer de mama humanas MDA-MB-468 que se sabe sobre-expresan el receptor de EGF en la superficie celular. Se construyó un BsAb con especificidades anti-S. Typhimurium O-antígeno y anti-EGFR, como se describe en el documento PCT/US2004/041010. En síntesis, el anticuerpo biespecífico (BsAb) se construyó uniendo un anticuerpo monoclonal anti-5. Typhimurium O-antígeno (MAb) (IgG1; BiotDesign) y un MAb dirigido contra un receptor de la superficie de células diana que es EGFR anti-humano de ratón (IgG2a; Oncogen). Los dos anticuerpos se reticularon mediante sus regiones Fc usando proteína recombinante purificada A/G (Pierce Biotechnology). En síntesis, la proteína A/G (100 ng/ml de concentración final) se añadió a 0,5 ml de una disolución premezclada que contenía 20 µg/ml de cada uno de anti-S. Typhimurium O-antígeno y EGFR MAb anti-humanos, y se incubó durante la noche a 4°C. El exceso de anticuerpos se eliminó por incubación con esferas magnéticas conjugadas a proteína G y mezclando moderadamente a temperatura ambiente durante 40 min. Después de la separación magnética de las esferas, el complejo de proteína A/G-BsAb se incubó con 10⁹ células bacterianas muertas empaquetadas con dox durante 1 h a temperatura ambiente para recubrir las con anticuerpo mediante la unión de la rama Fab específica de O-antígeno a LPS superficial.

Los ratones utilizados en este ejemplo se adquirieron de Animal Resources Centre, Perth, WA, Australia, y todos los experimentos con animales se realizaron de conformidad con la guía de cuidado y uso de animales de laboratorio, y con la aprobación del Comité de Ética Animal (*Animal Ethics Committee*). Los experimentos se realizaron en el establecimiento para animales pequeños acreditado por NSW Agriculture en EnGeneIC Pty Ltd (Sídney, NSW, Australia). Se desarrollaron células de adenocarcinoma de mama humanas (MDA-MB-468, ATCC; células epiteliales mamarias humanas; no fagocíticas) en cultivos de tejido hasta confluencia total en matraces T-75 en medio RPMI 1640 enriquecido con suero de ternero bovino al 5% (GIBCO-BRL Life Technologies, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EE. UU.) y glutamina (Invitrogen) en una atmósfera humidificada de 95% aire y 5% CO₂ a 37°C. Se inyectaron subcutáneamente 1 x 10⁶ células en 50 µl de medio libre de suero junto con 50 µl de matrigel reducido con factor de crecimiento (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, EE. UU.) entre los omóplatos de cada ratón, usando una aguja de calibre 23. Los tumores se midieron dos veces por semana usando un calibrador digital electrónico (Mitutoyo, Japón, hasta 0,001 de precisión) y se calculó el volumen medio del tumor usando la fórmula, longitud (mm) x ancho² (mm) X 0,5 = volumen (mm³). Dieciséis días post-implante, los tumores alcanzaron volúmenes entre 40 mm³ y 70 mm³, y los ratones fueron aleatorizados a cuatro grupos distintos de cinco por grupo.

El experimento se diseñó de la siguiente manera. El grupo 1 (control) recibió una dosis intravenosa de 100 µl de disolución salina fisiológica estéril. El grupo 2 (control) recibió una dosis intravenosa de doxorubicina libre (7 mg/kg del peso corporal del ratón). El grupo 3 (control) recibió 1 x 10⁸/dosis de bacterias muertas empaquetadas con dox (*S. typhimurium*_{Dox} muerta). El grupo 4 (experimental) recibió 1 x 10⁸/dosis de bacterias muertas empaquetadas con dox dirigidas a EGFR (^{EGFR}*S. typhimurium*_{Dox} muerta). Todas las dosis se administraron por vía intravenosa, y las dosis se administraron en los días 21, 28 y 34.

Los resultados demostraron (Figura 1) que ^{EGFR}*S. typhimurium* muertas fueron altamente eficaces en lograr la regresión/estabilización, en comparación con los tres controles.

Ejemplo 3. Efectos antitumorales después de la administración intravenosa de células bacterianas muertas empaquetadas con paclitaxel dirigidas a EGFR o empaquetadas con siRNA-proteína del huso kinesina en ratones lampiños que portan xenoinjertos de cáncer de colon humanos

Este ejemplo considera si las células bacterianas muertas intactas empaquetadas con paclitaxel o siRNA pueden inhibir el crecimiento de tumores de células de cáncer de colon humano *in vivo*.

Usando los métodos descritos en el Ejemplo, se empaquetaron células *S. typhimurium* muertas con el fármaco quimioterapéutico paclitaxel y se purificaron de endotoxina libre por centrifugación repetida y eliminando el sobrenadante.

Por separado, se empaquetó siRNA contra la proteína del huso kinesina (KSP) en la cepa de *S. Typhimurium* muerta. KSP, también denominada kinesina-5 o Eg5, es una proteína motora de microtúbulos esencial para la formación de husos bipolares y la correcta segregación de cromátidas hermanas durante la mitosis (Enos y Morris, 1990; Blangy et al., 1995; Dagenbach y Endow, 2004). La inhibición de KSP causa la formación de husos mitóticos monopolares, activa el punto de control del ensamblaje del huso, y detiene las células en la mitosis, lo que provoca la muerte celular subsiguiente (Blangy et al., 1995; Mayer et al., 1999; Kapoor et al., 2000; Tao et al., 2005). Las secuencias de oligonucleótidos bicatenarias KSP-siRNA (cadena sentido; 5'-AAC TGG ATC GTA AGA AGG CAG-3') se sintetizaron y empaquetaron en la cepa de *S. Typhimurium* muerta incubando 1 x 10¹⁰ bacterias con 1 µm de siRNA-KSP. La co-incubación se llevó a cabo en disolución tamponada con fosfato 1 x (PBS) (Gibco) durante 12 horas a 37°C mezclando moderadamente. Después de empaquetar las bacterias se sedimentaron y lavaron dos veces con 1 x PBS por centrifugación durante 10 minutos a 16.200 x g. Las células bacterianas se lavaron dos veces en 1 x PBS para eliminar el exceso de siRNA-KSP no empaquetado.

Se construyó un anticuerpo biespecífico que porta especificidades anti-LPS y EGFR antihumanas como se ha descrito en el Ejemplo 2.

Los ratones utilizados en este ejemplo se adquirieron de Animal Resources Centre, Perth, WA, Australia, y todos los experimentos en animales se realizaron de conformidad con la guía de cuidado y uso de los laboratorios animales, y con la aprobación del Comité de Ética Animal. Los experimentos se realizaron en un establecimiento para animales pequeños acreditado por NSW Agriculture en EnGenelC Pty Ltd (Sidney, NSW, Australia). Se desarrollaron células de cáncer de colon humanas (HCT116, ATCC) en cultivo de tejido hasta una confluencia total en matraces T-75 en medio RPMI 1640 enriquecido con 5% suero de ternero bovino (GIBCO-BRL Life Technologies, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EE. UU.) y glutamina (Invitrogen) en una atmósfera humidificada de 95% aire y 5% CO₂ a 37°C. Se inyectaron 1 x 10⁶ células en 50 ul de medio libre de suero junto con 50 ul de matrigel reducido con factor de crecimiento (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, EE. UU.) subcutáneamente entre los omóplatos en ratones Balb/c *nu/nu* (*n* = 8 ratones por grupo) usando una aguja de calibre 23. Los tumores se midieron dos veces por semana usando un calibrador digital electrónico (Mitutoyo, Japón, hasta 0,001 de precisión), y se calculó el volumen del tumor promedio utilizando la fórmula, longitud (mm) x ancho² (mm) X 0,5 = volumen (mm³). Dieciséis días post-implante, los tumores alcanzaron volúmenes ~200 mm³, y los ratones se aleatorizaron a cuatro grupos distintos de ocho por grupo.

El experimento se diseñó de la siguiente manera. El grupo 1 (control) recibió una dosis intravenosa de 100 µl de disolución salina fisiológica estéril. El grupo 2 (control) bacterias de *S. typhimurium* muertas dirigidas a EGFR que no portaban ninguna carga terapéutica (G2; ^{EGFR}*S. typhimurium*). El grupo 3 (experimental) bacterias de *S. typhimurium* muertas dirigidas a EGFR empaquetadas con el fármaco quimioterapéutico paclitaxel (G3; ^{EGFR}*S. typhimurium*_{Paclitaxel}). El grupo 4 (experimental) bacterias *S. typhimurium* muertas dirigidas a EGFR empaquetadas con siRNA contra la proteína del huso kinesina (G4; ^{EGFR}*S. typhimurium*_{siRNA-KSP}). Los tratamientos se administraron tres veces por semana.

Los resultados demuestran (Figura 2) que ambos tratamientos, es decir ^{EGFR}*S. typhimurium*_{Paclitaxel} muertas y ^{EGFR}*S. typhimurium*_{siRNA-KSP}, demostraron efectos antitumorales altamente significativos en comparación con los dos controles. Por lo tanto, los datos demuestran que las células bacterianas muertas intactas empaquetadas con paclitaxel o siRNA inhiben el crecimiento del tumor de cáncer de colon humano *in vivo*.

Ejemplo 4. Uso de tratamiento dual que comprende shRNA mediado por bacterias muertas dirigidas a receptores seguido por la administración de fármacos mediados por bacterias muertas dirigidas a receptores.

Para demostrar que las bacterias muertas dirigidas a los receptores pueden revertir la resistencia a los fármacos en células cancerosas *in vivo*, llevamos a cabo el siguiente estudio en ratones Balb/c *nu/nu*. Para células de xenoinjertos, utilizamos la línea celular de cáncer de colon humana Caco-2, que es altamente resistente a los fármacos quimioterapéuticos de primera línea para cáncer de colon, tales como irinotecán y 5-fluorouracil (5-FU).

Usando los métodos descritos en el Ejemplo 1, se empaquetaron bacterias muertas *S. typhimurium* con el fármaco quimioterapéutico irinotecán o 5-FU. El exceso de irinotecán o 5-FU no específicamente unido a la superficie exterior de las bacterias muertas se eliminó por centrifugación de las células bacterianas a 13.200 rpm durante 10 min, y las células lavadas se resuspendieron en PBS fresco 1 x. Esta etapa de lavado se repitió.

Las células de *S. typhimurium* muertas empaquetadas con irinotecán o 5-FU se dirigieron al EGFR mediante la unión de un anticuerpo biespecífico anti-O-polisacárido/anti-EGFR a la superficie celular bacteriana, como se describió en los ejemplos previos. Se seleccionó un anticuerpo monoclonal anti-EGFR porque se sabe que las células de xenoinjerto, Caco-2, sobre-expresan EGFR en la superficie celular (Nyati *et al.*, 2004). Las bacterias muertas empaquetadas con el fármaco dirigidas a EGFR se designaron ^{EGFR}*S. typhimurium*_{5-FU} y ^{EGFR}*S. typhimurium*_{Iriño}.

Se generó una cepa de *S. typhimurium* recombinante que porta un plásmido que codifica la secuencia anti- MDR1 shRNA de la siguiente manera. La secuencia MDR-1 shRNA utilizada en este estudio (5'-TCGAAAGAAACCAACTGTCAGTGTAgagtactgTACTGACAGTTGGTTTCTTTTTT-3') fue detectada por Wu *et al.*, 2003. La secuencia de shRNA se sintetizó y subclonó en el plásmido IMG-800 (Imgenex Corp., San Diego, CA, EE. UU.) de modo tal que la secuencia pudiese expresarse desde el promotor U6 del plásmido. El plásmido porta el origen pUC de replicación que permite altos números de copias de plásmido en las células bacterianas. El plásmido recombinante se secuenció para asegurar que la secuencia de shRNA fuese correcta y estuviese en el marco para expresión desde el promotor U6. El plásmido recombinante se transformó en *S. typhimurium*, y la cepa recombinante designada *S. typhimurium*_{shRNA-MDR1}. *S. typhimurium*_{shRNA-MDR1} dirigida a EGFR se construyó conectando el anticuerpo biespecífico anti-O-polisacárido/anti-EGFR a la superficie de las bacterias recombinantes para generar ^{EGFR}*S. typhimurium*_{shRNA-MDR1}.

Los diversos grupos de ratones (cinco ratones por grupo) recibieron los siguientes tratamientos: El grupo 1 (control) disolución salina estéril; el grupo 2 (control) ^{EGFR}*S. typhimurium*_{shRNA-MDR1}; el grupo 3 (control) bacterias muertas empaquetadas con 5-FU dirigidas a EGFR (^{EGFR}*S. typhimurium*_{5-FU}); el grupo 4 (experimental) ^{EGFR}*S. typhimurium*_{shRNA-MDR1} seguido de ^{EGFR}*S. typhimurium*_{5-FU}; el grupo 5 (control) bacterias muertas empaquetadas con Iriño dirigidas a EGFR (^{EGFR}*S. typhimurium*_{Iriño}); el grupo 6 (experimental) ^{EGFR}*S. typhimurium*_{shRNA-MDR1} seguido de ^{EGFR}*S. typhimurium*_{Iriño}; Los grupos 2 a 6 recibieron 1 x 10⁹ células bacterianas, y todos los tratamientos fueron por vía intravenosa.

Los resultados demostraron (Figura 3) que como se espera, las células Caco-2 permanecieron resistentes después de los tratamientos con ^{EGFR}S. typhimuriumirino, ^{EGFR}S. typhimurium_{5-FU} y ^{EGFR}S. typhimurium_{shRNA-MDR1}. Las células que recibieron tratamiento dual, es decir, ^{EGFR}S. typhimurium_{shRNA-MDR1} seguido de ^{EGFR}S. typhimuriumirino (ratones G6) o ^{EGFR}S. typhimurium_{5-FU} (ratones G4), demostraron reversión altamente significativa de resistencia a los fármacos y regresión de los tumores. Los datos demuestran que un protocolo de tratamiento dual, p. ej., administración de shRN mediada por bacterias muertas dirigidas a los receptores seguida por la administración del fármaco quimioterapéutico mediada por bacterias dirigidas al receptor, es altamente eficaz para revertir la resistencia a los fármacos en células mamíferas no fagocíticas.

Referencias

- 10 Akporiaye, E.T. & Hersh, E. Clinical aspects of intratumoral gene therapy. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 1: 443-453 (1999).
Ambudkar, et al., *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39: 361 (1999).
Batra RK, Wang-Johanning F, Wagner E, Garver RI Jr, Curiel DT. Receptor-mediated gene delivery employing lectin-binding specificity. *Gene Ther.* Julio de 1994;1(4):255-60.
- 15 Becker CM, Farnebo FA, Iordanescu I, Behonick DJ, Shih MC, Dunning P, Christofferson R, Mulligan RC, Taylor GA, Kuo CJ, Zetter BR. Gene therapy of prostate cancer with the soluble vascular endothelial growth factor receptor Flk1. *Cancer Biol Ther.* Sep-Oct de 2002;1(5):548-53.
- Bergey's Manual of Systematic Biototy, 2ª ed., Springer-Verlag, 2001.
- Blangy, A., Lane, H.A., d'Herin, P., Harper, M., Kress, M., Nigg, E.A. Phosphorylation by p34cdc2 regulates spindle association of human Eg5, a kinesin-related motor essential for bipolar spindle formation in vivo. *Cell* 83: 1159-1169 (1995).
- 20 Boucher, R.C., Pickles, R.J., Rideout, J.L., Pendergast, W. & Yerxa, B.R. Targeted gene transfer using G protein coupled receptors. *U.S. patent application*. US 2003/004123 A1. 2 Enero, 2003.
- Bullough, P.A., Hughson, F.M., Skehel, J.J., Wiley, D.C. Structure of influenza haemagglutinin at the pH of membrane fusion. *Nature* 371: 37-43 (1994).
- 25 Caplen, *Expert Opin. Biol. Ther.*, 3(4): 575-86 (2003).
Caplen y Mousses, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1002: 56-62 (2003).
Carter, P. Improving the efficacy of antibody-based cancer therapies. *Nat Rev Cancer.* Nov 2001;1(2):118-29.
Ciliberto et al., "Cell-specific expression of a transfected human alpha 1-antitrypsin gene," *Cell.* 41: 531 (1985).
- 30 Chen, L.M., Kaniga, K., Galan, J.E. Salmonella spp. are cytotoxic for cultured macrophages. *Mol. Microbiol.* 21: 1101-1115 (1996).
- Chen, D., Murphy, B., Sung, R., Bromberg, J.S. Adaptive and innate immune responses to gene transfer vectors: role of cytokines and chemokines in vector function. *Gene Ther.* 10: 991-998 (2003).
- Clark, P.R. & Hersh, E.M. Cationic lipid-mediated gene transfer: current concepts. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 1: 158-176 (1999).
- 35 Collins & Olive, *Biochem.* 2795-99 (1993).
- Curiel et al., "Long-term inhibition of clinical and laboratory human immunodeficiency virus strains in human T-cell lines containing an HIV-regulated diphtheria toxin A chain gene," *Hum. Gene Ther.* 4: 741 (1993).
- Dagenbach, E.M., y Endow, S.A. A new kinesin tree. *J. Cell Sci.* 117: 3-7 (2004).
- 40 Dang, L.H., Bettgowda, C., Huso, D.L., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. Combination bacteriolytic therapy for the treatment of experimental tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98: 15155-15160 (2001).
- de Haard, H. J. et al. A large non-immunized human Fab fragment phage library that permits rapid isolation and kinetic analysis of high affinity antibodies. *J. Biol. Chem.* 274,18218-18230 (1999).

- de Jong, G., Telenius, A., Vanderbyl, S., Meitz, A., Drayer, J. Efficient in-vitro transfer of a 60-Mb mammalian artificial chromosome into murine and hamster cells using cationic lipids and dendrimers. *Chromosome Res.* 9: 475-485 (2001).
- 5 Dinges et al., "HIV-regulated diphtheria toxin A chain gene confers long-term protection against HIV type 1 infection in the human promonocytic cell line U937," *Hum. Gene Ther.* 6: 1437 (1995).
- Dow, S.W., Fradkin, L.G., Liggitt, D.H., Willson, A.P., Heath, T.D., Potter, T.A. Lipid-DNA complexes induce potent activation of innate immune responses and antitumor activity when administered intravenously. *J. Immunol.* 163: 1552-1561 (1999).
- 10 Dramsi, S. & Cossart, P. Intracellular pathogens and the actin cytoskeleton. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 14: 137-166 (1998).
- Duan et al., *Mol. Cancer Therapeutics*, 3(7): 833-38 (2004).
- Dubel S, Breitling F, Kontermann R, Schmidt T, Skerra A, Little M. Bifunctional and multimeric complexes of streptavidin fused to single chain antibodies (scFv). *J. Immunol. Methods* (1995) 178, 201-209.
- Dunham, S.P. The application of nucleic acid vaccines in veterinary medicine, *Res. Vet. Sci.* 73: 9-16 (2002).
- 15 Duxbury et al., *J. Am. Coll. Surg.*, 198: 953-59 (2004).
- El Ouahabi, A., Thiry, M., Fuks, R., Ruyschaert, J. & Vandenbranden, M. The role of the endosome destabilizing activity in the gene transfer process mediated by cationic lipids. *FEBS Lett.* 414: 187-192 (1997).
- Enos, A. P., y Morris, N.R. Mutation of a gene that encodes a kinesin-like protein blocks nuclear division in *A. nidulans*. *Cell* 60: 1019-1027 (1990).
- 20 Essani, K. & Dales, S. Biogenesis of vaccinia: evidence for more than 100 polypeptides in the virion. *Virology* 95: 385-394 (1979).
- Farhood, H., Serbina, N. & Huang, L. The role of dioleoyl phosphatidylethanolamine in cationic liposome mediated gene transfer. *Biochim. Biophys. Acta* 1235: 289-295 (1995).
- 25 Fasbender, A., Marshall, J., Moninger, T.O., Grunst, T., Cheng, S. & Welsh, M.J. Effect of co-lipids in enhancing cationic lipid-mediated gene transfer in vitro and in vivo. *Gene Ther.* 4: 716-725 (1997).
- Feigner, P.L., Ringold, G.M. Cationic liposome-mediated transfection. *Nature* 337: 387-388 (1989).
- Ferrari, S., Griesenbach, U., Geddes, D.M., Alton, E. Immunological hurdles to lung gene therapy. *Clin Exp Immunol*, 132: 1-8 (2003).
- 30 Finlay, B.B. & Cossart, P. Exploitation of mammalian host cell functions by bacterial pathogens. *Science* 276: 718-25 (1997).
- Fox, M.E., Lemmon, M.J., Mauchline, M.L, et al. Anaerobic bacteria as a delivery system for cancer gene therapy: in vitro activation of 5-fluorocytosine by genetically engineered clostridia. *Gene Therapy*. 3: 173-178 (1996).
- Frain et al., "Binding of a liver-specific factor to the human albumin gene promoter and enhancer," *Mol. Cell Biol.* 10: 991 (1990).
- 35 Galan, J.E. Molecular and cellular bases of Salmonella entry into host cells. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 209: 43-60 (1996).
- Gao, H., Shi, W. & Freund, L.B. Mechanics of receptor-mediated endocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102: 9469-9474 (2005).
- 40 Gerlowski, L. & Jain, R. Microvascular permeability of normal and neoplastic tissues. *Microvasc. Res.* 31: 288-305 (1986).
- Glennie MJ, McBride HM, Worth AT, Stevenson GT. Preparation and performance of bispecific F(ab' gamma)2 antibody containing thioether-linked Fab' gamma fragments. *J Immunol.* 1987 Oct 1;139(7):2367-75.

- Gosselin MA, Lee RJ. Folate receptor-targeted liposomes as vectors for therapeutic agents. *Biotechnol Annu Rev.* 2002;8:103-31
- Greber, U.F., Webster, P., Weber, J. & Helenius, A. The role of the adenovirus protease on virus entry into cells, *EMBO J.* 15: 1766-1777 (1996).
- 5 Green, N.K. & Seymour, L.W. Adenoviral vectors: systemic delivery and tumor targeting. *Cancer Gene Ther.* 9: 1036-1042 (2002).
- Griffiths, A. D. et al. Isolation of high affinity human antibodies directly from large synthetic repertoires. *EMBO J.* 13, 3245-3260 (1994).
- Guerrier-Takada et al., *Cell*, 35: 849 (1983).
- 10 Hafez, I.M., Maurer, N. & Cullis, P.R. On the mechanism whereby cationic lipids promote intracellular delivery of polynucleic acids. *Gene Ther.* 8: 1188-1196 (2001).
- Hampel y Tritz, *Biochem.*, 28: 4929 (1989).
- Hampel et al., *Nucleic Acids Research*: 299 (1990)
- Hanahan, Heritable formation of pancreatic beta-cell tumours in transgenic mice expressing recombinant insulin/simian virus 40 oncogenes. 9-15 Mayo 1985; 315(6015): 115-122.
- 15 Harrison et al., "Inhibition of human immunodeficiency virus-1 production resulting from transduction with a retrovirus containing an HIV-regulated diphtheria toxin A chain gene," *Hum. Gene Ther.* 3: 461 (1992a).
- Harrison et al., "Inhibition of HIV production in cells containing an integrated, HIV- regulated diphtheria toxin A chain gene," *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 8: 39 (1992b).
- 20 Hart, "Tissue specific promoters in targeting systematically delivered gene therapy," *Semin. Oncol.* 23: 154 (1996).
- Heim et al., "Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein," *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 91: 12501 (1994).
- Hobbs, S.K., Monsky, W.L., Yuan, F., Roberts, W.G., Griffith, L., Torchilin, V.P. y Jain, R.K. Regulation of transport pathways in tumor vessels: Role of tumor type and microenvironment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 4607-4612 (1998).
- 25 Hoshida T, Sunamura M, Duda DG, Egawa S, Miyazaki S, Shineha R, Hamada H, Ohtani H, Satomi S, Matsuno S. Gene therapy for pancreatic cancer using an adenovirus vector encoding soluble fit-1 vascular endothelial growth factor receptor. *Pancreas.* Agosto 2002;25(2): 111-21.
- Hu, S, L Shively, A Raubitschek, M Sherman, LE Williams, JY Wong, JE Shively, y AM Wu. Minibody: A novel engineered anti-carcinoembryonic antigen antibody fragment (single-chain Fv-CH3) which exhibits rapid, high-level targeting of xenografts. *Cancer Res.* 1996 56: 3055-3061.
- 30 Hudson, P.J. & Souriau, C. Recombinant antibodies for cancer diagnosis and therapy. *Expert Opin. Biol. Ther.* 1, 845-855 (2001).
- Hudson PJ, Souriau C. Engineered antibodies. *Nat Med.* Enero 2003 ;9 (1):129-34.
- 35 Hung MC, Hortobagyi GN, Ueno NT. Development of clinical trial of E1A gene therapy targeting HER-2/neu-overexpressing breast and ovarian cancer. *Adv Exp Med Biol.* 2000;465:171-80.
- Jain, R.K. Transport of molecules across tumor vasculature. *Cancer Metastasis Rev.* 6: 559-593 (1987).
- Jain, R.K. Delivery of molecular medicine to solid tumors. *Science* 271: 1079-1080 (1996).
- Jain, R.K. The Eugene M. Landis Award Lecture 1996: Delivery of molecular and cellular medicine to solid tumors. *Microcirculation* 4: 1-23 (1997).
- 40 Jain, R.K. Delivery of molecular and cellular medicine to solid tumors. *J. Control. Release* 53, 49-67 (1998).

- Jain, R.K. Delivery of molecular and cellular medicine to solid tumors. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 46: 149-68 (2001).
- James, M.B., Giorgio, T.D. Nuclear-associated plasmid, but not cell-associated plasmid, is correlated with transgene expression in cultured mammalian cells. *Mol. Ther.* 1: 339-346 (2000).
- 5 Jones, P. T., Dear, P. H., Foote, J., Neuberger, M. S. & Winter, G. Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature* 321, 522-525 (1986).
- Kaetzel CS, Blanch VJ, Hempen PM, Phillips KM, Piskurich JF, Youngman KR The polymeric immunoglobulin receptor: structure and synthesis. *Biochem Soc Trans* 25:475-480 (1997).
- Kanke, M., Sniecinski, I., & DeLuca, P.P. Interaction of microspheres with blood constituents. I. Uptake of polystyrene spheres by monocytes and granulocytes and effect on immune responsiveness of lymphocytes. *J. Parenter. Sci. Technol.* 37: 210-217 (1983).
- 10 Kapoor, T.M., Mayer, T.U., Coughlin, M.L., Mitchison, T.J. Probing spindle assembly mechanisms with monastrol, a small molecule inhibitor of the mitotic kinesin, Eg5. *J. Cell Biol.* 150: 975-988 (2000).
- Karpovsky B, Titus JA, Stephany DA, Segal DM. Production of target-specific effector cells using hetero-cross-linked aggregates containing anti-target cell and anti-Fc gamma receptor antibodies. *J Exp Med.* 160:1686-701 (1984).
- 15 Katabi et al., "Hexokinase Type II: A Novel Tumor Specific Promoter for Gene-Targeted Therapy Differentially Expressed and Regulated in Human Cancer Cells," *Human Gene Therapy* 10: 155 (1999).
- Kelsey et al., "Species- and tissue-specific expression of human alpha 1-antitrypsin in transgenic mice," *Genes and Devel.* 1: 161 (1987).
- Kerem et al., "Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis," *Science* 245: 1073 (1989).
- 20 King, I., et al. Tumor-targeted Salmonella expressing cytosine deaminase as an anticancer agent. *Hum. Gene Ther.* 13: 1225 - 1233 (2002).
- Kleeff J, Fukahi K, Lopez ME, Friess H, Buchler MW, Sosnowski BA, Korc M. Targeting of suicide gene delivery in pancreatic cancer cells via FGF receptors. *Cancer Gene Ther.* Junio 2002;9(6):522-32.
- 25 Klemm, A.R. Effects of polyethylenimine on endocytosis and lysosome stability. *Biochem. Pharmacol.* 56: 41-46 (1998).
- Knappik, A. et al. Fully synthetic human combinatorial antibody libraries (HuCAL) based on modular consensus frameworks and CDRs randomized with trinucleotides. *J. Mol. Biol.* 296, 57-86 (2000).
- Konerding, M.A., Miodonski, A.J., Lametschwandtner, A. Microvascular corrosion casting in the study of tumor vascularity: a review. *Scanning Microsc.* 9: 1233-1243 (1995).
- 30 Kostelny SA, Cole MS, Tso JY. Formation of a bispecific antibody by the use of leucine zippers. *J Immunol.* 1992 Mar 1;148(5):1547-53.
- Kreiss, P., Cameron, B., Rangara, R., Mailhe, P., Aguerre-Charriol, O., Airiau, M., Scherman, D., Crouzet, J., Pitard, B. Plasmid DNA size does not affect the physicochemical properties of lipoplexes but modulates gene transfer efficiency. *Nucleic Acids Res.* 27: 3792-3798 (1999).
- 35 Kurane et al., "Targeted Gene Transfer for Adenocarcinoma Using a Combination of Tumor specific Antibody and Tissue-specific Promoter," *Jpn. J. Cancer Res.* 89: 1212 (1998).
- Leder et al., "Consequences of widespread deregulation of the c-myc gene in transgenic mice: multiple neoplasms and normal development," *Cell* 45: 485 (1986).
- 40 Lee, K-D, OhY, Portnoy, D, et al. Delivery of macromolecules into cytosol using liposomes containing hemolysin from *Listeria monocytogenes*. *J. Biol. Chem.* 271: 7249-7252 (1996).
- Lee, C. H., Wu, C. L., y Shiau, A. L. (2005a). Endostatin gene therapy delivered by *Salmonella choleraesuis* in murine tumor models. *J. Gene Med.* 6: 1382-1393.

- Lee, C. H., Wu, C. L., y Shiau, A. L. (2005b). Systemic administration of attenuated *Salmonella choleraesuis* carrying thrombospondin-1 gene leads to tumor-specific transgene expression, delayed tumor growth and prolonged survival in the murine melanoma model. *Cancer Gene Ther.* 12: 175 - 184.
- 5 Lemmon, M.J., van Zijl, P., Fox, M.E., et al. Anaerobic bacteria as a gene delivery system that is controlled by the tumor microenvironment. *Gene Therapy.* 8: 791-796 (1997).
- Less, J.R., Skalak, T.C., Sevick, E.M., Jain, R.K. Microvascular architecture in a mammary carcinoma: branching patterns and vessel dimensions. *Cancer Res.* 51: 265-273 (1991).
- Less, J.R., Posner, M.C., Boucher, Y., Borochovit, D., Wolmark, N., Jain, R.K. Interstitial hypertension in human breast and colorectal tumors. *Cancer Res.* 52: 6371-6374 (1992).
- 10 Less, J.R., Posner, M.C., Skalak, T.C., Wolmark, N., Jain, R.K. Geometric resistance and microvascular network architecture of human colorectal carcinoma. *Microcirculation* 4: 25-33 (1997).
- Li, X., Fu, G-F., Fan, Y-R., et al. Bifidobacterium adolescentis as a delivery system of endostatin for cancer gene therapy: selective inhibitor of angiogenesis and hypoxic tumor growth. *Cancer Gene Ther.* 10: 105-111 (2003).
- 15 Liu, Q., Muruve, D.A. Molecular basis of the inflammatory response to adenovirus vectors. *Gene Ther.* 10: 935-940 (2003).
- Liu, S-C., Minton, N.P., Giaccia, A.J., Brown, J.M. Anticancer efficacy of systemically delivered anaerobic bacteria as gene therapy vectors targeting tumor hypoxia/necrosis. *Gene Ther.* 9: 291-296 (2002).
- Lorenzi, G.L., Lee, K.D. Enhanced plasmid DNA delivery using anionic LPDII by listeriolysin O incorporation. *J. Gene Med.* 7: 1077-1085 (2005).
- 20 Low KB, Ittensohn M, Le T, et al. Lipid A mutant *Salmonella* with suppressed virulence and TNF α induction retain tumor-targeting in vivo. *Nat Biotechnol.* 1999;17: 37-41.
- Luo X, Li Z, Lin S, et al. Antitumor effect of VNP20009, an attenuated *Salmonella*, in murine tumor models. *Oncol Res.* 2001;12:501-508.
- MacDonald et al., "Expression of the pancreatic elastase I gene in transgenic mice," *Hepatology* 7: 425 (1987).
- 25 Maeda, H. The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: the key role of tumor-selective macromolecular drug targeting. *Adv. Enzyme Regul.* 41: 189-207 (2001).
- Maeda, H. & Matsumura, Y. Tumorotropic and lymphotropic principles of macromolecular drugs. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 6, 193-210 (1989).
- Marsh, M. & A.M. Helenius, A.M. Virus entry into animal cells. *Adv. Virus Res.* 36: 107-151 (1989).
- 30 Marshall. Carcinoembryonic antigen-based vaccines. *Semin. Oncol.* 2003 Jun.; 30 (3 Suppl. 8): 30-36.
- Mason et al., "The hypogonadal mouse: reproductive functions restored by gene therapy," *Science* 234: 1372 (1986).
- Mayer, T.U., Kapoor, T.M., Haggarty, S.J., King, R.W., Schreiber, S.L., Mitchison, T.J. Small molecule inhibitor of mitotic spindle bipolarity identified in a phenotype-based screen. *Science* 286: 971-974 (1999).
- 35 Menard, R., Dehio, C. & Sansonetti, P.J. Bacterial entry into epithelial cells: the paradigm of *Shigella*. *Trends Microbiol.* 4: 220-226 (1996).
- Meyer, K., Uyechi, L.S. & Szoka, F.C.J. Manipulating the intracellular trafficking of nucleic acids, in: K.L. Brigham (Ed.), *Gene Therapy for Diseases of the Lung*, Marcel Dekker Inc, Nueva York, págs 135-180 (1997).
- Minton, N.P., Mauchline, M.L., Lemmon, M.J., et al. Chemotherapeutic tumour targeting using clostridial spores. *FEMS Microbiol. Rev.* 17: 357-364 (1995).
- 40 Monack, D.M., Raupach, B., Hromockyj, A.E., Falkow, S. *Salmonella typhimurium* invasion induces apoptosis in infected macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 9833-9838 (1996).

- Morton & Potter, "Rhabdomyosarcoma-specific expression of the herpes simplex virus thymidine kinase gene confers sensitivity to ganciclovir," *J. Pharmacology & Exper. Therapeutics* 286: 1066 (1998).
- Mui, B., Ahkong, Q., Chow, L. & Hope, M. Membrane perturbation and the mechanism of lipid-mediated transfer of DNA into cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1467: 281-292 (2000).
- 5 Nakai, T., Kanamori, T., Sando, S. & Aoyama, Y. Remarkably size-regulated cell invasion by artificial viruses. Saccharide-dependent self-aggregation of glycoviruses and its consequences in glycoviral gene delivery. *J. Am. Chem. Soc.* 125: 8465-8475 (2003).
- Nettelbeck, D.M., Miller, D.W., Jerome, V., Zuzarte, M., Watkins, S.J., Hawkins, R.E., Muller, R. & Kontermann, R.E. Targeting of adenovirus to endothelial cells by a bispecific single-chain diabody directed against the adenovirus fiber knob domain and human endoglin (CD 105). *Mol. Ther.* 3: 882-891 (2001).
- 10 Nieth et al., *FEBS Letters*, 545: 144-50 (2003).
- Nuyts S, Mellaert IV, Theys J, Landuyt W, Lambin P, Anne J. Clostridium spores for tumor-specific drug delivery. *Anti- Cancer Drugs*. 2002a;13:115-125.
- Nuyts S, Van Mellaert L, Theys J, et al. Radio-responsive recA promoter significantly increases TNF α production in recombinant clostridia after 2 Gy irradiation. *Gene Therapy*. 2002b;8:1197-1201.
- 15 Ogris, M. & Wagner, E. Targeting tumors with non-viral gene delivery systems. *Drug Discovery Today* 7: 479-485 (2002).
- Osaki, F., Kanamori, T., Sando, S., Sera, T. & Aoyama, Y. A quantum dot conjugated sugar ball and its cellular uptake. On the size effects of endocytosis in the subviral region. *J. Am. Chem. Soc.* 126: 6520-6521 (2004).
- 20 Osboum, J., Jermutus, L., Duncan, A. Current methods for the generation of human antibodies for the treatment of autoimmune diseases. *Drug Delivery Tech* 8: 845-851 (2003).
- Pack P, Pluckthun A. Miniantibodies: use of amphipathic helices to produce functional, flexibly linked dimeric Fv fragments with high avidity in *Escherichia coli*. *Biochemistry*. 18 de Febrero de 1992;31(6):1579-84.
- Paglia P, Terrazzini N, Schulze K, Guzman CA, Colombo MP. In vivo correction of genetic defects of monocyte/macrophages using attenuated *Salmonella* as oral vectors for targeted gene delivery. *Gene Ther* 2000; 7: 1725-1730.
- 25 Pawelek JM, Low KB, Bermudes D. Tumor-targeted *Salmonella* as a novel anticancer vector. *Cancer Res*. 1997;57:4537-4544.
- Pawelek J, Low KB, Bermudes D. Bacteria as tumourtargeting vectors. *Lancet Oncol Rev*. 2003;4:548-556.
- 30 Perrotta y Been, *Biochem.*, 31: 16 (1992).
- Peterson HI, Appelgren L: Tumour vessel permeability and transcapillary exchange of large molecules of different size. *Bibl Anat* 1977, 15:262-265.
- Pikaar et al., *J. Infect. Dis.* 172: 481 (1995).
- Pinkert et al., "An albumin enhancer located 10 kb upstream functions along with its promoter to direct efficient, liver-specific expression in transgenic mice," *Genes and Devel.* 1: 268 (1987).
- 35 Platt J, Sodi S, Kelley M, et al. Antitumour effects of genetically engineered *Salmonella* in combination with radiation. *Eur J Cancer*. 2000;36:2397-2402.
- Prasher et al., "Using GFP to see the light," *Trends in Genetics* 11: 320 (1995).
- Ragheb et al., "Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 by Tat/Rev-regulated expression of cytosine deaminase, interferon alpha2, or diphtheria toxin compared with inhibition by transdominant Rev," *Hum. Gene Ther.* 10: 103 (1999).
- 40

- Readhead et al., "Myelin deficient mice: expression of myelin basic protein and generation of mice with varying levels of myelin," *Cell* 48: 703 (1987).
- Ridgway JB, Presta LG, Carter P. 'Knobs-into-holes' engineering of antibody CH3 domains for heavy chain heterodimerization. *Protein Eng.* 1996 Jul;9(7):617-21.
- 5 Riechmann, L., Clark, M., Waldmann, H. & Winter, G. Reshaping human antibodies for therapy. *Nature* 332, 323-327 (1988).
- Riezman, *Trends in Cell Biology*, 3: 330 (1993).
- Riordan et al., "Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA," *Science* 245: 1066 (1989).
- 10 Rommens et al., "Identification of the cystic fibrosis gene: Chromosome walking and jumping," *Science* 245: 1059 (1989).
- Rosenberg, S.A., Spiess, P.M., y Kleiner, D.E. Antitumour effects in mice of the intravenous injection of attenuated *Salmonella typhimurium*. *J. Immunother.* 25: 218-225 (2002).
- Rossi et al., *Aids Research and Human Retroviruses*, 8: 183 (1992)
- 15 Ruiz, F.E., Clancy, J.P., Perricone, M.A., Bebok, Z., Hong, J.S., Cheng, S.H., Meeker, D.P., Young, K.R., Schoumacher, R.A., Weatherly, M.R., Wing, L., Morris, J.E., Sindel, L., Rosenberg, M., van Ginkel, F.W., McGhee, J.R., Kelly, D., Lyrene, R.K., Sorscher, E.J. A clinical inflammatory syndrome attributable to aerosolized lipid-DNA administration in cystic fibrosis. *Hum. Gene Ther.* 12: 751-761 (2001).
- Salomon DS, Brandt R, Ciardiello F, Normanno N. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol* 1995, 19, 183-232.
- 20 Sandvig & Deurs, *Trends in Cell Biology*, 4: 275 (1994).
- Saville & Collins, *Cell*, 61: 685-96 (1990).
- Saville & Collins, *PNAS (USA)*, 88: 8826-30 (1991).
- Scheule, R.K. The role of CpG motifs in immunostimulation and gene therapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 44: 119-134 (2000).
- 25 Seth, P., Willingham, M.C. & Pastan, I. Binding of adenovirus and its external proteins to Triton X-114. Dependence on pH. *J. Biol. Chem.* 260: 14431-14434 (1985).
- Seymour, L.W. Passive tumor targeting of soluble macromolecules and drug conjugates. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 9, 135-187 (1992).
- 30 Shangara et al., "Suicide genes: past, present and future perspectives," *Immunology Today* 21: 48 (2000).
- Shaw & Griffen, *Nature* 289: 409 (1981).
- Sheets, M. D. et al. Efficient construction of a large nonimmune phage antibody library: the production of high-affinity human single-chain antibodies to protein antigens. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 95, 6157-6162 (1998).
- Simoes, S., Pedro, P., Duzgunes, N. & Pedrosa de Lima, M. Cationic liposomes as gene transfer vectors: barriers to successful application in gene therapy. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1: 147-157 (1999).
- 35 Singh, Transferrin as a targeting ligand for liposomes and anticancer drugs. *Curr Pharm Des.* 1999 Jun; 5(6):443-51.
- Siould, "Therapeutic siRNAs," *Trends in Pharmacological Sciences*, 25(1): 22-28 (2004).
- Soghomonyan, S.A., Doubrovin, M., Pike, J., Luo, X., Ittensohn, M., Runyan, J.D., Balatoni, J., Finn, R., Tjuvajev, J.G., Blasberg, R., y Bermudes, D. Positron emission tomography (PET) imaging of tumor-localized *Salmonella* expressing HSV1-TK. *Cancer Gene Ther.* 12: 101-108 (2005).
- 40

- Sonawane, N., Szoka, F.J. & Verkman, A. Chloride accumulation and swelling in endosomes enhances DNA transfer by polyamine-DNA polyplexes. *J. Biol. Chem.* 278: 44826-44831 (2003).
- Speert et al., *J. Clin. Invest.*, 82: 872 (1988).
- 5 Spencer, "Developments in suicide genes for preclinical and clinical applications," *Current Opinion in Molecular Therapeutics* 2: 433-440 (2000).
- Stein, B.S., Gowda, S.D., Lifson, J.D., Penhallow, R.C., Bensch, K.G., Engleman, E.G. pH-independent HIV entry into CD4-positive T cells via virus envelope fusion to the plasma membrane, *Cell* 49: 659-668 (1987)
- Stockert. The asialoglycoprotein receptor: relationships between structure, function, and expression. *Physiol Rev.* 1995 Jul; 75(3):591-609.
- 10 Swanson, J. A. & Watts, C. Macropinocytosis. *Trends Cell Biol.* 5: 424-428(1995).
- Swift et al., "Tissue-specific expression of the rat pancreatic elastase I gene in transgenic mice," *Cell* 38: 639 (1984).
- Tabata, Y., & Ikada, Y. Macrophage phagocytosis of biodegradable microspheres composed of 1-lactic acid/glycolic acid homo- and copolymers. *J. Biomed. Mater. Res.* 22: 837-858 (1988).
- 15 Tachibana, R., Harashima, H., Ide, N., Ukitsu, S., Ohta, Y., Suzuki, N., Kikuchi, H., Shinohara, Y., Kiwada, H. Quantitative analysis of correlation between number of nuclear plasmids and gene expression activity after transfection with cationic liposomes. *Pharm. Res.* 19: 377-381 (2002).
- Tao, W., South, V.J., Zhang, Y., Davide, J.P., Farrell, L., Kohl, N.E., Sepp-Lorenzino, L., Lobell, R.B. Induction of apoptosis by an inhibitor of the mitotic kinesin KSP requires both activation of the spindle assembly checkpoint and mitotic slippage. *Cancer Cell* 8: 49-59 (2005).
- 20 Theys, J., Landuyt, W., Nuyts, S., et al. Specific targeting of cytosine deaminase to solid tumors by engineered *Clostridium acetobutylicum*. *Cancer Gene Ther.* 8: 294-297 (2001).
- Thurnher M, Wagner E, Clausen H, Mechtler K, Rusconi S, Dinter A, Birnstiel ML, Berger EG, Cotten M. Carbohydrate receptor-mediated gene transfer to human T leukaemic cells. *Glycobiology.* Agosto 1994;4(4):429-35.
- 25 Todorovska, A. et al. Design and application of diabodies, triabodies and tetrabodies for cancer targeting. *J. Immunol. Methods* 248, 47-66 (2001).
- Tomlinson, I. & Holliger, P. Methods for generating multivalent and bispecific antibody fragments. *Methods Enzymol.* 326, 461-479 (2000).
- Vaughan, T. J. et al. Human antibodies with subnanomolar affinities isolated from a large non-immunized phage display library. *Nature Biotechnol.* 14, 309-314 (1996).
- 30 Vaughan, T. J., Osbourn, J. K. & Tempest, P. R. Human antibodies by design. *Nature Biotechnol.* 16, 535-539 (1998).
- Verhoeyen, M., Milstein, C. & Winter, G. Reshaping human antibodies: grafting an antilysozyme activity. *Science* 239, 1534-1536 (1988).
- 35 Wakimoto, H., Johnson, P.R., Knipe, D.M., Chiocca, E.A. (2003) Effects of innate immunity on herpes simplex virus and its ability to kill tumor cells. *Gene Ther.* 10: 983-990 (2003).
- Warren, B.A. The vascular morphology of tumors. *Tumor Blood Circulation: Angiogenesis, Vascular Morphology and Blood Flow of Experimental and Human Tumors.* Edited by Peterson H-I. Boca Raton, CRC Press, Inc., pp 1-48 (1979).
- 40 Wattiaux, R., Laurent, N., Wattiaux-De Coninck, S. & Jadot, M. Endosomes, lysosomes: their implication in gene transfer. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 41: 201-208 (2000).
- Weiss. S. & Chakraborty, T. Transfer of eukaryotic expression plasmids to mammalian host cells by bacterial carriers. *Curr. Opin. Biotechnol.* 12: 467-472(2001).

- Whitmore, M., Li, S., Huang, L. LPD lipopolyplex initiates a potent cytokine response and inhibits tumor growth. *Gene Ther.* 6: 1867-1875 (1999).
- Whitmore, M.M., Li, S., Falo, L., Jr, Huang, L. Systemic administration of LPD prepared with CpG oligonucleotides inhibits the growth of established pulmonary metastases by stimulating innate and acquired antitumor immune responses. *Cancer Immunol. Immunother.* 50: 503-514 (2001).
- Wickham, T.J., Segal, D.M., Roelvink, P.W., Carrion, M.E., Lizonova, A., Lee, G.M. & Kovesdi, I. Targeted adenovirus gene transfer to endothelial and smooth muscle cells by using bispecific antibodies. *J. Virol.* 70: 6831-6838 (1996).
- Wright & Jong, *Experimental Medi.*, 163: 1245 (1986).
- Wrobel, I. & Collins, D. Fusion of cationic liposomes with mammalian cells occurs after endocytosis. *Biochim. Biophys. Acta* 1235: 296-304 (1995).
- Wu, et al., *Cancer Res.*, 63: 1515-19 (2003).
- Xu, Y. & Szoka, F.C. Mechanism of DNA release from cationic liposome/DNA complexes used in cell transfection. *Biochem. J.* 35: 5616-5623 (1996).
- Yague et al., *Gene Therapy*, 11: 1170-74 (2004).
- Yamada, H., Matsumoto, S., Matsumoto, T., Yamada, T., y Yamashita, U. Murine IL-2 secreting recombinant Bacillus Calmette-Guerin augments macrophage mediated cytotoxicity against murine bladder cancer MBT-2. *J. Urol.* 164: 526-531 (2000).
- Yazawa K, Fujimori M, Amano J, Kano Y, Taniguchi S. Bifidobacterium longum as a delivery system for cancer gene therapy: Selective localization and growth in hypoxic tumors. *Cancer Gene Ther.* 2000;7:269-274.
- Yazawa K, Fujimori M, Nakamura T, et al. Bifidobacterium longum as a delivery system for cancer gene therapy of chemically induced rat mammary tumors. *Breast Cancer Res Treat.* 2001;66:165-170.
- Yazawa et al., "Current progress in suicide gene therapy for cancer," *World J. Surg.* 26: 783 (2002).
- Yew, N.S., Wang, K.X., Przybylska, M., Bagley, R.G., Stedman, M., Marshall, J., Scheule, R.K., Cheng, S.H. Contribution of plasmid DNA to inflammation in the lung after administration of cationic lipid:pDNA complexes. *Hum. Gene Ther.* 10: 223-234 (1999).
- Yu, Y.A., Shabahang, S., Timiryasova, T.M., et al. Visualization of tumors and metastases in live animals with bacteria and vaccinia virus encoding light-emitting proteins. *Nat. Biotechnol.* 22: 313-320 (2004).
- Yuan, F., Leunig, M., Huang, S.K., Berk, D.A., Papahadjopoulos, D. & Jain, R.K. Microvascular permeability and interstitial penetration of sterically stabilized (stealth) liposomes in a human tumor xenograft. *Cancer Res.* 54, 3352-3356 (1994).
- Yuan, F., Dellian, M., Fukumura, D., Leunig, M., Berk, D., Torchillin, V. & Jain, R. Vascular permeability in a human tumor xenograft: molecular size dependence and cutoff size. *Cancer Res.* 55: 3752-3756 (1995).
- Yuhua, L., Kunyuan, G., Hui, C., et al. Oral cytokine gene therapy against murine tumor using attenuated Salmonella typhimurium. *Int. J. Cancer* 94: 438-443 (2001).
- Zelphati, O. & Szoka, F. Intracellular distribution and mechanism of delivery of oligonucleotides mediated by cationic lipids. *Pharm. Res.* 13: 1367-1372 (1996).
- Zelphati, O. & Szoka, F. Mechanism of oligonucleotide release from cationic liposomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93: 11493-11498 (1996).
- Zhao, Y., Zhu, L., Lee, S., Li, L., Chang, E., Soong, N.W., Douer, D. & Anderson, W.F. Identification of the block in targeted retroviral-mediated gene transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 4005-4010 (1999).
- Zhou, X., Mantis, N., Zhang, X.R., Potoka, D.A., Watkins, S.C., y Ford, H.R. Salmonella typhimurium induces apoptosis in human monocyte-derived macrophages. *Microbiol. Immunol.* 44: 987-995 (2000).

Ziady AG, Perales JC, Ferkol T, Gerken T, Beegen H, Perlmutter DH, Davis PB. Gene transfer into hepatoma cell lines via the serpin enzyme complex receptor. Am JPhysiol. Agosto 1997; 273(2 Pt 1):G545-52.

WO 81/01145

WO 88/07378

5 WO 95/21191

WO 00/67776

Patente de EE.UU. No. 4,975,278

Patente de EE.UU. No. 4,987,071

10

REIVINDICACIONES

1. Una composición para uso en el tratamiento de una enfermedad, en donde la composición comprende:
 - (a) una pluralidad de células bacterianas muertas, en donde cada célula bacteriana muerta de dicha pluralidad posee una pared celular y/o una membrana celular intacta, que contiene material genético que es endógeno a las especies bacterianas, y que abarca (i) un ácido nucleico terapéutico que codifica un producto, tal como un péptido, polipéptido o proteína, cuya producción se desea en una célula diana, (ii) un fármaco que es una sustancia fisiológica o farmacéuticamente activa que produce un efecto local o sistémico deseado en mamíferos y seres humanos o (iii) una molécula de ácido nucleico funcional que, tras la introducción en una célula hospedante, interfiere específicamente con la expresión de una proteína,
 - (b) un vehículo farmacéuticamente aceptable para ello, y
 - (c) un ligando biespecífico unido a cada célula bacteriana muerta intacta.
2. Una composición para uso en el tratamiento de una enfermedad, en donde la composición comprende:
 - (a) una pluralidad de células bacterianas muertas intactas, en donde cada célula bacteriana muerta de dicha pluralidad posee una pared celular y/o una membrana celular intacta, que contiene material genético que es endógeno a las especies bacterianas, y que abarca (i) un ácido nucleico terapéutico que codifica un producto, tal como un péptido, polipéptido o proteína, cuya producción se desea en una célula diana, (ii) un fármaco que es una sustancia fisiológica o farmacéuticamente activa que produce un efecto local o sistémico deseado en mamíferos y seres humanos o (iii) una molécula de ácido nucleico funcional que tras la introducción en una célula hospedante, interfiere específicamente con la expresión de una proteína,
 - (b) un vehículo farmacéuticamente aceptable para ello, y
 - (c) un ligando biespecífico unido a cada célula bacteriana muerta intacta, y en donde el uso comprende administrar la composición a una célula, tejido u órgano.
3. Una composición para uso en el tratamiento de una enfermedad administrando una carga a una célula diana *in vivo*, en donde la composición comprende:
 - (a) una pluralidad de células bacterianas muertas intactas, en donde cada célula bacteriana muerta de dicha pluralidad posee una pared celular y/o membrana celular intacta, que contiene material genético que es endógeno a las especies bacterianas, y que abarca una carga seleccionada entre (i) un ácido nucleico terapéutico que codifica un producto, tal como un péptido, polipéptido o proteína, cuya producción se desea en una célula diana, (ii) un fármaco que es una sustancia fisiológica o farmacéuticamente activa que produce un efecto local o sistémico deseado en mamíferos y seres humanos y (iii) una molécula de ácido nucleico funcional que, tras la introducción en una célula hospedante, interfiere específicamente con la expresión de una proteína,
 - (b) un vehículo farmacéuticamente aceptable para ello, y
 - (c) un ligando biespecífico unido a cada célula bacteriana muerta intacta, y en donde el uso comprende poner en contacto la célula diana con la composición, después de lo cual la célula diana fagocita a una célula bacteriana muerta intacta en la composición, y después de ser fagocitada la célula bacteriana muerta intacta libera la carga hacia la célula diana.
4. La composición para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde dichas células bacterianas muertas contienen un fármaco.
5. La composición para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde dichas células bacterianas muertas contienen ácido nucleico funcional.
6. La composición para uso según la reivindicación 5, en donde dicho ácido nucleico funcional está libre de plásmido.
7. La composición para uso según la reivindicación 5, en donde dicho ácido nucleico funcional dirige la transcripción de una proteína que promueve la resistencia a los fármacos, inhibe la apoptosis o promueve un fenotipo neoplásico.
8. La composición para uso según la reivindicación 7, en donde dicho ácido nucleico funcional es un siRNA, shRNA o miRNA que dirige la transcripción de una proteína que promueve la resistencia a los fármacos.
9. La composición para uso según la reivindicación 7, en donde dicho ácido nucleico funcional dirige la transcripción de P-glicoproteína, MDR-2 o MDR-3.

10. La composición para uso según la reivindicación 7, en donde dicho ácido nucleico funcional dirige la transcripción de MRP2, BCR-ABL, proteína asociada a resistencia STI-571, proteína asociada a resistencia pulmonar, ciclo-oxigenasa-2, factor nuclear kappa, XRCC1, ERCC1, GSTP1, β -tubulina mutante o factor de crecimiento.
- 5 11. La composición para uso según la reivindicación 7, en donde dicho ácido nucleico funcional dirige la transcripción de una proteína que inhibe la apoptosis.
12. La composición para uso según la reivindicación 7, en donde dicho ácido nucleico funcional dirige una transcripción de una proteína que promueve un fenotipo neoplásico.
13. La composición para uso según la reivindicación 7, que además comprende un fármaco.
- 10 14. La composición para uso según la reivindicación 13, en donde dicho fármaco está empaquetado en una célula bacteriana muerta.
15. La composición para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en donde dicho ligando biespecífico comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo.
- 15 16. La composición para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-15, en donde dicho ligando biespecífico comprende una primera rama que porta especificidad hacia una estructura superficial de la célula bacteriana y una segunda rama que porta especificidad hacia un receptor superficial de una célula mamífera no fagocítica.
- 20 17. La composición según la reivindicación 2, en donde el ácido nucleico terapéutico, tras la introducción en una célula hospedante, afecta las respuestas inmunes asociadas con el alérgeno o agente infeccioso, y en donde la enfermedad es un trastorno inflamatorio mediado por un agente infeccioso o mediado por un alérgeno.