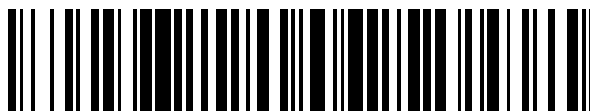


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 759 854**

51 Int. Cl.:

A61K 35/74 (2015.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 35/04 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61K 31/664 (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)
C12N 1/36 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.12.2013** **PCT/US2013/077441**
87 Fecha y número de publicación internacional: **10.07.2014** **WO14107365**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.12.2013** **E 13818965 (9)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.09.2019** **EP 2941258**

54 Título: **Composiciones y métodos para el tratamiento del cáncer utilizando bacterias**

30 Prioridad:

02.01.2013 US 201361748369 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.05.2020

73 Titular/es:

DECOY BIOSYSTEMS, INC. (100.0%)
PMB 482, 3830 Valley Centre Dr., Ste 705
San Diego, CA 92130, US

72 Inventor/es:

NEWMAN, MICHAEL, J.

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 759 854 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones y métodos para el tratamiento del cáncer utilizando bacterias

5 Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

La presente solicitud reivindica el beneficio a tenor de 35 U.S.C. §119(e) de la solicitud provisional de Estados Unidos 61/748.369 presentada el 2 de enero de 2013.

10 Campo

Esta divulgación se refiere a composiciones que comprenden bacterias gram-negativas y métodos para tratar el cáncer mediante la administración de las mismas.

15 Antecedentes

La asociación de regresión del cáncer en pacientes que se someten a infección bacteriana se observó y se notificó al menos desde 1868. Se informó que la administración sistémica de organismos de *Salmonella* atenuada vivos a animales con tumor sólido dio como resultado una terapia tumoral. Véase, p. ej., la patente de Estados Unidos n.º 6.685.935 y Pawelek *et al.*, (Lancet Oncol. 4(9):548-56, 2003). Además, la administración intravesical (no sistémica) de micobacterias gram-positivas atenuadas (BCG) se aprobó en los Estados Unidos para el tratamiento y la profilaxis del carcinoma *in situ* (CIS) de la vejiga urinaria.

También se han notificado mejoras en la terapia tumoral utilizando *Salmonella* gram-negativa viva para ciertos mutantes auxotróficos. Véase, p. ej., Hoffman *et al.*, (Amino Acids 37:509-521, 2009, publicación de patente de Estados Unidos 20090300779 (Zhao *et al.*), y Zhao *et al.* (Proc. Natl. Acad. Sci. (EE. UU.) 102(3): 775-760, 2005).

Se ha preparado *Salmonella* con deleciones en el locus *msbB* que expresa miristoilación terminal que carece de LPS de lípido A en la membrana externa. La inducción de TNF-alfa en ratones y cerdos tratados con estas cepas de *msbB-Salmonella* fue de 33 % y 14 % de la cantidad inducida por bacterias de tipo silvestre, respectivamente. Véase, p. ej., Low *et al.*, Nature 17:37-41, 1999 y la patente de Estados Unidos n.º 7.354.592 (Bermudes *et al.*). Se ha notificado que la administración de tales organismos vivos, incluyendo la cepa VNP20009, inhibe el crecimiento del melanoma murino B16F10 implantado por vía subcutánea, y los xenoinjertos de tumores humanos Lox, DLD-1, A549, WiDr, HTB177 y MDA-MB-231 desarrollados en ratones (Luo *et al.*, Oncol. Res. 12(11-12):501-508, 2001). También se ha notificado que la cepa de *Salmonella* VNP20009 mejora la eficacia antitumoral del agente quimioterapéutico ciclofosfamida tanto con una dosis máxima tolerada como con un régimen metronómico de dosis baja (Jia *et al.*, Int. J. Cancer 121(3): 666-674, 2007).

Se han preparado mutantes condicionales de bacterias gram-negativas que no pueden producir el lípido A y que carecen de LPS en la membrana externa, pero se ha notificado que son tóxicos para el organismo. Por ejemplo, la inhibición mutacional de la síntesis de 3-desoxi-D-mano-octulosonato (Kdo) o la inhibición mutacional de la incorporación de moléculas Kdo en el lípido IV_A evita la síntesis de lípido A y LPS y la localización de los precursores LPS en la membrana externa de las bacterias gram-negativas. El lípido IV_A es un precursor LPS que carece de glicosilación. La activación de estas mutaciones conduce a la pérdida de viabilidad bacteriana (Rick *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 69(12): 3756-3760, 1972, Belunis *et al.* J. Biol. Chem 270(46): 27646-27652, 1995, y Taylor *et al.* J. Biol. Chem 275(41):32141-32146, 2000).

También es posible inhibir la incorporación de Kdo en el lípido IV_A, la síntesis de lípido A y la localización en la membrana externa mediante el uso de compuestos añadidos exógenamente. Goldman *et al.* (J. Bacteriol. 170(5): 2185-91, 1988) describen agentes antibacterianos que inhiben específicamente la actividad de CTP: CMP-3-desoxi-D-mano-octulosonato citidiltransferasa, bloqueando así la incorporación de 2-ceto 3-desoxi-D-mano-octulosonato (Kdo) en el lípido IV_A de los organismos gram-negativos. Cuando cesó la síntesis de LPS, se descubrió que las moléculas de estructura similar al lípido IV_A se acumulaban y el crecimiento bacteriano cesó. Los autores concluyeron que la adición de Kdo a la especie de lípido precursor LPS IV_A es la principal vía de formación de lípido A-Kdo₂ tanto en *S. typhimurium* LT2 como en *Escherichia coli* (*E. coli*).

Más recientemente, se han preparado mutantes de bacterias gram-negativas que carecen de LPS, incluyendo el lípido A o el 6-acil-lípido polisacárido, en la membrana externa, pero mantienen la viabilidad. Por ejemplo, la publicación de patente de Estados Unidos 2010/0272758 notifica una cepa K-12 de *E. coli* KPM22 que es defectuosa en la síntesis del ácido 3-desoxi-d-mano-oct-2-ulosónico (Kdo). KPM22 tiene una membrana externa (ME) compuesta predominantemente por lípido IV_A. La viabilidad de estos organismos se logró mediante la presencia de un supresor de segundo sitio que facilita el transporte de lípido IV_A de la membrana interna a la membrana externa. Se notifica que este supresor alivia los efectos secundarios tóxicos de la acumulación del lípido IV_A en la membrana interna y proporciona cantidades suficientes de precursores de LPS para soportar la biogénesis de ME. El precursor de LPS producido por esta cepa carece de actividad endotoxínica, conforme lo determinado por su incapacidad para inducir la secreción de TNF-alfa por las células mononucleares humanas en dosis precursoras

de LPS de hasta 1 µg/ml. Véase también, Mamat *et al.*, (Mol Microbiol. 67(3):633-48, 2008).

Los efectos secundarios limitantes de la dosis asociados a la infección y el choque séptico limitan significativamente la administración sistémica de las bacterias vivas a pacientes con cáncer. Esta limitación se ha asociado con bacterias de tipo silvestre (véase, p. ej., Wiemann y Starnes, Pharmac. Ther. 64:529-564, 1994 para revisión), y también se ha asociado a bacterias genéticamente atenuadas, que proliferan selectivamente en el tejido tumoral y expresan el lípido A modificado (véase, p. ej., Toso *et al.*, J. Clin. Oncol 20(1):142-152, 2002). Estas limitaciones han llevado al uso de bacterias destruidas por calor para la terapia contra el cáncer. Véase, p. ej., Havas *et al.* (Med. Oncol & Tumor Pharmacother. 10(4): 145-158, 1993), Ryoma *et al.* (Anticancer Res. 24:3295-3302, 2004), Maletzki *et al.* (Clin. Develop. Immunol 2012:1-16, 2012), patente de Estados Unidos n.º 8.034.359 B2 (Gunn), patente europea n.º EP 1.765.391 B1 (Gunn), y para revisión, Wiemann y Starnes (Pharmac. Ther. 64:529-564, 1994). Sin embargo, las bacterias destruidas no infecciosas aún inducen toxicidades limitantes de dosis significativas asociadas a la endotoxina derivada de LPS y otros constituyentes celulares, que son pirogénicos y pueden producir síntomas de choque séptico. Por lo tanto, se necesitan mejoras adicionales en el tratamiento contra el cáncer con bacterias.

Sumario

La invención es como se define en las reivindicaciones. En la presente memoria se proporcionan composiciones y métodos para tratar el cáncer en un mamífero (p. ej., un ser humano), diagnosticado con cáncer, mediante la administración a ese mamífero de una cantidad de bacterias gram-negativas en las que las bacterias son (i) no viables o sustancialmente no viables en el mamífero, (ii) tienen una reducción sustancial en la actividad de endotoxina y pirogenicidad, y (iii) son administradas en una cantidad suficiente para inhibir el crecimiento o el potencial metastásico del cáncer. En algunas realizaciones, las bacterias gram-negativas se vuelven no viables o sustancialmente no viables antes de la administración al mamífero mediante el tratamiento con (i) radiación, (ii) un esterilizante químico, (iii) un antibiótico que inactiva la endotoxina (p. ej., polimixina B o polimixina E), o (iv) un antibiótico que altera la biosíntesis de KDO2-lípido IV_A. Alternativamente, o además de uno cualquiera o más de los tratamientos anteriores, las bacterias gram-negativas comprenden además un defecto genético que altera o parcialmente altera la biosíntesis de KDO2-lípido IV_A o previene la O-acilación de KDO2-lípido IV_A. Los defectos genéticos que alteran o parcialmente alteran la O-acilación de KDO2-lípido IV_A incluyen, por ejemplo, defectos que alteran funcionalmente los loci *msbB* y *lpxM*.

En un aspecto de la divulgación, las composiciones comprenden bacterias gram-negativas sustancialmente no viables que tienen una reducción sustancial en la actividad y/o pirogenicidad de endotoxina y un excipiente farmacéuticamente aceptable. En una realización, las bacterias gram-negativas se vuelven no viables por medio de un tratamiento con glutaraldehído. En otra realización, la actividad y/o pirogenicidad de endotoxina se reduce mediante el tratamiento con polimixina B o con polimixina E. En una realización adicional, la actividad y/o pirogenicidad de endotoxina se reduce mediante el tratamiento con glutaraldehído.

En otro aspecto, se proporcionan métodos para tratar a un mamífero diagnosticado con cáncer que incluyen la administración de una cantidad de bacterias gram-negativas sustancialmente no viables que tienen una reducción sustancial en la actividad y/o pirogenicidad de endotoxina, en donde la cantidad administrada es suficiente para inhibir el crecimiento o metástasis del cáncer.

En otro aspecto, la divulgación proporciona métodos para tratar el cáncer en un mamífero (p. ej., un ser humano), diagnosticado con cáncer, mediante la administración a ese mamífero de una cantidad de bacterias gram-negativas en donde las bacterias son viables, pueden o no atenuarse, y tienen un defecto genético que resulta en una pérdida sustancial o total del lipopolisacárido dentro de la membrana externa de las bacterias y en donde la cantidad administrada es suficiente para inhibir el crecimiento o el potencial metastásico del cáncer.

En una realización, la divulgación proporciona un método para tratar un cáncer que comprende administrar a un mamífero diagnosticado con cáncer una cantidad de organismos bacterianos gram-negativos viables o no viables que tienen un defecto genético que da como resultado una pérdida sustancial del lipopolisacárido dentro de la membrana externa de la bacteria, en donde la cantidad administrada es suficiente para inhibir el crecimiento del cáncer.

En algunas realizaciones, el defecto genético altera o parcialmente altera la biosíntesis de KDO2-lípido IV_A o evita la O-acilación de KDO2-lípido IV_A.

En algunas realizaciones, el cáncer es un tumor sólido.

En otras realizaciones, al mamífero se le administra además un agente quimioterapéutico que incluye, por ejemplo, ciclofosfamida. En otras realizaciones, al mamífero se le administra además un antagonista de un receptor inhibidor de la función inmunitaria o un agonista del receptor que incluye, por ejemplo, inhibir la función de un receptor de células T o un ligando del receptor de células T (p. ej., CTLA-4, PD- 1, PD-L1 y PD-L2).

En otras realizaciones, al mamífero se le administra además un agonista de un receptor estimulante de la función

inmunitaria que incluye, por ejemplo, agonistas que estimulan un receptor de células T. Las dianas de receptor adecuadas incluyen, por ejemplo, GITR, 4-1BB, CD40 y OX40.

- 5 En otras realizaciones, al mamífero se le administra además una citoquina estimuladora de la función inmunitaria que incluye, por ejemplo, interferón alfa, interferón beta, interferón gamma, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos, interleucina-2 e interleucina-12.

En algunas realizaciones, las bacterias gram-negativas son *Salmonella* o *Escherichia*.

- 10 En otra realización, la divulgación proporciona métodos para destruir y reducir la actividad y/o pirogenicidad de endotoxina en bacterias gram-negativas tratando las bacterias con polimixina B y glutaraldehído. En una realización, la viabilidad se reduce a 0 % y la actividad o pirogenicidad de endotoxina se reduce en aproximadamente 90 % o 96 %.

15 Breve descripción de los dibujos

Las Figuras 1 y 2 demuestran que la incubación de *E. coli* con polimixina B (PMB) reduce el nivel de actividad de endotoxina asociada a células bacterianas y la viabilidad celular. Esto se describe adicionalmente en el Ejemplo 2.

- 20 Las Figuras 3 y 4 demuestran que la incubación de *E. coli* con glutaraldehído (GA) reduce el nivel de actividad de endotoxina asociada a células bacterianas y la viabilidad celular, como se describe adicionalmente en el Ejemplo 3.

- 25 La Figura 5 representa imágenes de microscopio electrónico de transmisión de *E. coli* sin tratar (Figura 5A), tratada con 1000 µg/ml de PMB (Figura 5B), GA al 1 % (Figura 5C), o tanto PMB como GA (Figura 5D), demostrando que las bacterias permanecen intactas después de todos los tratamientos, como se describe adicionalmente en el Ejemplo 4.

- 30 La Figura 6 representa un gráfico que muestra el efecto dependiente de la dosis de *E. coli* tratada con PMB + GA sobre el crecimiento del melanoma B16F10 murino subcutáneo en ratones, como se describe adicionalmente en el Ejemplo 7.

- 35 La Figura 7 muestra un gráfico que muestra el efecto dependiente de la dosis de *E. coli* no tratada y tratada con GA al 1 % sobre el crecimiento del melanoma B16F10 murino subcutáneo en ratones, como se describe adicionalmente en el Ejemplo 8.

- 40 Las Figuras 8A y 8B ilustran gráficos que muestran el efecto dependiente de la dosis de *E. coli* tratada con PMB + GA sin y con ciclofosfamida metronómica (Figura 8A) o anticuerpo CTLA-4 anti-murino (Figura 8B) sobre el crecimiento del carcinoma colorrectal murino CT26 subcutáneo en ratones, como se describe adicionalmente en el Ejemplo 9.

Descripción detallada

- 45 En la presente memoria se proporcionan composiciones que comprenden organismos bacterianos gram-negativos no viables y que tienen una reducción sustancial en la endotoxina y/o actividad pirogénica y métodos para tratar el cáncer, que comprenden administrar a un mamífero que padece cáncer una cantidad de organismos bacterianos gram-negativos no viables que tienen una reducción sustancial en la endotoxina o actividad pirogénica, en donde la cantidad administrada es suficiente para inhibir el crecimiento o metástasis del cáncer.

- 50 El o los posibles mecanismos responsables de la actividad antitumoral mediada por bacterias incluyen la proliferación selectiva de organismos bacterianos vivos en tejido tumoral y la estimulación de las respuestas inmunitarias del huésped, en particular a través de la inducción mediada por LPS (endotoxina) de liberación de citoquinas tumorocidas de células mononucleares del huésped. Sin embargo, se cree que la proliferación de bacterias vivas y la inducción mediada por LPS (endotoxina) de las citoquinas (incluso con LPS atenuado por la mutación *msbB*), se consideran responsables de la toxicidad limitante de la dosis asociada al tratamiento de mamíferos con bacterias vivas. Toso *et al.* (J. Clin. Oncol 20(1): 142-152, 2002) trataron a pacientes con cáncer con *Salmonella* atenuada con *msbB* viva y las toxicidades limitantes de la dosis incluyeron bacteriemia y efectos secundarios asociados a la liberación de citoquinas. La proliferación de bacterias en el tejido tumoral fue menor y la sensibilidad a las toxicidades mediadas por citoquinas fue mayor que la observada en los modelos de xenoinjerto de tumores humanos en ratones. Se cree que la proliferación sistémica por bacterias viables y/o toxicidades relacionadas con las citoquinas, mediadas en parte por LPS que carece de una cadena de acilo secundaria, puede evitar la administración de dosis seguras y eficaces de bacterias gram-negativas atenuadas vivas a algunos mamíferos (como seres humanos) que no sean ratones, que se sabe que son relativamente resistentes a la infección bacteriana y a las consecuencias sépticas asociadas a la inducción de citoquinas.
- 65

Aunque no se desea quedar ligado a la teoría, se cree que los organismos gram-negativos destruidos o no viables con actividad y/o pirogenicidad de endotoxina sustancialmente reducidas pueden administrarse a pacientes con cáncer en cantidades menos tóxicas y más eficaces para tratar el cáncer en comparación con el uso de organismos vivos o viables, que proliferan en los tejidos normales y tumorales de cada paciente de una manera variable que no puede ser controlada por el médico, ya sea proliferando insuficientemente para producir un efecto terapéutico o proliferando demasiado, produciendo así una toxicidad inaceptable. También se cree que los organismos gram-negativos destruidos o no viables con actividad y/o pirogenicidad de endotoxina sustancialmente reducidas pueden administrarse a pacientes con cáncer en cantidades que son menos tóxicas y más eficaces para tratar el cáncer en comparación con el uso de bacterias destruidas que expresan niveles de actividad y/o pirogenicidad de endotoxina de tipo silvestre.

También se cree que los organismos gram-negativos viables que tienen un defecto genético en la formación de LPS que da como resultado una reducción sustancial en la cantidad de lípido A glicosilado y LPS en la membrana externa de las bacterias puede ser eficaz en el tratamiento del cáncer si es administrado vivo y atenuado, para evitar una mayor proliferación en el huésped mamífero, o como organismos destruidos. Aunque dichos organismos carecen de moléculas de LPS funcionales que causan un choque endotóxico y que también proporcionan un estímulo al sistema inmunitario del huésped, se cree que existen otras características de las bacterias gram-negativas que estimularán las respuestas inmunitarias innatas o innatas combinadas y adaptativas del huésped para lograr la destrucción de células tumorales o la inhibición del crecimiento tumoral.

En una realización, los organismos gram-negativos utilizados en la terapia contra el cáncer, como se desvela en la presente memoria, no contienen ADN que codifica o expresa proteínas no bacterianas (p. ej., antígenos específicos de tumor). Los organismos gram-negativos, por lo tanto, no son una vacuna contra el cáncer ya que no inducen directamente una respuesta inmunológica específica contra un antígeno tumoral. En cambio, estos organismos funcionan como un adyuvante o modificador de la respuesta biológica (MRB) que generalmente pueden estimular la respuesta inmunitaria innata del huésped y posiblemente indirectamente una respuesta inmunitaria antitumoral adaptativa. En algunas realizaciones, los organismos gram-negativos se inyectan directamente en o cerca del sitio del tumor, o se inyectan sistémicamente y se acumulan en o cerca del tumor. El aumento de la respuesta inmunitaria innata contra los organismos puede dirigirse secundariamente contra el tumor. Además, o alternativamente, las respuestas inmunitarias contra los organismos pueden estimular o activar las células inmunitarias específicas de antígeno tumoral preexistentes capaces de participar en una respuesta antitumoral adaptativa.

En una realización alternativa, los organismos gram-negativos expresan ADN que codifica la expresión de proteínas no bacterianas que incluyen, por ejemplo, antígenos específicos de tumor o proteínas estimuladoras del sistema inmunitario. Una vez más, los organismos pueden inyectarse en o cerca del sitio del tumor, o sistémicamente, e inducir una respuesta inmunitaria innata o adaptativa contra el organismo, el antígeno específico del tumor o ambos.

Como se usa en la presente memoria, la expresión antígeno específico de tumor se refiere a un antígeno que es expresado por un tumor, pero no es expresado por ninguna célula normal del organismo del que se derivó el tumor. La expresión antígeno asociado a tumor se refiere a un antígeno que es expresado por un tumor pero que también puede ser expresado de manera limitada por células normales del organismo del cual se derivó el tumor. La forma limitada de expresión puede reflejar un nivel de expresión más bajo en células normales que el tumor, expresión por un tipo limitado de célula normal o expresión por células normales solo durante el desarrollo fetal (es decir, un antígeno fetal). Como se usa en la presente memoria, un antígeno es cualquier molécula que puede ser reconocida por una respuesta inmunitaria, ya sea un anticuerpo o una célula inmunitaria (p. ej., una célula T).

Como se usa en la presente memoria, las expresiones "adyuvante" y "modificador de la respuesta biológica" se refieren a cualquier sustancia que mejora la respuesta inmunitaria a un antígeno, tumor o célula asociada a tumor. Por lo tanto, se utiliza un adyuvante o modificador de la respuesta biológica para estimular el sistema inmunitario para que responda más vigorosamente a un antígeno extraño o una célula que causa enfermedad o está asociada a la enfermedad que expresa un nuevo antígeno, o un nivel estructuralmente alterado o anormal de un antígeno existente. Sin embargo, en algunas realizaciones, se contemplan formas recombinantes de bacterias gram-negativas que expresan, p. ej., antígenos específicos de tumor o asociados a tumor o proteínas de activación inmunitaria humana tales como citoquinas o quimiocinas para su uso en los métodos desvelados. En una realización alternativa, las proteínas de activación inmunitaria purificadas tales como citoquinas o quimiocinas se mezclan con los organismos gram-negativos antes de la administración, o se administran antes o después de los organismos gram-negativos.

Como se usa en la presente memoria, el término mamífero incluye cualquier mamífero tal como un ser humano, perro, gato, vaca, oveja y similares. Un mamífero preferido es un ser humano.

La expresión "bacterias gram-negativas" se refiere a bacterias que no retienen la tinción de tinte básico inicial (p. ej., violeta cristal) que es parte del procedimiento conocido como la tinción Gram. En una tinción Gram a modo de ejemplo, las células se fijan primero a un portaobjetos mediante calor y se tiñen con un tinte básico (p. ej., violeta cristal), que es captado por bacterias gram-negativas y gram-positivas. Los portaobjetos se tratan luego con un mordiente (p. ej., yodo de gram), que se une al tinte básico (p. ej., violeta cristal) y lo atrapa en las células. Luego,

las células se lavan acto seguido con acetona o alcohol, y luego se contratiñen con un segundo tinte de diferente color (p. ej., safranina). Los organismos gram-positivos retienen la tinción violeta inicial, mientras que los organismos gram-negativos se decoloran con el disolvente de lavado orgánico y, por ende, muestran la contratinción. Las bacterias gram-negativas a modo de ejemplo incluyen, entre otros, *Escherichia spp.*, *Shigella spp.*, *Salmonella spp.*,
 5 *Campylobacter spp.*, *Neisseria spp.*, *Haemophilus spp.*, *Aeromonas spp.*, *Francisella spp.*, *Yersinia spp.*, *Klebsiella spp.*, *Bordetella spp.*, *Legionella spp.*, *Corynebacteria spp.*, *Citrobacter spp.*, *Chlamydia spp.*, *Brucella spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Helicobacter spp.* y *Vibrio spp.*

Dentro de los organismos gram-negativos se encuentran las *Enterobacteriaceae*, una gran familia que incluye, junto
 10 con muchos simbioses inofensivos, muchos patógenos conocidos, como *Salmonella*, *E. coli*, *Yersinia pestis*, *Klebsiella* y *Shigella*, *Proteus*, *Enterobacter*, *Serratia* y *Citrobacter*. Los miembros de *Enterobacteriaceae* se han denominado enterobacterias, ya que varios miembros viven en el intestino de los animales.

Las *Enterobacteriaceae* tienen forma de bacilos, normalmente de 1 a 5 µm de longitud. Son anaerobios facultativos,
 15 fermentan azúcares para producir ácido láctico y otros productos finales. La mayoría también reduce el nitrato a nitrito y generalmente carecen de citocromo C oxidasa. La mayoría tiene muchos flagelos para la movilidad, pero algunos son inmóviles. Las *Enterobacteriaceae* no forman esporas.

El término "vector" se refiere a una molécula de ácido nucleico, que es capaz de transportar otro ácido nucleico al
 20 que está unida como una sola pieza de ácido nucleico. Los vectores capaces de dirigir la expresión de genes a los que están unidos operativamente se denominan en la presente memoria "vectores de expresión". La expresión "sistema de expresión", como se usa en la presente memoria, se refiere a una combinación de componentes que permiten que las secuencias en un vector de expresión se transcriban en ARN, se plieguen en ARN estructural o se traduzcan en las proteínas. El sistema de expresión puede ser un sistema de expresión *in vitro*, tal como está
 25 disponible comercialmente o fácilmente de acuerdo con métodos conocidos, o puede ser un sistema de expresión *in vivo*, tal como una célula huésped eucariota o procariota que contiene el vector de expresión. En general, los vectores de expresión útiles en las técnicas de ADN recombinante pueden ser "plásmidos" que generalmente se refieren a ADN bicatenario circular que, en su forma vectorial, no está unido al cromosoma bacteriano. Otros
 30 vectores de expresión bien conocidos en la técnica también pueden usarse en sistemas de expresión (p. ej., vectores de cósmidos, fagémidos y bacteriófagos).

La expresión "ácido nucleico" se refiere a polinucleótidos u oligonucleótidos tales como ácido desoxirribonucleico (ADN) y, cuando sea apropiado, ácido ribonucleico (ARN). También debe entenderse que la expresión incluye, como
 35 equivalentes, análogos de ARN o ADN fabricados a partir de análogos de nucleótidos y, según corresponda a la realización que se describe, polinucleótidos monocatenarios (sentido o antisentido) y bicatenarios.

El término "modulación", como se usa en la presente memoria, se refiere tanto a la regulación positiva (es decir, activación o estimulación (p. ej., mediante agonización o potenciación)) como a la regulación negativa (es decir, inhibición o supresión (p. ej., mediante antagonización, disminución o inhibición)). El término "inducible" se refiere en
 40 particular a la expresión génica que no es constitutiva pero que tiene lugar en respuesta a un estímulo (p. ej., temperatura, metales pesados u otro medio aditivo).

A. Organismos bacterianos candidatos

Los organismos bacterianos candidatos que pueden emplearse mediante los métodos de la presente memoria son
 45 gram-negativos y se derivan de aquellos que tienen actividad de endotoxina como organismos de tipo silvestre. Las bacterias gram-negativas a modo de ejemplo incluyen, entre otros, *Escherichia spp.*, *Shigella spp.*, *Salmonella spp.*, *Campylobacter spp.*, *Neisseria spp.*, *Haemophilus spp.*, *Aeromonas spp.*, *Francisella spp.*, *Yersinia spp.*, *Klebsiella spp.*, *Bordetella spp.*, *Legionella spp.*, *Corynebacteria spp.*, *Citrobacter spp.*, *Chlamydia spp.*, *Brucella spp.*,
 50 *Pseudomonas spp.*, *Helicobacter spp.* y *Vibrio spp.* Los organismos gram-negativos candidatos también pueden ser aquellos que pertenecen a las familias *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Neisseriaceae*, *Veillonellaceae*, *Bacteroidaceae*, *Vibrionaceae*, *Pasteurellaceae* y *Fusobacteriaceae*. En algunas realizaciones, el organismo candidato es una especie de *Salmonella* o *Escherichia spp.*

Un organismo de *Salmonella* candidato, VNP20009, ha sido descrito por Luo *et al.*, Oncol Res. 12(11-12):501-8, 2001. VNP20009 es una cepa genéticamente modificada de *Salmonella typhimurium* con delecciones en los loci *msbB* y *purl*. La administración intravenosa en dosis que varían de 1×10^4 a 3×10^6 ufc/ratón de VNP20009 vivo a
 55 ratones portadores de tumores inhibió el crecimiento del melanoma murino B16F10 implantado por vía subcutánea y los xenoinjertos de tumores humanos Lox, DLD-1, A549, WiDr, HTB177, y MDA-MB-231. VNP20009, dado por vía intravenosa también inhibió el crecimiento de metástasis pulmonar en estos animales. Véase también, la patente de Estados Unidos n.º 7.354.592 (Bermudes *et al.*).

Otro organismo de *Salmonella* candidato es SL3235 descrito por Eisenstein *et al.* Med. Oncol. 12(2):103-8, 1995. SL3235 es una cepa atenuada de *Salmonella* que cuando se administra viva puede curar un tumor de plasmacitoma
 65 que se desarrolla en ratones.

Otros candidatos de *Salmonella* incluyen mutantes auxotróficos notificados por Hoffman *et al.*, Amino Acids 37: 509-521, 2009. El mutante de *S. typhimurium* A1-R es auxotrófico para leu-arg y tiene una alta virulencia antitumoral. *In vitro*, A1-R infecta las células tumorales y causa destrucción nuclear. La administración de A1-R trata los tumores metastásicos de próstata y de mama humanos implantados ortotópicamente en ratones desnudos. A1-R administrado por vía intravenosa (i.v.) a ratones desnudos con osteosarcoma primario y metástasis pulmonar es eficaz, especialmente contra la metástasis. Asimismo, se notificó que A1-R es eficaz contra la metástasis hepática del cáncer de páncreas cuando se administra por vía intraesplénica a ratones desnudos. Véase también la publicación de patente de Estados Unidos 20090300779 (Zhao *et al.*), y Zhao *et al.* (Proc. Natl. Acad. Sci. (EE. UU.) 102(3): 775-760, 2005).

Varios organismos gram-negativos adecuados para el tratamiento de tumores sólidos es notificada en la patente de Estados Unidos n.º 6.685.935 (Pawelek *et al.*). Estos organismos se denominan superinfecciosos ya que se replican preferentemente en el tumor después de la administración. Se incluyen mutantes superinfecciosos, específicos de tumor de *Salmonella spp.*, p. ej., *Salmonella typhimurium*. También se describen mutantes superinfecciosos, específicos de tumor de *Salmonella spp.* que contiene un gen suicida como la timidina quinasa del virus del herpes simple, la citoquina desaminasa de *E. coli* o la oxidoreductasa p450 microsómica humana. Véase también Pawelek *et al.*, (Lancet Oncol. 4(9):548-56, 2003).

En una realización, *E. coli* se selecciona como el organismo. Una cepa particular contemplada es la cepa de *E. coli* 2617-143-312, (Migula) Castellani y Chalmers (ATCC® 13070™). Las cepas adicionales de *E. coli* que pueden usarse incluyen MG1655 (ATCC® 47076) y KY8284 (ATCC® 21272).

Los organismos gram-negativos utilizados en los métodos de la presente memoria no necesitan ser organismos recombinantes que contengan o expresen ADN extraño a la forma de tipo silvestre del organismo. Sin embargo, en algunas realizaciones, los organismos pueden modificarse para expresar algunas moléculas no nativas. Por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 7.452.531 notifica la preparación y uso de vectores bacterianos atenuados dirigidos a tumores para la administración de una o más moléculas efectoras primarias al sitio de un tumor sólido. De acuerdo con el método, las moléculas efectoras, que pueden ser tóxicas cuando se administran por vía sistémica a un huésped, pueden suministrarse localmente a los tumores mediante bacterias atenuadas dirigidas a tumores con una toxicidad reducida para el huésped. Específicamente, la bacteria atenuada dirigida al tumor puede ser un aerobio facultativo o anaerobio facultativo que se modifica para codificar una o más moléculas efectoras primarias. Las moléculas efectoras primarias incluyen miembros de la familia de las citoquinas del TNF, factores antiangiogénicos y polipéptidos o péptidos citotóxicos.

Las moléculas efectoras primarias de la divulgación son útiles, por ejemplo, para tratar un cáncer de tumor sólido tal como un carcinoma, melanoma, linfoma, sarcoma o metástasis derivada de estos tumores.

B. Reducción de la actividad de endotoxina bacteriana

Se pueden usar varios métodos para reducir la actividad y/o la pirogenicidad de endotoxina de los organismos bacterianos. Como se usa en la presente memoria, la expresión "actividad de endotoxina" se refiere a porciones de bacterias gram-negativas que pueden causar toxicidad, incluyendo pirogenicidad y choque séptico. Se ha descubierto que los efectos tóxicos atribuidos a la endotoxina están asociados a la porción de lípido A glicosilada de una molécula de lipopolisacárido presente en la membrana externa de bacterias gram-negativas o derivado de ella.

El término "lipopolisacárido" (LPS) se refiere a moléculas grandes que consisten en un lípido y un polisacárido (glicofosfolípido) unidos por un enlace covalente. LPS comprende tres partes: 1) O-antígeno; 2) oligosacárido central, y 3) lípido A. El O-antígeno es un polímero de glicano repetitivo unido al oligosacárido central y comprende el dominio más externo de la molécula de LPS. El oligosacárido central se adhiere directamente al lípido A y comúnmente contiene azúcares como la heptosa y el ácido 3-desoxi-D-manosotulosónico (también conocido como KDO, ceto-desoxioctulosonato). El lípido A es un disacárido de glucosamina fosforilado unido a múltiples ácidos grasos. Los ácidos grasos anclan el LPS a la membrana bacteriana, y el resto del LPS sobresale desde la superficie celular. La muerte bacteriana puede ser consecuencia si LPS es mutado o eliminado.

La actividad de endotoxina reside en la porción del dominio de lípido A de LPS. Cuando el sistema inmunitario lisa las células bacterianas, los fragmentos de membrana que contienen el lípido A se liberan en la circulación, causando fiebre (pirogenicidad), diarrea y un choque potencialmente mortal (llamado choque endotóxico o séptico). La toxicidad de LPS es expresada por el lípido A a través de la interacción con las células B y los macrófagos del sistema inmunitario de los mamíferos, un proceso que conduce a la secreción de citoquinas proinflamatorias, principalmente el factor de necrosis tumoral (TNF), que pueden tener consecuencias fatales para el huésped. El lípido A también activa los linfocitos T humanos (Th-1) "*in vitro*", así como las células T CD4+ y CD8+ murinas "*in vivo*", una propiedad que permite al sistema inmunitario del huésped incrementar una respuesta de anticuerpo IgG anamnésica específica para la cadena de carbohidratos de tamaño variable de LPS. Sobre estas bases, el LPS ha sido reconocido recientemente como un antígeno dependiente de células T "*in vivo*".

La actividad de endotoxina puede medirse mediante métodos bien conocidos en la técnica, que incluyen, por

ejemplo, el ensayo de lisado de amebocitos de *Limulus* (LAL), que utiliza sangre del cangrejo herradura, puede detectar niveles muy bajos de LPS. La presencia de la actividad de endotoxina dará como resultado la coagulación del lisado sanguíneo del *limulus* debido a la amplificación a través de una cascada enzimática. Las formas de coagulación en gel, turbidométricas y cromogénicas del ensayo LAL están disponibles comercialmente. Véase, p. ej., Lonza, Allendale, N.J., y Clongen Labs, Germantown, MD.

También se conocen ensayos de actividad de endotoxina basados en el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), como el EndoLISA® de Hyglos, área de Múnich, Alemania. Este ensayo emplea una proteína de fago específica de LPS unida a la fase sólida para capturar LPS, y después de una etapa de lavado, la presencia de LPS se determina mediante la adición de factor C recombinante, que cuando es activado por LPS, escinde un compuesto que luego emite fluorescencia. El factor C, presente en el lisado de amebocitos de *Limulus*, normalmente existe como un zimógeno, y es el cebador de la cascada de coagulación que ocurre en la prueba de LAL.

La actividad de endotoxina también se puede medir evaluando la inducción de la secreción de TNF-alfa, ya sea a partir de células mononucleares de sangre periférica primaria *in vitro*, o tratando un animal con la fuente sospechosa de endotoxina y midiendo los niveles de TNF-alfa en plasma, obtenido del animal después de aproximadamente 1 a 4 horas. Las células mononucleares de sangre periférica de mamíferos primarios se pueden adquirir en compañías como Lonza (Allendale, N.J., EE. UU.). Los niveles de TNF-alfa en el sobrenadante celular o plasma pueden determinarse con kits de ELISA, como los disponibles en Thermo Scientific (Rockford, IL, EE. UU.), Abcam (Cambridge, MA, EE. UU.) o eBioscience (San Diego, CA, EE. UU.).

La actividad de endotoxina también se puede evaluar *in vivo* midiendo la pirogenicidad (aumento de la temperatura rectal) en conejos en respuesta a organismos administrados por vía intravenosa o derivados de los mismos.

La actividad y/o pirogenicidad de endotoxina de los organismos gram-negativos puede reducirse sustancialmente en comparación con la del organismo de tipo silvestre. Una reducción sustancial en la actividad de endotoxina es más de aproximadamente 70 %, más de aproximadamente 75 %, más de aproximadamente 80 %, más de aproximadamente 85 %, más de aproximadamente 90 %, más de 95 % y más de aproximadamente 99 %. Hay varios métodos disponibles para reducir la actividad de endotoxina de los organismos gram-negativos. Los métodos incluyen el tratamiento de los organismos con un agente que se une a LPS o altera su formación, o mediante la manipulación genética del organismo bacteriano para modificar LPS o inhibir la formación de LPS.

En una realización, la reducción de la actividad o pirogenicidad de endotoxina se logra tratando los organismos bacterianos con un antibiótico que inactiva la endotoxina. Un antibiótico adecuado de este tipo es la polimixina B o la polimixina E. Por ejemplo, Cooperstock *et al.*, Infect Immun. julio de 1981; 33(1): 315-8, notifican que el tratamiento con polimixina B puede reducir la reactividad inflamatoria de LPS en vacunas de bacterias gram negativas, incluyendo *Bordetella pertussis*, *E. coli*, *Haemophilus influenzae* y *Pseudomonas aeruginosa*. Está dentro de la experiencia de un experto en la técnica determinar la cantidad de antibiótico y las condiciones para el tratamiento. En una realización, la polimixina, ya sea polimixina B o E, puede emplearse a una concentración de aproximadamente 3 microgramos a 5.000 microgramos por 1×10^7 a 5×10^{10} bacterias por mililitro. En otra realización, la concentración de polimixina puede ser de aproximadamente 200 microgramos a 5.000 microgramos por 1×10^7 a 5×10^{10} bacterias por mililitro. En una realización, el antibiótico se aplica a las bacterias durante 10 minutos a 4 horas o de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 3 horas. En una realización, las bacterias se cultivan en presencia de magnesio (Mg) en forma de $MgCl_2$ y se tratan con polimixina en presencia de $MgCl_2$, así como a una temperatura adecuada para mantener la integridad de la bacteria. En una realización, la concentración de $MgCl_2$ en el medio de crecimiento es de aproximadamente 0,5 mM a aproximadamente 5,0 mM, o aproximadamente 2 mM, y la concentración de $MgCl_2$ en el medio de tratamiento es de aproximadamente 5,0 mM a aproximadamente 30 mM, o aproximadamente 20 mM. En una realización, la temperatura del medio de tratamiento es de aproximadamente 2 °C a aproximadamente 10 °C, o aproximadamente 4 °C. La integridad bacteriana se determina por la eficiencia de recuperación en un sedimento bien definido después de la centrifugación a $3.000 \times g$ durante 10 minutos, y por microscopía electrónica. En una realización preferida, la recuperación bacteriana después del tratamiento y lavado es superior a aproximadamente 80 % y las bacterias aparecen intactas por microscopía electrónica.

En otra realización, la reducción en la actividad de endotoxina se logra tratando los organismos bacterianos con un antibiótico conocido por alterar la biosíntesis de KDO2-lípido IV_A. Por ejemplo, Goldman *et al.*, J. Bacteriol. 170(5): 2185-91, 1988 describen agentes antibacterianos, incluyendo el agente antibacteriano III, que inhibe específicamente la actividad de CTP: CMP-3-desoxi-D-mano-octulosonato citidiltransferasa y que son útiles para bloquear la incorporación de 3-desoxi-D-mano-octulosonato (KDO) en LPS de organismos gram-negativos. Cuando cesó la síntesis de LPS, cesó el crecimiento bacteriano. La adición de KDO a la especie precursora de LPS, el lípido IV_A es la principal vía de formación de lípido A-KDO tanto en *S. typhimurium* como en *E. coli*. En una realización, el antibiótico es el agente antibacteriano III y las bacterias gram-negativas se tratan con una cantidad adecuada, tal como, por ejemplo, 5 microgramos por mililitro a 500 microgramos por mililitro durante un tiempo adecuado, por ejemplo 2 a 8 horas.

Se puede lograr una reducción en la actividad de endotoxina mediante la introducción de un defecto genético en el

organismo. El término "defecto", como se usa en la presente memoria, con respecto a un gen o expresión de un gen, significa que el gen es diferente del gen normal (tipo silvestre) o que la expresión del gen está en un nivel de expresión reducido en comparación con ese del gen de tipo silvestre. El gen defectuoso puede resultar de una mutación en ese gen, o una mutación que regula la expresión de ese gen. (P. ej., transcripcional o postranscripcional).

En una realización, se puede lograr una reducción en la actividad de endotoxina mediante la introducción de un defecto genético que altera la biosíntesis de KDO2-lípido IV_A. Por ejemplo, Woodard *et al.*, publicación de patente de EE. UU. 20100272758, notifican bacterias gram-negativas no tóxicas viables (p. ej., *E. coli*) que carecen sustancialmente de LPS dentro de la membrana externa. Los autores describen la cepa K-12 de *E. coli* KPM22 como defectuosa en la síntesis del ácido 3-desoxi-d-mano-octulosónico (Kdo). KPM22 tiene una membrana externa (ME) compuesta predominantemente de lípido IV_A, un precursor de LPS que carece de glicosilación. La viabilidad de los organismos se logra mediante la presencia de un supresor de segundo sitio que transporta el lípido IV_A de la membrana interna (MI) a la membrana externa. Se notifica que este supresor alivia los efectos secundarios tóxicos de la acumulación de lípido IV_A en la membrana interna y proporciona cantidades suficientes de precursores de LPS para soportar la biogénesis de ME. Véase también, Mamat *et al.*, (Mol Microbiol. 67(3):633-48, 2008).

En otra realización, Bramhill *et al.*, publicación de patente de Estados Unidos 2011-0224097, describen bacterias gram-negativas viables que comprenden membranas externas que carecen sustancialmente de un ligando, como el lípido A o el lipopolisacárido 6-acilo que actúa como un agonista de TLR4/MD2. De acuerdo con Bramhill, las bacterias pueden comprender una actividad reducida de arabinosa-5-fosfato isomerasas y una o más mutaciones supresoras, por ejemplo, en un transportador, aumentando así la capacidad de los transportadores para transportar el lípido IVA, o en la proteína de membrana YhjD. Uno o más genes (p. ej., *lpxL*, *lpxM*, *pagP*, *lpxP* y/o *eptA*) pueden delecionarse sustancialmente y/o una o más enzimas (p. ej., *LpxL*, *LpxM*, *PagP*, *LpxP* y/o *EptA*) pueden estar sustancialmente inactivas.

En otra realización, se puede lograr una reducción en la actividad de endotoxina mediante la introducción de un defecto genético que impide la síntesis de Kdo. Por ejemplo, Rick *et al.*, (Proc Natl Acad Sci USA. 69(12): 3756-60, 1972) notifican un mutante auxotrófico de *Salmonella typhimurium* que es defectuoso en la síntesis de la región de 3-desoxi-D-manonoctulosonato (cetodeoxioctonato) del LPS y requiere D-arabinosa-5-fosfato para su crecimiento. El defecto mutante se debió a una cetodeoxioctonato-8-fosfato sintetasa (*kdsA*) alterada con una K(m) aparente para D-arabinosa-5-fosfato 35 veces mayor que la de la enzima parental. Esto causó que la cepa mutante dependiera de D-arabinosa-5-fosfato exógeno tanto para el crecimiento como para la síntesis de un LPS completo. En otro ejemplo, Belunis *et al.*, (J. Biol. Chem 270(46): 27646-27652, 1995) alteraron el gen Kdo transferasa (*kdtA*) en *E. coli*, lo que impidió la incorporación de Kdo en el lípido IV_A. Esta mutación fue letal, pero podría ser rescatada por la presencia condicional de un plásmido sensible a la temperatura que codifica *kdtA*. El desarrollo de mutantes condicionales en la vía de síntesis de Kdo permite el crecimiento de las bacterias, seguido de la transferencia a la condición no permisiva, lo que resulta en un crecimiento o supervivencia suficiente para producir bacterias no viables con una actividad de endotoxina significativamente reducida.

Además de la endotoxina derivada de LPS, varios otros componentes de organismos gram-negativos pueden inducir o contribuir a la pirogenicidad y al choque séptico, incluyendo las proteínas de la membrana externa, fimbrias, pili, lipopéptidos y lipoproteínas (revisado por Jones, M., Int. J. Pharm. Compd., 5(4): 259-263, 2001). La pirogenicidad puede medirse mediante un método de conejo, bien conocido en la técnica, que implica la evaluación de la temperatura rectal después de la administración intravenosa de pirógenos putativos.

Se ha descubierto que el tratamiento de un organismo gram-negativo con una combinación de polimixina B y glutaraldehído produjo una reducción de 30 veces en la pirogenicidad, medida en conejos. En una realización, se emplearon 1.000 microgramos por mililitro (µg/ml) de polimixina B y glutaraldehído al 1 % para producir una reducción de 30 veces en la pirogenicidad, medida en conejos. La pirogenicidad se reduce mediante una combinación de reacción de polimixina B con LPS y reactividad de glutaraldehído con LPS y/u otros constituyentes bacterianos. El glutaraldehído cumple una doble función en este entorno al destruir también las bacterias. Por lo tanto, en una realización se proporciona un método para reducir la actividad y la pirogenicidad de endotoxina y destruir un microorganismo bacteriano gram-negativo tratando dichas bacterias con una combinación de 1.000 µg/ml de polimixina B y glutaraldehído al 1 %. En otra realización, las bacterias gram-negativas se tratan con una combinación de polimixina B en un intervalo de dosis entre aproximadamente 3 µg/ml y aproximadamente 1.000 µg/ml y glutaraldehído en un intervalo de dosis entre aproximadamente 0,1 % y aproximadamente 1,0 %. En una realización adicional, el intervalo de dosis de polimixina B está comprendido entre aproximadamente 100 µg/ml y aproximadamente 1.000 µg/ml y el glutaraldehído está en un intervalo de dosis comprendido entre aproximadamente 0,5 % y aproximadamente 1,0 %. Además, las bacterias gram-negativas pueden tratarse, por ejemplo, con un intervalo de dosis de polimixina B comprendido entre aproximadamente 1.000 µg/ml y aproximadamente 3.000 µg/ml y el glutaraldehído está en un intervalo de dosis comprendido entre aproximadamente 0,5 % y aproximadamente 1,0 %. En otro aspecto, las bacterias gram-negativas pueden tratarse, por ejemplo, con un intervalo de dosis de polimixina B comprendido entre aproximadamente 3.000 µg/ml y aproximadamente 5.000 µg/ml y el glutaraldehído está en un intervalo de dosis comprendido entre aproximadamente 0,5 % y aproximadamente 2,0 %. En una realización, la actividad de endotoxina se reduce en aproximadamente 70 %, o aproximadamente 75 %, o

aproximadamente 80 %, o aproximadamente 85 %, o aproximadamente 90 %, o aproximadamente 92 %, y la pirogenicidad se reduce en aproximadamente 75 %, o aproximadamente 80 %, o aproximadamente 85 %, o aproximadamente 90 %, o aproximadamente 95 %, o aproximadamente 97 %.

5 C. Bacterias convertidas en no viables

Las bacterias para la administración de acuerdo con los métodos de la divulgación se vuelven no viables o sustancialmente no viables antes de la administración o se vuelven así después de la administración. Lo que se entiende por "no viable" es que los organismos se destruyen por un tratamiento con un agente exógeno, y/o contienen una mutación que resulta en la incapacidad de los organismos para sobrevivir en un huésped mamífero. Las bacterias sustancialmente no viables son cepas a las que se les ha reducido su viabilidad al menos en un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 % o más. En realizaciones preferidas para las bacterias que no se destruyen o no se destruyen completamente, las bacterias se tratan o modifican adicionalmente de modo que no puedan proliferarse dentro de un huésped de mamífero. En algunas realizaciones en donde LPS no se produce sustancialmente, se contempla que se administren bacterias no viables, atenuadas o viables.

Los métodos preferidos para hacer que las bacterias no sean viables son el tratamiento con un compuesto que se une a LPS, bloqueando así su actividad de endotoxina, o el tratamiento con un compuesto que interfiere con la biosíntesis de LPS. En ambos casos, la unión y la interferencia de LPS con la síntesis de LPS, la viabilidad se reduce como resultado de la permeabilización de la envoltura celular. Otro enfoque es hacer crecer cepas bacterianas con mutaciones condicionales en la vía de biosíntesis de LPS que se suprimen durante el crecimiento y luego se transfieren a una condición no permisiva que activa la mutación y altera la biosíntesis de LPS. En cada caso, el procedimiento aplicado es uno que hace que las bacterias no sean viables, determinando en cada entorno, el tiempo óptimo de tratamiento o la dosis del compuesto, de modo que la viabilidad se haya perdido sustancialmente con la retención de la integridad celular bacteriana significativa. En el caso de que la no viabilidad sea inferior al 100 %, se pueden usar bacterias que contienen una mutación que impide una mayor proliferación de bacterias viables en un huésped mamífero (p. ej., un auxótrofo de ácido diaminopimélico, descrito por Bukhari y Taylor, J. Bacteriol. 105(3): 844-854, 1971 y Curtis *et al.*, Immunol. Invest. 18(1-4):583-596, 1989).

Si se desean métodos alternativos o adicionales para hacer que las bacterias no sean viables, un método preferido para destruir bacterias es la radiación ionizante (rayos gamma o haz de electrones), pero también podría realizarse mediante otros métodos de esterilización convencional, como calor húmedo o seco, gas esterilizante o vapor (véase, p. ej., Shintani *et al.*, Biocontrol Science, 16(3): 85-94, 2011). Los métodos no convencionales adicionales de esterilización terminal que podrían usarse incluyen el tratamiento químico, tal como un esterilizante químico, y los resúmenes Rutala y Weber (Emerg. Infect. Dis. 7(2): 348-353, 2001) y Yaman (Curr. Opin. Drug Discov. Develop. 4(6):760-763, 2001). Los ejemplos de gas químico, vapor y esterilizantes líquidos incluyen gas de óxido de etileno (GOE), dióxido de cloro, fase vaporosa de peróxido de hidrógeno líquido (FPH), formaldehído, glutaraldehído (p. ej., $\geq 0,05$ % durante ≥ 10 minutos), orto-ftalaldehído (OPA) (p. ej., $\geq 0,1$ % durante ≥ 5 minutos) y fenol. Los métodos que destruyen las bacterias pueden afectar a la integridad del organismo. Por ejemplo, la adición de calor puede dañar la integridad bacteriana, en oposición al uso de radiación. La referencia a un organismo bacteriano como se usa en la presente memoria incluye el organismo completamente intacto y las formas parcialmente degradadas del organismo que pueden surgir cuando los organismos son destruidos, pero no se extienden a las fracciones subcelulares de los organismos que se han separado de otros componentes celulares, como una fracción de la pared celular (preparación) o un esqueleto de la pared celular (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 4.436.727), fracción citoplasmática y similares.

D. Composiciones

En una realización, se proporciona una composición que comprende organismos bacterianos gram-negativos no viables que tienen una reducción sustancial en la actividad y/o pirogénica de endotoxina y un excipiente farmacéuticamente aceptable. En otra realización, al menos aproximadamente el 80 % de los organismos no son viables o al menos aproximadamente el 90 % de los organismos no son viables, o aproximadamente el 100 % de los organismos no son viables. En una realización, los organismos tienen su viabilidad reducida en aproximadamente un 80 %, o en aproximadamente un 85 %, o en aproximadamente un 90 %, o en aproximadamente un 95 %, o en aproximadamente un 100 %.

En una realización, la actividad y/o pirogénica de endotoxina se reduce en aproximadamente un 70 %, o en aproximadamente un 75 %, o en aproximadamente un 80 %, o en aproximadamente un 85 %, o en aproximadamente un 90 %, o en aproximadamente un 95 %. La composición puede contener cualquier cantidad contemplada de organismos no viables o de viabilidad reducida en combinación con cualquier reducción contemplada en la endotoxina o toxicidad pirogénica. En otra realización, la composición comprende al menos aproximadamente 100 % de organismos no viables que tienen al menos aproximadamente un 95 % de actividad y pirogenicidad de endotoxina reducida.

Las composiciones descritas en la presente memoria pueden formularse de diversas maneras para su uso en los métodos descritos en la presente memoria. En una realización, la composición comprende los organismos tal como

se describen en su totalidad y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

"Vehículos farmacéuticamente aceptables" se refiere a cualquier diluyente, excipiente o vehículo que pueda usarse en las composiciones. Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen intercambiadores iónicos, alúmina, 5 estearato de aluminio, lecitina, proteínas séricas, como albúmina sérica humana, sustancias tampón, como fosfatos, glicina, ácido sórbico, sorbato de potasio, mezclas de glicéridos parciales de ácidos grasos vegetales saturados, agua, sales o electrolitos, tales como sulfato de protamina, hidrógeno fosfato disódico, hidrógeno fosfato potásico, cloruro de sodio, sales de zinc, sílice coloidal, trisilicato de magnesio, polivinilpirrolidona, sustancias a base de celulosa, polietilenglicol, carboximetilcelulosa de sodio, poliacrilatos, ceras, polímeros en bloque de polietileno- 10 polioxipropileno, polietilenglicol y grasa de lana. Los vehículos farmacéuticos adecuados se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, un texto de referencia estándar en este campo. Se seleccionan con respecto a la forma de administración prevista, es decir, comprimidos orales, cápsulas, elixires, jarabes y similares, y de acuerdo con las prácticas farmacéuticas convencionales.

15 Las composiciones farmacéuticas pueden fabricarse por métodos bien conocidos en la técnica, tales como crecimiento microbiano en fermentadores, seguido de concentración y lavado por centrifugación, filtración o diálisis, procedimientos convencionales de granulación, mezcla, disolución, encapsulación, liofilización o emulsificación, entre otros. Las composiciones pueden producirse en diversas formas, que incluyen gránulos, precipitados o 20 partículas, polvos, incluidos polvos liofilizados, secados por rotación o secados por pulverización, polvos amorfos, inyecciones, emulsiones, elixires, suspensiones o soluciones. Las formulaciones pueden contener opcionalmente estabilizadores, modificadores de pH, tensioactivos, modificadores de biodisponibilidad y combinaciones de estos.

25 Las composiciones farmacéuticas pueden prepararse como suspensiones o soluciones líquidas usando un líquido estéril, tal como aceite, agua, alcohol y combinaciones de los mismos. Se pueden añadir tensioactivos, agentes de suspensión o agentes emulsionantes farmacéuticamente adecuados para su administración oral o parenteral. Las suspensiones pueden incluir aceites, como el aceite de cacahuete, aceite de sésamo, aceite de algodón, aceite de maíz y aceite de oliva. La preparación de la suspensión también puede contener ésteres de ácidos grasos, tales como oleato de etilo, miristato de isopropilo, glicéridos de ácidos grasos y glicéridos de ácidos grasos acetilados. Las 30 formulaciones en suspensión pueden incluir alcoholes, tales como etanol, alcohol isopropílico, alcohol hexadecílico, glicerol y propilenglicol. Los éteres, como el poli(etilenglicol), los hidrocarburos de petróleo, como el aceite mineral y la vaselina, y el agua también se pueden usar en formulaciones en suspensión.

35 Las composiciones están formuladas para la administración farmacéutica a un mamífero, preferentemente un ser humano. Dichas composiciones farmacéuticas de la invención pueden administrarse de diversas maneras, incluyendo parenteralmente. El término "parenteral", como se usa en la presente memoria, incluye técnicas de inyección o infusión subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraarticular, intra-sinovial, intraesternal, intratecal, intrahepática, intralesional e intracraneal.

40 Las formas inyectables estériles de las composiciones pueden ser suspensión acuosa u oleaginosa. Estas suspensiones pueden formularse de acuerdo con técnicas conocidas en la técnica usando agentes dispersantes o humectantes y agentes de suspensión adecuados. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente parenteralmente aceptable no tóxico, por ejemplo, como una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que pueden emplearse se encuentran el agua, la solución de Ringer y la solución isotónica de cloruro de sodio. Además, los aceites fijos estériles se 45 emplean convencionalmente como disolvente o medio de suspensión. Para este fin, se puede emplear cualquier aceite fijo insípido, incluyendo mono- o diglicéridos sintéticos. Los ácidos grasos, como el ácido oleico y sus derivados de glicéridos, son útiles en la preparación de inyectables, al igual que los aceites naturales farmacéuticamente aceptables, como el aceite de oliva o el aceite de ricino, especialmente en sus versiones polioxietiladas. Estas soluciones o suspensiones de aceite también pueden contener un diluyente o dispersante de 50 alcohol de cadena larga, tal como carboximetilcelulosa o agentes dispersantes similares que se usan comúnmente en la formulación de formas de dosificación farmacéuticamente aceptables que incluyen emulsiones y suspensiones. Otros tensioactivos de uso común, como Tweens, Spans y otros agentes emulsionantes o potenciadores de biodisponibilidad que se usan comúnmente en la fabricación de formas de dosificación farmacéuticas sólidas, líquidas u otras formas, también se pueden usar para fines de formulación. Las composiciones pueden formularse 55 para administración parenteral por inyección, tal como por inyección en bolo o infusión continua.

E. Métodos para el tratamiento del cáncer

60 Los cánceres adecuados para el tratamiento mediante los métodos de la presente memoria incluyen generalmente carcinomas, leucemias o linfomas y sarcomas. Los carcinomas pueden ser del ano, vías biliares, vejiga, mama, colon, recto, pulmón, orofaringe, hipofaringe, esófago, estómago, páncreas, hígado, riñón, vesícula biliar y conducto biliar, intestino delgado, tracto urinario, tracto genital femenino, tracto genital masculino, glándulas endocrinas, tiroides y piel. Otros cánceres adecuados incluyen tumores carcinoides, tumores del estroma gastrointestinal, tumores de cabeza y cuello, tumores primarios desconocidos, hemangiomas, melanomas, mesotelioma maligno, 65 mieloma múltiple y tumores del cerebro, nervios, ojos y meninges.

En algunas realizaciones, los cánceres a tratar forman tumores sólidos, tales como carcinomas, sarcomas, melanomas y linfomas.

La terapia contra el cáncer, como se describe en la presente memoria, se logra mediante la administración de una cantidad de organismos gram-negativos (vivos o muertos, según corresponda) que sea suficiente para inhibir el crecimiento o la metástasis del cáncer. Como se emplea en la presente memoria, la expresión "una cantidad suficiente" se refiere a una dosis (o serie de dosis) suficiente para impartir un efecto beneficioso sobre el receptor de la misma. El nivel de dosis terapéuticamente efectivo específico para cualquier sujeto en particular dependerá de varios factores que incluyen el tipo de cáncer que se está tratando, la gravedad del cáncer, la actividad del organismo específico o composición combinada, la vía de administración, la tasa de eliminación del organismo o composición combinada, la duración del tratamiento, los fármacos (si los hay) utilizados en combinación con el organismo, la edad, el peso corporal, el sexo, la dieta y la salud general del sujeto, y factores similares bien conocidos en el arte de la medicina y ciencias. Los expertos en la materia conocen varias consideraciones generales tomadas en cuenta para determinar la "cantidad terapéuticamente eficaz" y se describen, p. ej., en Gilman *et al.*, Eds., Goodman y Gilman: The Pharmacological Bases of Therapeutics, 8ª ed., Pergamon Press, 1990; y Remington's Pharmaceutical Sciences, 17ª edición, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1990. Los niveles de dosificación normalmente caen en el intervalo de aproximadamente 0,001 hasta 100 mg/kg/día; con niveles en el intervalo de aproximadamente 0,05 hasta 10 mg/kg/día siendo generalmente aplicable a los compuestos. Los niveles de dosificación para organismos administrados normalmente caen en el intervalo de aproximadamente 10^6 a 10^{12} por m^2 . Una composición se puede administrar parenteralmente, tal como intravascularmente, intravenosamente, intraarterialmente, intramuscularmente, subcutáneamente, oralmente o similares. Los organismos bacterianos se pueden administrar por vía parenteral, tal como intravascularmente, intravenosamente, intraarterialmente, intramuscularmente, subcutáneamente, intraperitonealmente o intravesicamente.

Una dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse mediante métodos bien conocidos en la técnica. Los modelos animales con cáncer tales como ratones inmunocompetentes con tumores murinos o ratones inmunocomprometidos (p. ej., ratones desnudos) con xenoinjertos de tumores humanos son bien conocidos en la técnica y se describen ampliamente en muchas referencias incorporadas para referencia en la presente memoria. Dicha información se utiliza en combinación con estudios de seguridad en ratas, perros y/o primates no humanos con el fin de determinar dosis iniciales seguras y potencialmente útiles en humanos. La información adicional para estimar la dosis de los organismos puede provenir de estudios en cáncer humano actual. Por ejemplo, Toso *et al.* (J Clin Oncol. 20(1): 142-52, 2002) notifican un ensayo clínico de fase I en el que se administró VNP20009 viva a pacientes con melanoma metastásico. Los pacientes recibieron infusiones intravenosas en bolo de 30 minutos que contenían $10(6)$ a $10(9)$ ufc/m(2) de VNP20009. La dosis máxima tolerada fue $3 \times 10(8)$ ufc/m(2). Se observó toxicidad limitante de la dosis en pacientes que recibieron $1 \times 10(9)$ ufc/m(2), que incluyeron trombocitopenia, anemia, bacteriemia persistente, hiperbilirrubinemia, diarrea, vómitos, náuseas, fosfatasa alcalina elevada e hipofosfatemia.

Los organismos pueden administrarse como una formulación farmacéuticamente aceptable. La expresión "farmacéuticamente aceptable" significa un material que no es biológicamente o de otra manera indeseable, es decir, el material puede administrarse a un individuo junto con el organismo seleccionado o compuesto combinado sin causar ningún efecto biológico indeseable o interactuar de manera perjudicial con cualquiera de otros agentes administrados. Esto se ha descrito más a fondo anteriormente.

El término "tratar" a un sujeto para una afección o enfermedad, como se usa en la presente memoria, pretende abarcar la curación, así como la mejora de al menos un síntoma de la afección o enfermedad. Los pacientes con cáncer son tratados si el paciente se cura del cáncer, el cáncer entra en remisión, la supervivencia se prolonga de manera estadísticamente significativa, el tiempo para la progresión del tumor aumenta de manera estadísticamente significativa, hay una reducción en la carga tumoral linfocítica o hematopoyética de acuerdo con los criterios convencionales establecidos para cada tipo de neoplasia maligna linfocítica o hematopoyética, o la carga tumoral sólida ha disminuido de acuerdo con lo definido por los criterios de evaluación de respuesta en tumores sólidos (RECIST 1.0 o RECIST 1.1, Therasse *et al.* J. Natl. Cáncer Inst. 92(3): 205-216, 2000 y Eisenhauer *et al.* Eur. J. Cancer 45: 228-247, 2009). Como se usa en la presente memoria, "remisión" se refiere a la ausencia de células cancerosas en crecimiento en el paciente que previamente tenía evidencia de cáncer. Por lo tanto, un paciente con cáncer en remisión se cura de su cáncer o el cáncer está presente pero no es fácilmente detectable. Por lo tanto, el cáncer puede estar en remisión cuando el tumor no se agranda o se metastasia. La remisión completa, como se usa en la presente memoria, es la ausencia de enfermedad de acuerdo con lo indicado por los métodos de diagnóstico, tales como formación de imágenes, como rayos X, MRI, CT y PET, o biopsia de sangre o médula ósea. Cuando un paciente con cáncer entra en remisión, esto puede ser seguido por una recaída, donde reaparece el cáncer.

El término "sustancialmente", a menos que se indique lo contrario, significa más de aproximadamente 80 %, más de aproximadamente 90 %, más de aproximadamente 95 % y más de aproximadamente 99 %.

F. Combinaciones para el tratamiento del cáncer

Los métodos de terapia contra el cáncer descritos en la presente memoria pueden emplear la administración de organismos gram-negativos junto con uno o más antagonistas de receptores o ligandos que modulan negativamente

la respuesta inmunitaria del huésped. Los antagonistas pueden dirigirse a PD-1, PD-L1 o CTLA-4 y, por lo general, se administran por vía intravenosa, por ejemplo, en un intervalo de dosis de aproximadamente 0,03 miligramos por kilogramo a aproximadamente 30 miligramos por kilogramo cada 1 a 4 semanas.

- 5 La proteína 1 de muerte celular programada (PD-1) es una proteína que en los humanos está codificada por el gen PDCD1. PD-1 también ha sido designado como CD279 (grupo de diferenciación 279). PD-1 es una proteína de membrana tipo I de 268 aminoácidos. PD-1 es miembro de la familia extendida de reguladores de células T CD28/CTLA-4. Véase, por ejemplo, Ishida *et al.*, EMBO J. 11(11): 3887-95, 1992. Las proteínas contienen un dominio IgV extracelular seguido de una región transmembranal y una cola intracelular. La cola intracelular contiene dos sitios de fosforilación dentro de un motivo inhibidor a base del inmunorreceptor de tirosina y un motivo de cambio a base del inmunorreceptor tirosina. Esto sugiere que PD-1 regula negativamente la señalización de TCR. PD-1 se expresa en la superficie de células T activadas, células B y macrófagos. PD-1 es un amplio regulador negativo de las respuestas inmunitarias.
- 10
- 15 PD-1 tiene dos ligandos, PD-L1 y PD-L2, que son miembros de la familia B7. Véase, p. ej., Freeman *et al.*, J. Exp. Med. 192(7): 1027-34, 2000 y Latchman *et al.*, Nat. Immunol (3): 261-8, 2001. PD-L1 es una proteína transmembranal tipo 1 de 40 kDa que se ha notificado que desempeña un papel importante en la supresión del sistema inmunitario durante el embarazo, aloinjertos de tejidos, enfermedades autoinmunes y hepatitis. La proteína PD-L1 se regula positivamente en macrófagos y células dendríticas (CD) en respuesta al tratamiento con LPS y GM-CSF, y en células T y células B tras la señalización del receptor de células TCR y B. La formación de un complejo de receptor PD-1/ligando PD-L1 transmite una señal inhibidora que reduce la proliferación de células T CD8+ (durante una respuesta inmunitaria) en los ganglios linfáticos y PD-1 también puede controlar la acumulación de células T específicas de antígeno extrañas en los ganglios linfáticos a través de la apoptosis. La expresión de PD-L2 es más restringida y se expresa principalmente por células dendríticas y algunas líneas tumorales.
- 20
- 25 CTLA-4 (antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos), también conocido como CD152 (grupo de diferenciación 152), es un receptor de proteína que regula negativamente el sistema inmunitario. CTLA-4 se expresa en la superficie de las células T auxiliares, efectoras e inmunorreguladoras, que conducen el ataque inmunitario celular contra los antígenos. La célula T puede activarse estimulando el receptor CD28 o desactivarse estimulando el receptor CTLA-4. CTLA-4, como el de la proteína coestimuladora de células T, CD28, se une a CD80 y CD86, también llamadas B7-1 y B7-2, respectivamente, en las células presentadoras de antígeno. La activación de células T a través del receptor de células T y CD28 conduce a una mayor expresión de CTLA-4, un receptor inhibidor de las moléculas B7.
- 30
- 35 La mejora o prolongación de la activación de células T se ha logrado mediante anticuerpos monoclonales (mAbs) contra CTLA-4 y PD-1. Ipilimumab y tremelimumab son anticuerpos monoclonales que inhiben CTLA-4, y se ha demostrado que inducen o mejoran las respuestas inmunitarias antitumorales que conducen a efectos antitumorales duraderos. Bristol Myers Squibb vende ipilimumab (también conocido como MDX-010 o MDX-101), comercializado en los EE. UU. con el nombre de Yervoy, para el tratamiento del melanoma maligno no extirpable o metastásico. BMS-936558 (MDX-1106) es un anticuerpo monoclonal contra PD-1 y ha mostrado una actividad antitumoral significativa en ensayos clínicos en humanos. Véase, p. ej., Brahmer *et al.*, J. Clin. Oncol., 28(19): 3167-3175, 2010, Brahmer *et al.*, N. Engl. J. Med., 366(26): 2455-2465, 2012; y Lipson *et al.*, Clin. Can. Res. 19(2):462-468, 2013.
- 40
- 45 La inhibición de CTLA-4 también puede lograrse mediante una proteína de fusión (CTLA4Ig) compuesta de CTLA-4 y Fc de la cadena pesada de inmunoglobulina (Ig). Véase, p. ej., Park *et al.*, Pharm Res. 20(8):1239-48, 2003.
- 50 Un importante regulador negativo adicional de la respuesta inmunitaria en el microambiente tumoral es el transductor de señal y activador del factor de transcripción sensible a la señal de transcripción (STAT) STAT3. La actividad de este factor es elevada en el tumor y en las células inmunes asociadas. La actividad de STAT3 en las células tumorales contribuye a una mayor supervivencia, proliferación, invasión y metástasis, así como a la estimulación de la angiogénesis. La actividad STAT3 elevada en las células inmunes conduce a la acumulación y activación de células inmunosupresoras, como Treg, Th17 y células supresoras derivadas de mieloides dentro del microambiente tumoral. Véase, p. ej., Rébé *et al.* (JAK-STAT 2(1):e23010-1-10, 2013) para su revisión. Se ha demostrado que los fármacos para la diabetes tipo 2 ampliamente utilizados metformina y fenformina tienen actividad antitumoral y se cree que el mecanismo incluye la inhibición de la actividad STAT3, lo que resulta en una disminución de la inmunosupresión antitumoral. Véase, p. ej., Deng *et al.*, (Cell Cycle 11(2): 367-376, 2012), Hirsch *et al.*, (Proc. Natl. Acad. Sci., EE. UU. 110(3): 972-977, 2013), Appleyard *et al.*, (British J Cancer 106: 1117-1122, 2012), Jiralerspong *et al.*, (J Clin Oncol. 27(20): 3297-3302, 2009), y Del Barco *et al.*, (Oncotarget 2(12): 896-917, 2011) para su revisión. Los métodos de terapia contra el cáncer descritos en la presente memoria pueden emplear la administración de organismos gram-negativos junto con un inhibidor de la expresión o actividad de STAT3. Dichos inhibidores pueden incluir metformina y fenformina. La metformina se puede administrar, por ejemplo, en un intervalo de dosis de entre aproximadamente 50 miligramos y aproximadamente 1.000 miligramos, generalmente de 1 a 3 veces por día. La fenformina se administra normalmente en un intervalo de dosis de entre aproximadamente 20 miligramos y aproximadamente 800 miligramos de 1 a 2 veces por día.
- 60
- 65 Los métodos de terapia contra el cáncer descritos en la presente memoria también pueden emplear la administración de organismos gram-negativos junto con uno o más agonistas de receptores o ligandos que modulan

positivamente la respuesta inmunitaria del huésped. Los agonistas se dirigen a 4-1BB (CD137), GITR, CD40 u OX40 (CD134) y pueden administrarse, por ejemplo, por vía intravenosa en un intervalo de dosis de entre aproximadamente 0,03 miligramos por kilogramo a aproximadamente 30 miligramos por kilogramo cada 1 a 4 semanas.

La proteína relacionada con el receptor del factor de necrosis tumoral inducible por glucocorticoides (TNFR) (GITR), 4-1BB (CD137), CD40 y OX40 (CD134) son miembros de la familia TNFR coestimuladores que se expresan en las células T reguladoras y efectoras, así como en otras células del sistema inmunitario. La activación de estas proteínas conduce a la estimulación o mejora de la función inmunitaria. Los anticuerpos monoclonales activadores para cada una de estas proteínas han exhibido actividad antitumoral en modelos preclínicos y han entrado en desarrollo clínico. Véase, por ejemplo, Melero *et al.*, Clin. Cancer Res. 15(5): 1507-1509, 2009, Garber, JNCI-103 (14): 1079-1082, 2011, Khong *et al.*, Int. Rev. Immunol 31(4): 246-266, 2012, Vinay y Kwon, Mol. Cancer. Ther. 11(5): 1062-1070, 2012, Snell *et al.*, Immunol. Rev. 244(1): 197-217, 2011, y So *et al.*, Cytokine Growth Factor Rev. 19(3-4):253-262, 2008.

Los métodos de terapia contra el cáncer descritos en la presente memoria también pueden emplear la administración de organismos gram-negativos junto con uno o más agentes quimioterapéuticos. Dichos agentes pueden incluir ciclofosfamida. Se contempla que cuando se usa ciclofosfamida en los métodos descritos en la presente memoria, se puede administrar en una dosis de entre 5 mg/m² a 750 mg/m² por vía intravenosa u oral diariamente o cada 21 días. Alternativamente, la ciclofosfamida se puede administrar, por ejemplo, en un régimen metronómico a una dosis de entre 5 mg y 100 mg por vía oral al día. Véase, por ejemplo, Jia *et al.*, Int. J. Cancer 121(3): 666-674, 2007.

La estimulación de las respuestas inmunitarias antitumorales ha sido demostrada con varias citoquinas. Véase, por ejemplo, Smyth *et al.*, Immunological Rev. 202: 275-293, 2004 y Kim-Schulze, Surg. Oncol Clin N. Am. 16: 793-818, 2007 para revisiones. Los métodos de terapia contra el cáncer descritos en la presente memoria también pueden emplear la administración de organismos gram-negativos junto con citoquinas recombinantemente expresadas o aisladas y purificadas, tales como interferón alfa, interferón beta, interferón gamma, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos, interleucina-2 e interleucina-12.

Los métodos de terapia contra el cáncer descritos en la presente memoria también pueden emplear bacterias gram-negativas administradas junto con interferón alfa purificado o aislado de forma recombinante. El interferón alfa puede administrarse por vía subcutánea, intramuscular o intravenosa en un intervalo de dosis de aproximadamente 3 x 10⁵ a aproximadamente 3 x 10⁸ UI 1, 3, 5 o 7 veces por semana. En otra realización, las bacterias gram-negativas pueden administrarse junto con interferón beta. En ciertas realizaciones, el interferón beta se administrará por vía subcutánea o intravenosa en un intervalo de dosis de entre aproximadamente 0,01 miligramos y aproximadamente 5 miligramos, ya sea una vez a la semana o cada dos días. El interferón gamma también puede administrarse conjuntamente. En una realización, el interferón gamma puede administrarse por vía subcutánea o intravenosa en un intervalo de dosis de entre aproximadamente 1 x 10⁵ UI a aproximadamente 1 x 10⁹ UI una vez o diariamente.

En métodos adicionales, se pueden coadministrar interleucinas (p. ej., interleucina-2 e interleucina-12). En una realización, las interleucinas pueden administrarse por vía intravenosa en una dosis de entre aproximadamente 1 x 10⁴ y aproximadamente 1 x 10⁷ UI una vez por semana o hasta tres veces al día en combinación con bacterias gram-negativas. Los métodos adicionales incluyen la administración de bacterias gram-negativas, por ejemplo, con factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos, ya sea por vía subcutánea, intradérmica o intravenosa, normalmente en un intervalo de dosis de entre aproximadamente 5 microgramos y aproximadamente 5 miligramos, ya sea diariamente o mensualmente. En cualquiera de los tratamientos combinados observados en todas partes, se contempla que los organismos puedan administrarse antes o después del tratamiento adicional contra el cáncer. También se pueden administrar simultáneamente.

Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar la presente divulgación. Estos ejemplos no pretenden en modo alguno limitar el alcance de la divulgación.

Ejemplos

Ejemplo 1:

Las condiciones óptimas para la inactivación de la actividad de endotoxina asociada a lipopolisacáridos y a la destrucción de células bacterianas por polimixina B sin pérdida de integridad celular se determinan para cada cepa bacteriana incubando bacterias en unidades logarítmicas concentradas tardía (10⁹ a 10¹¹ por ml) a 37 °C en solución salina tamponada con fosfato (PBS) con 1-100 µg/ml de polimixina B durante varios tiempos entre 2 minutos y 6 horas. La viabilidad se determina mediante una dilución en serie de placas de control y suspensiones bacterianas tratadas en placas de agar compatibles con el crecimiento, seguido de incubación durante la noche y recuento de colonias. La integridad celular se determina mediante un examen visual (microscopio) y un análisis de absorbancia a 600 nm. La actividad de endotoxina se determina mediante el ensayo de lisado de amebocitos de Limulus (LAL). La polimixina soluble o en exceso y los restos celulares, incluida la endotoxina soluble, se eliminan mediante lavado

mediado por centrifugación con NaCl al 0,9 % (solución salina normal).

Alternativamente, las condiciones óptimas para el aislamiento de bacterias intactas no viables con LPS defectuoso, como resultado de una mutación condicional, se determinan como se describe para el tratamiento con polimixina, excepto que las bacterias se cultivan en medio LB (caldo de lisogenia) en condiciones no permisivas y eliminada en varios momentos, seguido de análisis y procesamiento como se describe para el tratamiento con polimixina.

Las bacterias tratadas con polimixina o las bacterias mutantes/defectuosas de LPS de fase con unidades logarítmicas tardías lavadas con solución salina se liofilizan usando trehalosa como crioprotector (véase, p. ej., Leslie *et al.*, App. Environment. Microbiol 61(10): 3592-3597, 1995; Gu *et al.*, J. Biotech. 88:95-105, 2001 y American Type Culture Collection Bacterial Culture Guide). Si se desea, la viabilidad bacteriana se reduce aún más mediante el tratamiento con radiación ionizante a una dosis suficiente para reducir la viabilidad al 0 %, sin pérdida de integridad bacteriana.

Las bacterias liofilizadas se vuelven a suspender en agua estéril antes de su uso en estudios antitumorales. Las células tumorales murinas lavadas con PBS (melanoma B16 y B16F10, carcinoma colorrectal CT-26, carcinoma pancreático Panc02 o carcinoma de pulmón de Lewis (10^5 - 10^7 células, dependiendo de la estirpe celular) se implantan subcutáneamente en la parte posterior de los ratones C57BL/6 afeitados. Los ratones se asignan al azar y el tratamiento se inicia cuando los tumores pueden palparse por primera vez, cuando los tumores han alcanzado un volumen promedio de 75 mm³ o cuando los tumores han alcanzado un volumen promedio de 300 mm³ (de acuerdo con lo estimado por la medición del calibre). Las bacterias resuspendidas se inyectan una o dos veces por semana a través de la vena de la cola o intraperitonealmente (i.p.) en dosis individuales que varían de 10^3 a 10^{10} por volumen de inyección de 0,1-0,2 ml. Los antagonistas o agonistas de anticuerpos dirigidos a los receptores de células T se administran i.p. a dosis individuales de 3-100 microgramos una o dos veces por semana. La ciclofosfamida se administra i.p. hasta 150 mg/kg cada dos días durante 5 días (dosificación de MTD) o a 25 mg/kg por día en el agua potable (dosificación metronómica). Los ratones se pesan dos veces por semana y se registran las observaciones clínicas. Las mediciones tumorales (por calibrador) se llevan a cabo dos veces por semana y los ratones se sacrifican humanamente si/cuando los tumores alcanzan 1.000 mm³, se vuelven necróticos o si se observa una pérdida de peso de ≥ 15 %. Se extirpan los tumores y se pesan, y se realiza una necropsia mínima con ratones sacrificados. Los ratones pueden volverse a estimular con la implantación de células tumorales si se observa una regresión o curas del tumor a largo plazo.

Ejemplo 2:

En el Ejemplo 2, se usó la cepa de *E. coli* 2617-143-312 (Migula) Castellani y Chalmers (ATCC® 13070™). Esta bacteria gram-negativa no peligrosa requiere ácido diaminopimélico exógeno (DAP) para su crecimiento. Como los mamíferos no producen DAP, esta cepa bacteriana no es viable y no puede causar infecciones en los mamíferos. Además, la auxotrofia de DAP se puede utilizar para controlar la contaminación durante los estudios *in vitro*. Las bacterias se cultivaron hasta la fase logarítmica tardía (basada en D.O 600) en caldo Miller LB con MgCl₂ 2 mM, glucosa al 0,5 % y DAP 1 mM a 37 °C con agitación constante a 300 rpm. El cultivo se lavó tres veces por centrifugación a 2.000 x g durante 15 minutos y resuspensión en caldo LB Miller a 4 ° que contenía MgCl₂ 20 mM, glucosa al 0,5 % y DAP 0,1 mM (medio de tratamiento con PMB). La resuspensión final se realizó a 2×10^{10} bacterias por ml, basándose en D.O 600 de 1 igual a $1,12 \times 10^9$ bacterias por ml. Se incubaron alícuotas individuales del cultivo sin y con diversas concentraciones de polimixina B (PMB) (Calbiochem n.º 5291) durante 1 hora a 4 °C con agitación constante. Luego se lavaron las bacterias tres veces con medio de tratamiento PMB reciente a 4 °C por centrifugación a 3.000 x g durante 10 minutos y se resuspendieron a 2×10^9 bacterias por ml. La eficacia de recuperación de bacterias se controló siguiendo D.O 600. La recuperación de bacterias después del tratamiento con PMB y el lavado fue superior al 90 % para todas las muestras tratadas con hasta 300 µg/ml de PMB, y excedió el 80 % para el tratamiento con 1.000 µg/ml de PMB.

En la Fig. 1, la actividad de endotoxina se determinó analizando diluciones en serie de cultivos bacterianos no tratados y tratados con el kit de ensayo cinético Endochrome-K Endosafe de lisado de amebocitos de Limulus (LAL) (Charles River Endosafe, Charleston, SC). Los cultivos no tratados normalmente contenían aproximadamente 50-100 unidades de endotoxinas por 1×10^6 bacterias. Se observaron reducciones de endotoxina similares para el tratamiento con 1.000 µg/ml de PMB en cuatro experimentos independientes (promedio = 17 % de no tratados).

En la Fig. 2, la viabilidad bacteriana se determinó diluyendo en serie y cultivando en placas cada muestra en placas de agar LB Miller que contenían MgCl₂ 2 mM, glucosa al 0,5 %, con y sin DAP 1 mM (para controlar la viabilidad y la contaminación, respectivamente). Las placas se incubaron durante la noche a 37 °C, se determinó el número de colonias en cada placa y luego se calculó la viabilidad multiplicando el número de colonias en cada placa por el factor de dilución. El número total de bacterias en cada suspensión se calculó multiplicando la D.O 600 por el factor de conversión de $1,12 \times 10^9$ bacterias/ml por D.O 600 de 1. La viabilidad (% de bacterias vivas) se calculó como el porcentaje de bacterias viables/ml en relación con el número total de bacterias. El tratamiento con 1.000 µg/ml de PMB redujo la viabilidad bacteriana al 0 %. En experimentos de ampliación posteriores, 1.000 µg de PMB redujeron la viabilidad a un promedio del 11 % en cuatro experimentos independientes.

Ejemplo 3:

Los experimentos se llevaron a cabo como se describe en el Ejemplo 2, excepto que los lavados previos al tratamiento, el tratamiento con glutaraldehído (GA) y los lavados posteriores al tratamiento se realizaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS; libre de Mg y Ca) pH 7,5, que contiene MgCl_2 20 mM. La recuperación de bacterias después del tratamiento con GA, en todas las concentraciones sometidas a ensayo, fue normalmente del 80-100 %. La Figura 3 demuestra que el tratamiento con GA al 1 % redujo la actividad de endotoxinas en un 96 %. Un experimento de ampliación de 2 litros con tratamiento con GA al 1 % produjo una reducción de la actividad de endotoxina del 82 %, en relación con el cultivo no tratado.

El tratamiento con GA produjo constantemente el 100 % de destrucción de bacterias a dosis superiores al 0,05 %, como se demuestra en la Figura 4.

La combinación de un tratamiento de 1.000 $\mu\text{g/ml}$ con PMB seguido de un tratamiento con GA al 1 % usando 2 litros de cultivo en fase logarítmica tardía produjo bacterias con 0 % de viabilidad y una reducción del 92 % (12 veces) en la actividad de endotoxina, en relación con el cultivo no tratado (Tabla 1).

Ejemplo 4:

En el Ejemplo 4, las bacterias se cultivaron y se trataron con 1.000 $\mu\text{g/ml}$ de PMB, GA al 1 % o ambos como se describe en los protocolos para los Ejemplos 2 y 3. Las muestras se diluyeron con PBS, pH 7,5 que contenía GA al 1 % (si no se expuso previamente a GA) y se fijaron durante 10 minutos. Se colocaron gotas de veinticinco microlitros que contenían las bacterias en parafina y luego se cubrieron con una rejilla de formvar de malla 100 + EM carbono (EMS, Hatfield, PA), que se recubrió previamente con poli-L-lisina al 0,1 %. Las muestras se dejaron adherir durante 10 minutos y luego las rejillas se lavaron brevemente tres veces mediante la colocación en gotas de agua de 200 microlitros. Las rejillas se tiñeron negativamente por colocación durante 1 minuto en gotas de 100 microlitros de acetato de uranilo al 2 % en agua. El exceso de tinción se eliminó con papel de filtro 3M, seguido de secado al aire. Las muestras se visualizaron utilizando un microscopio electrónico de transmisión FEI Tecnai Spirit G2 BioTWIN equipado con una cámara digital Eagle 4k (16 megapíxeles) de montaje de fondo (aumentos de 1.200x y 11.000x). Las imágenes en las Figuras. 5B, 5C y 5D confirman que los tratamientos con PMB y/o GA llevados a cabo de acuerdo con los métodos actuales dejan las bacterias intactas, lo cual es un resultado deseable. Una cápsula de polisacárido es visible (superficie difusa) en las bacterias no tratadas (Figura 5A), pero parece haber sido eliminado o fusionado en todas las bacterias tratadas (Figuras 5B, 5C y 5D).

Ejemplo 5:

Para el Ejemplo 5, se cultivaron *E. coli* y se trataron con 1.000 $\mu\text{g/ml}$ de PMB más GA al 1 %, y se determinaron los niveles de viabilidad y endotoxina como se describe para los Ejemplos 2 y 3. Después del lavado final, las bacterias no tratadas y tratadas con PMB + GA se resuspendieron en PBS al 50 %, pH 7,5, MgCl_2 0,5 mM, trehalosa al 12 % a una concentración de $1,1 \times 10^{11}$ bacterias por ml, se dividieron en alícuotas, se congelaron rápidamente y se almacenaron a -80 °C. El umbral de pirogenicidad se determinó esencialmente como se describe en la Farmacopea de los Estados Unidos, Capítulo 151. Se utilizaron conejos blancos hembra de Nueva Zelanda adultos que pesaban al menos 2,0 kg. Todos los animales fueron condicionados con una prueba simulada no más de 7 días antes de la prueba de pirógenos. La búsqueda del intervalo de dosis se realizó con un conejo por dosis y estos resultados se confirmaron posteriormente con dos conejos por dosis. Las bacterias se diluyeron en solución salina estéril para inyección. Todas las dosis se administraron por vía intravenosa en un volumen de 10 ml. Se consideró que la concentración más baja de agente de prueba que producía un aumento de la temperatura de 0,5-1,0 °C en cualquier momento dentro de las tres horas posteriores a la administración del agente de prueba representaba el umbral de pirogenicidad. Las temperaturas rectales se registraron al inicio y a intervalos de 30 minutos entre 1 y 3 horas después de la inyección del agente de prueba. Se demostró que el vehículo diluido con solución salina utilizado para el almacenamiento de *E. coli* no tratada y tratada no era pirógeno. La administración de 3×10^4 bacterias no tratadas a dos conejos produjo aumentos de temperatura de 0,8 y 1,0 °C. La administración de 3×10^5 bacterias tratadas con PMB + GA no produjo un aumento de temperatura de más de 0,1 °C, pero la administración de 9×10^5 bacterias tratadas con PMB + GA a dos conejos produjo aumentos de temperatura de 0,7 y 1,0 °C, lo que demuestra una diferencia umbral de pirogénesis de 30 veces. Es probable que PMB neutralice solo la actividad pirogénica mediada por lipopolisacáridos. Mientras que GA puede neutralizar la pirogenicidad mediada por lipopolisacárido, así como por otros constituyentes de la bacteria.

La Tabla 1 demuestra el umbral de pirogenicidad (reacción febril) para bacterias no tratadas y bacterias tratadas con 1.000 $\mu\text{g/ml}$ de PMB y GA al 1 %, conforme lo medido por una prueba convencional de conejo *in vivo*. Los resultados se comparan con los niveles de endotoxina determinados con el ensayo LAL *in vitro*, lo que demuestra que aunque el tratamiento con PMB + GA reduce los niveles de endotoxina en 12 veces, la pirogenicidad mediada por la misma muestra se reduce en 30 veces, en comparación con las bacterias no tratadas.

Tabla 1

Tratamiento	Bacterias vivas	Ensayo LAL de la actividad de endotoxina	Ensayo de conejo de umbral de pirogenicidad
Sin tratamiento	83 %	44,7 unidades/10 ⁶ bacterias	3x10 ⁴ bacterias
PMB + GA	0 %	3,6 unidades/10 ⁶ bacterias	9x10 ⁵ bacterias
Reducción máx.		12X	30X

Ejemplo 6:

- 5 En el Ejemplo 6, *E. coli* se cultivó y se trató con 1.000 µg/ml de polimixina B más GA al 1 % como se describe en los protocolos para los Ejemplos 2 y 3. Las soluciones madre congeladas de bacterias no tratadas y tratadas se descongelaron rápidamente a 37 °C y se diluyeron al menos 10 veces en solución salina estéril para inyección (dosis i.v. ≤ 3 x 10⁹ bacterias) o se centrifugaron a 3.000 x g durante 10 minutos y se volvieron a suspender en solución salina estéril para inyección (dosis i.v. ≥ 5 x 10⁹). Se inyectaron bacterias o vehículos i.v. a través de la vena de la cola en un volumen de 100 microlitros.

10 Se utilizaron ratones hembra C57BL/6 o BALB/c de ocho semanas de edad y se aclimataron durante al menos 7 días antes de los estudios. La mortalidad y las observaciones clínicas se realizaron una o dos veces por día. Se hicieron observaciones adicionales en el momento y 1-4 horas después de las inyecciones. Se confirmó la falta de toxicidad por parte de los vehículos. Las observaciones del lado de la jaula incluyeron, pero no se limitaron a lo siguiente:

15 Cambios en la piel, pelaje, ojos, membranas mucosas, modo de andar, postura y respuesta al manejo de la ocurrencia de secreciones/excreciones u otra evidencia de actividad autónoma como lagrimeo, piloerección, patrones respiratorios inusuales; presencia de convulsiones; cambios en el estado de alerta general; comportamientos estereotipados, tales como acicalado excesivo y caminado en círculos repetitivo; comportamientos inusuales (automutilación); desarrollo de bultos/protuberancias (tumor, absceso, etc.); desarrollo de signos de estrés y/o síntomas respiratorios; observación de los sitios de inyección para detectar signos de irritación e inflamación; cambios en el consumo de alimento y agua y en la producción de orina y heces.

25 La administración de bacterias para estudios de dosis múltiples se realizó dos veces por semana durante dos semanas (4 tratamientos). La evaluación de la toxicidad incluyó el monitoreo del peso del animal. Los ratones utilizados en el estudio de dosis múltiples notificados para bacterias tratadas con PMB + GA a 1 x 10⁹ portaban tumores. Todos los demás ratones notificados en la Tabla 2 no portaban tumores.

Tabla 2

Tratamiento bacteriano	Dosis	Observaciones de la dosis única	Observaciones de dosis múltiples (4)
Sin tratar	3x10 ⁸	Ligeramente letárgico en 1-4 h	Ligeramente letárgico en 1-4 h
	1x10 ⁹	Letárgico en 1-4 h	Letárgico en 1-4 h, 2 de 3 ratones murieron tras la 4ª dosis
	5x10 ⁹	Letárgico en 1-48 h Muerto a las 72 h	ND*
	1x10 ¹⁰	Muerto a las 18 h	ND
PMB + GA	1x10 ⁹	Ligeramente letárgico en 1-4 h	Ligeramente letárgico en 1-4 h, pelaje erizado
	3x10 ⁹	Ligeramente letárgico en 1-4 h	Ligeramente letárgico, letárgico o pelaje erizado hasta 4 horas postratamiento
	5x10 ⁹	Ligeramente letárgico en 1-4 h	Ligeramente letárgico, letárgico o pelaje erizado hasta 4 horas postratamiento
	1x10 ¹⁰	Severamente letárgico, 1 de 3 ratones murieron a las 24 h	Letárgico, ligeramente letárgico, pelaje erizado y/o respiración superficial
*ND = no determinado			

Ejemplo 7:

- 35 En el Ejemplo 7, se prepararon 1.000 µg/ml de PMB + bacterias tratadas con GA al 1 % (DB103) como se describe en los protocolos para los Ejemplos 2 y 3. Se afeitaron ratones hembra C57BL/6J de ocho semanas de edad en el sitio de inyección y se inyectaron por vía subcutánea en el flanco derecho 2 x 10⁵ células de melanoma murino B16F10 (ATCC CRL-6475). Los tratamientos se iniciaron a través de la vena de la cola por administración i.v. tres días después y continuaron dos veces por semana para un total de 5 tratamientos. DB103 en PBS al 50 %, pH 7,5, MgCl₂ 0,5 mM, trehalosa al 12 % a una concentración de 1,1 x 10¹¹ por ml se diluyeron 11 veces (dosis 1 x 10⁹) o 220 veces (5 x 10⁷ dosis) con solución salina estéril e inyectada en un volumen final de 100 microlitros. El vehículo original se diluyó 11 veces para el grupo de tratamiento de control del vehículo. Los tumores se midieron con calibradores dos veces por semana y el volumen del tumor se determinó usando la fórmula (longitud x ancho²)/2. No

se observaron muertes relacionadas con compuestos. Todos los animales desarrollaron tumores, con la excepción de dos animales tratados con 1×10^9 DB103. Se observó una pérdida transitoria de peso corporal de hasta el 3 % (grupo de dosis baja) y el 7 % (grupo de dosis alta), pero se recuperó después del último tratamiento (Figura 6).

5 Ejemplo 8:

Para el Ejemplo 8, se prepararon *E. coli* (sin tratar y tratada con GA al 1 %) como se describe en los protocolos para los Ejemplos 2 y 3. El experimento se llevó a cabo como se describe en el protocolo del Ejemplo 7, excepto que el tratamiento se inició el día 11 cuando los tumores eran palpables. Las mediciones grupales no se registraron después del día 24 para la mayoría de los grupos ya que un subconjunto de animales en cada uno de estos grupos tuvo que ser sacrificado debido a la carga tumoral. Se formaron tumores en todos los animales. La pérdida máxima de peso en el grupo 1×10^9 GA fue del 11 %. La toxicidad impidió la administración de 1×10^9 *E. coli* no tratada (véase la Tabla 2).

15 Ejemplo 9:

En el Ejemplo 9, se prepararon bacterias tratadas con 1.000 µg de PMB + GA al 1 % (DB103) como se describe en los protocolos para los Ejemplos 2 y 3. El experimento se llevó a cabo como se describe en el protocolo del Ejemplo 7, excepto que se inyectaron 1×10^5 células murinas de carcinoma colorrectal CT26 por vía subcutánea en el flanco derecho de ratones BALB/c. Los tratamientos con DB103 se iniciaron a través de la vena de la cola por administración i.v. tres días después y continuaron dos veces por semana para un total de 6 tratamientos. La ciclofosfamida (LKT Laboratories, n.º C9606) se administró a través del agua potable continuamente, comenzando el día 3, a ~20 mg/kg / día (0,133 mg/ml en agua). El anticuerpo CTLA-4 anti-murino (BioXcell n.º BE0164), 100 µg en 200 microlitros de PBS, se administró i.p. en los días 3, 6 y 9. Las observaciones clínicas y la mortalidad se registraron diariamente. Los tumores se midieron con calibre dos veces por semana y el volumen del tumor se determinó con la fórmula $(\text{longitud} \times \text{ancho}^2)/2$. Se formaron tumores en todos los ratones del grupo de vehículos. No se observó pérdida de peso ni muertes relacionadas con compuestos en ningún grupo. Los datos para los grupos vehículo, dosis baja y dosis alta DB103 son los mismos en las Figuras 8A y 8B. Todas las patentes y publicaciones mencionadas en la memoria descriptivas son indicativas de los niveles de los expertos en la materia a los que se refiere la divulgación.

La divulgación ilustrativamente descrita en la presente memoria puede ponerse en práctica adecuadamente en ausencia de cualquier elemento o elementos, limitación o limitaciones que no se describen específicamente en la presente memoria. Así, por ejemplo, en cada caso de la presente memoria, cualquiera de los términos "que comprende", "que consiste esencialmente en" y "que consiste en" puede reemplazarse por cualquiera de los otros dos términos. Los términos y expresiones que se han empleado se usan como términos de descripción y no de limitación, y no existe la intención de que al usar dichos términos y expresiones se excluya cualquier equivalente de las características mostradas y descritas o partes de las mismas, pero se reconoce que son posibles varias modificaciones dentro del alcance de las reivindicaciones. Por lo tanto, debe entenderse que aunque la presente divulgación se ha descrito específicamente por realizaciones preferidas y características opcionales, los expertos en la materia pueden recurrir a la modificación y variación de los conceptos descritos en la presente memoria. Otras realizaciones se exponen dentro de las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Una composición, que comprende (a) células bacterianas gram-negativas intactas y sustancialmente no viables, que han sido tratadas de manera que conlleve a una reducción de más del 70 % de la actividad endotoxínica derivada de los lipopolisacáridos (LPS), cuando se mide mediante el ensayo del lisado de amebocitos de Limulus (LAL) en comparación con las células no tratadas y (b) un excipiente farmacéuticamente aceptable.
2. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que al menos el 90 % o el 100 % de las células bacterianas son no viables.
3. La composición de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en donde las células bacterianas tienen una reducción de al menos el 90 % de la actividad endotoxínica derivada de los LPS, cuando se mide mediante el ensayo LAL en comparación con las células no tratadas.
4. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que el tratamiento es con polimixina B o con polimixina E.
5. La composición de acuerdo con la reivindicación 4, en la que el tratamiento es con polimixina B o con polimixina E a una concentración de aproximadamente 200 microgramos a 5.000 microgramos por 1×10^7 a 5×10^{10} células bacterianas por mililitro.
6. La composición de acuerdo con las reivindicaciones 4 o 5, en la que las células bacterianas se han cultivado en presencia de $MgCl_2$ y tratado con la polimixina B o con polimixina E en presencia de $MgCl_2$.
7. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4-6, en la que el tratamiento es a una temperatura de aproximadamente 2 °C a aproximadamente 10 °C.
8. La composición de acuerdo con la reivindicación 7, en la que el tratamiento es a una temperatura de aproximadamente 4 °C.
9. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que el tratamiento es con polimixina y con glutaraldehído.
10. La composición de acuerdo con la reivindicación 9, en la que el tratamiento es con polimixina B a un intervalo de dosis que varía de aproximadamente 3 µg/ml a aproximadamente 1.000 µg/ml y con glutaraldehído a un intervalo de dosis de aproximadamente el 0,1 % a aproximadamente el 1,0 %.
11. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en la que las células bacterianas son células de *Salmonella* o de *Escherichia*.
12. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en la que las células bacterianas contienen ADN, que codifica o expresa una proteína no bacteriana, que es preferentemente un antígeno tumoral o una proteína estimulante del sistema inmunitario.
13. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 para su uso en el tratamiento del cáncer.
14. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 13, en donde la composición comprende además (a) un antagonista de un receptor de células T o un ligando de receptor de células T, que inhiben una función inmunitaria, seleccionados entre el grupo que consiste en CTLA-4, PD-1, PD-L1 y PD-L2, (b) un inhibidor de STAT3 seleccionado entre el grupo que consiste en metformina y fenformina, (c) un agonista de un receptor de células T que estimula una función inmunitaria seleccionado entre el grupo que consiste en GITR, 4-1BB, CD40 y OX40, (d) un agente quimioterapéutico que es preferentemente ciclofosfamida o (e) una citoquina que es preferentemente seleccionada entre el grupo que consiste en interferón-alfa, interferón-beta, interferón-gamma, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos, interleucina-2 e interleucina-12.
15. La composición para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 13 o 14, en donde el cáncer se selecciona entre linfoma o carcinoma de colon, recto, páncreas o hígado.

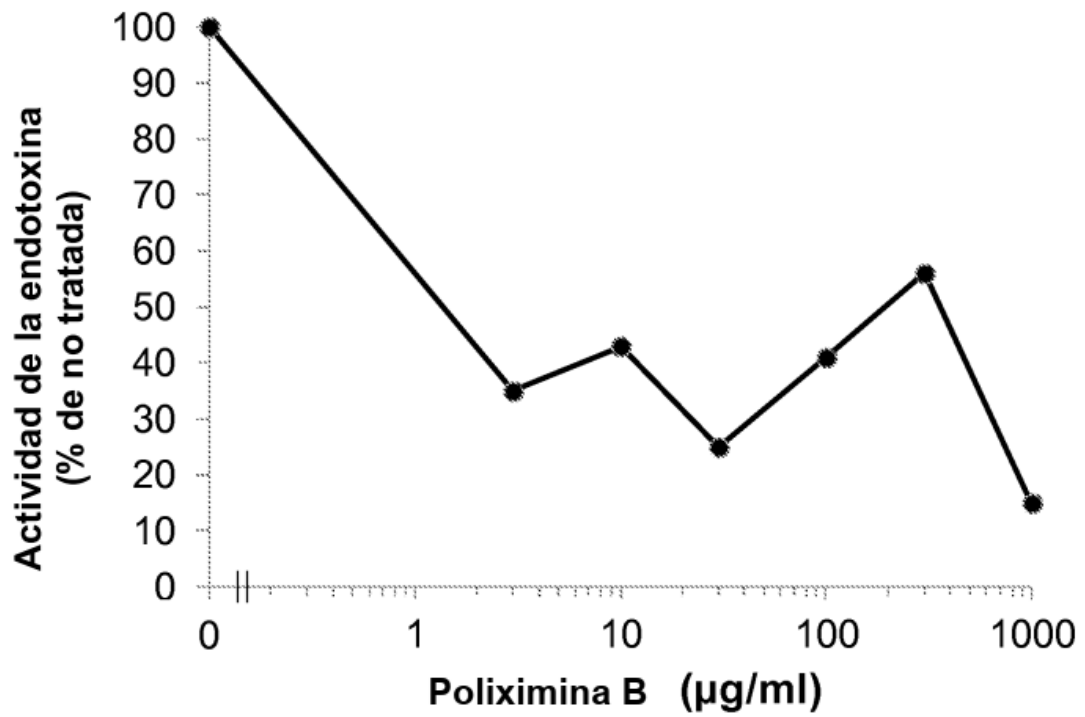


FIGURA 1

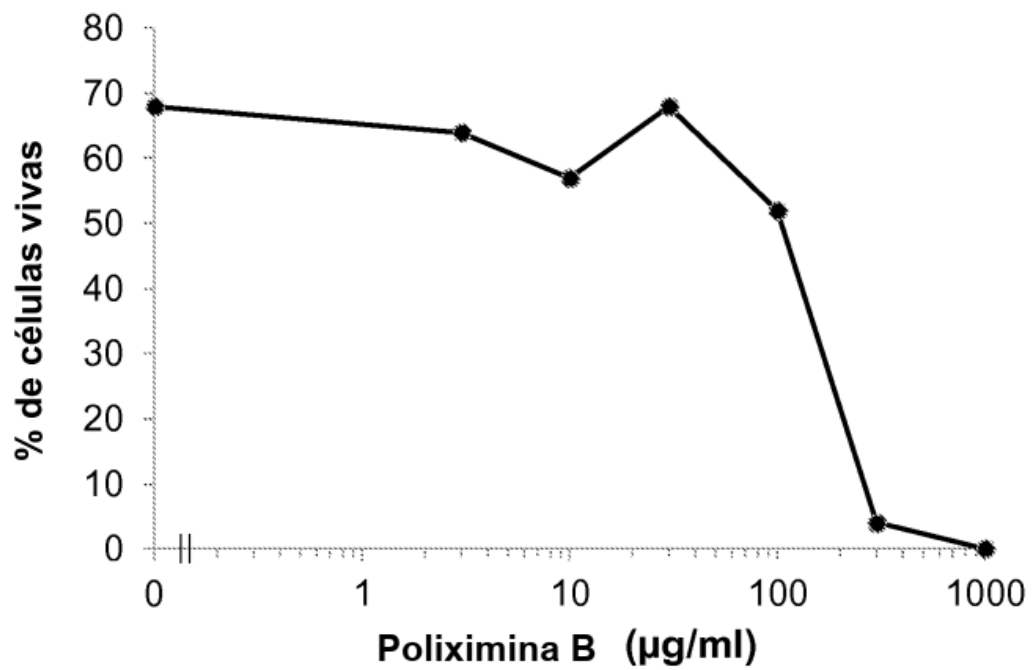


FIGURA 2

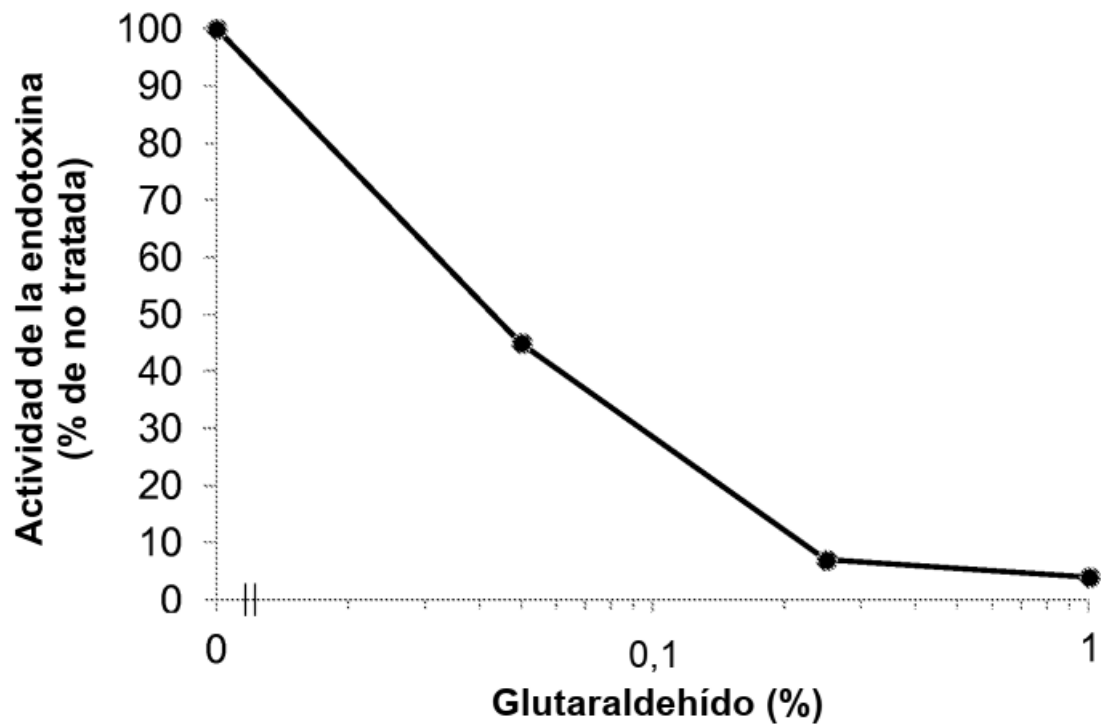


FIGURA 3

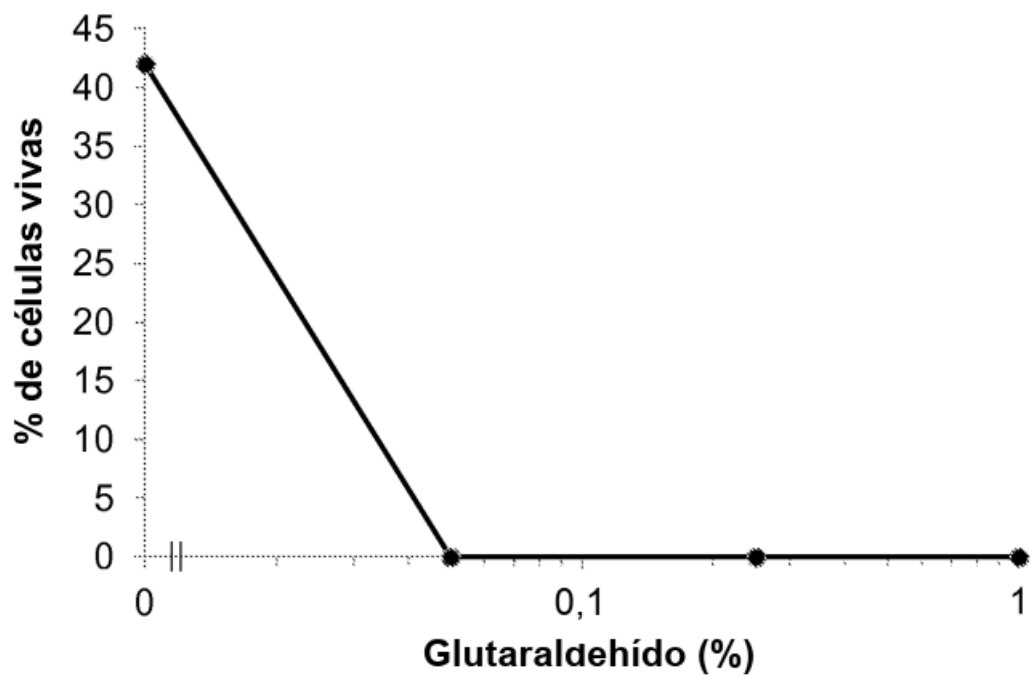


FIGURA 4

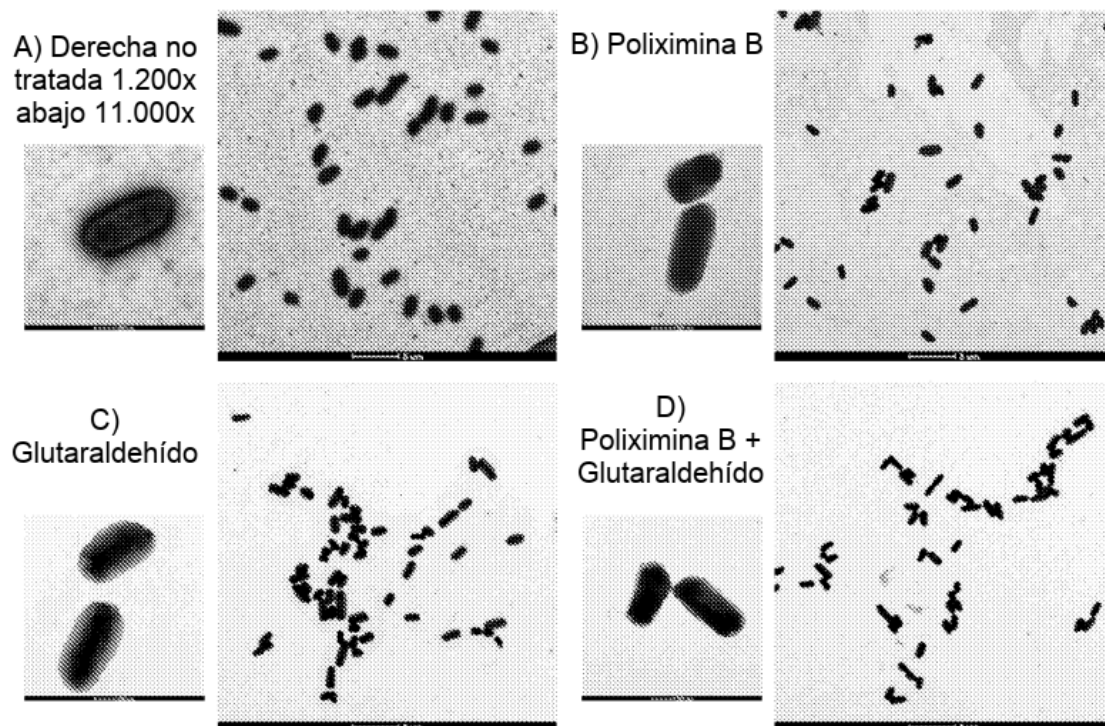


FIGURA 5

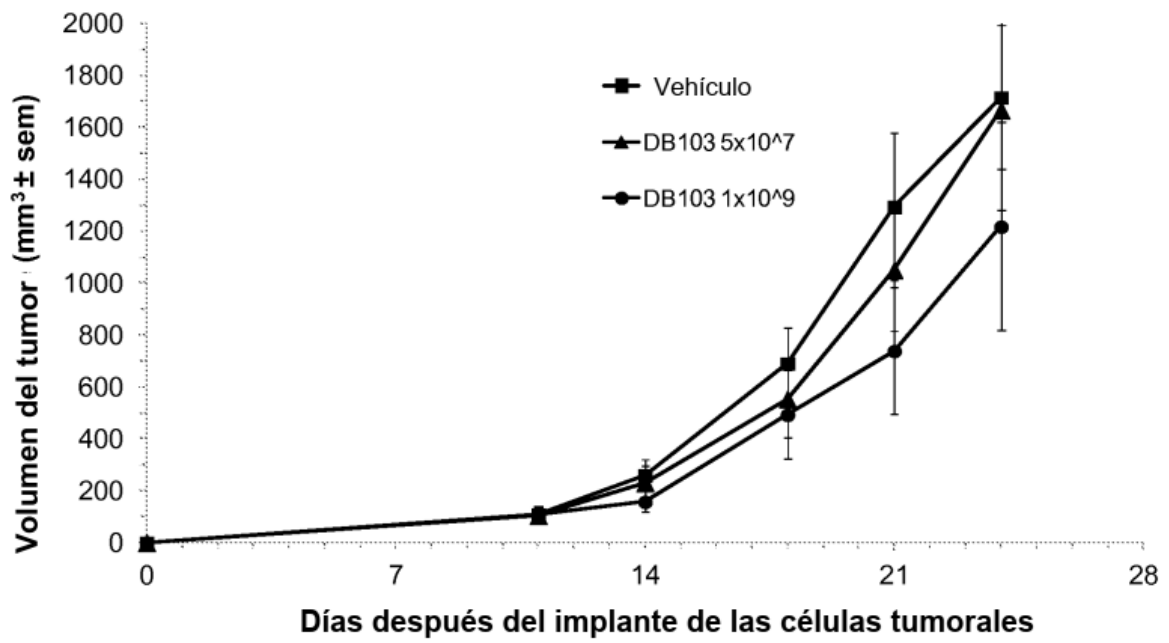


FIGURA 6

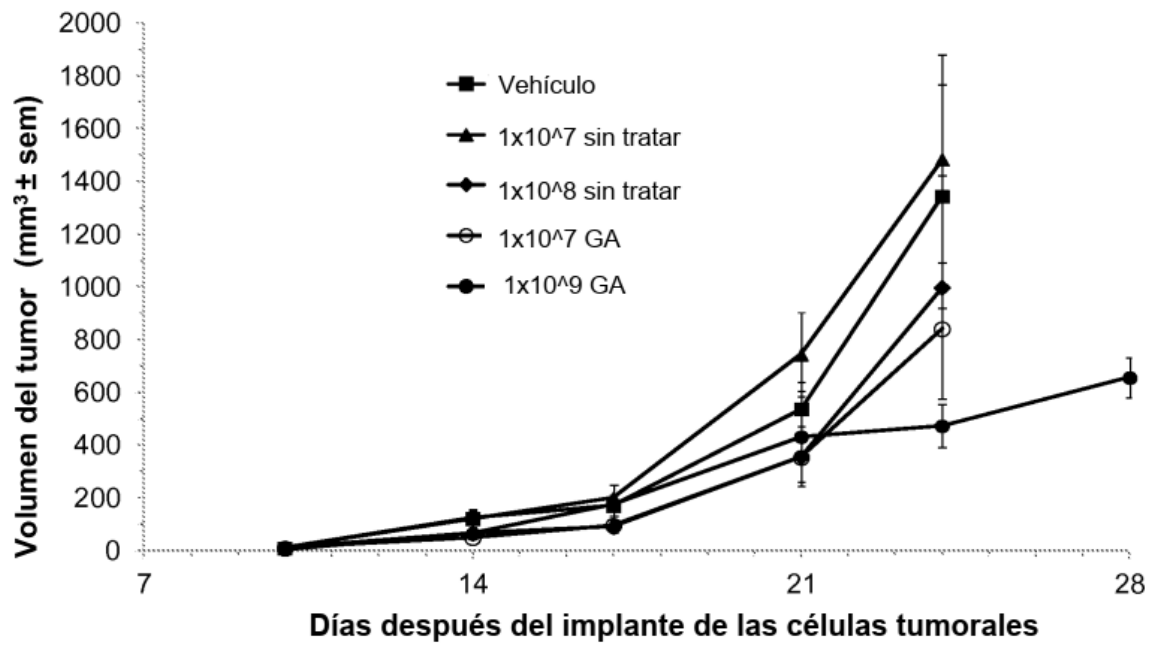


FIGURA 7

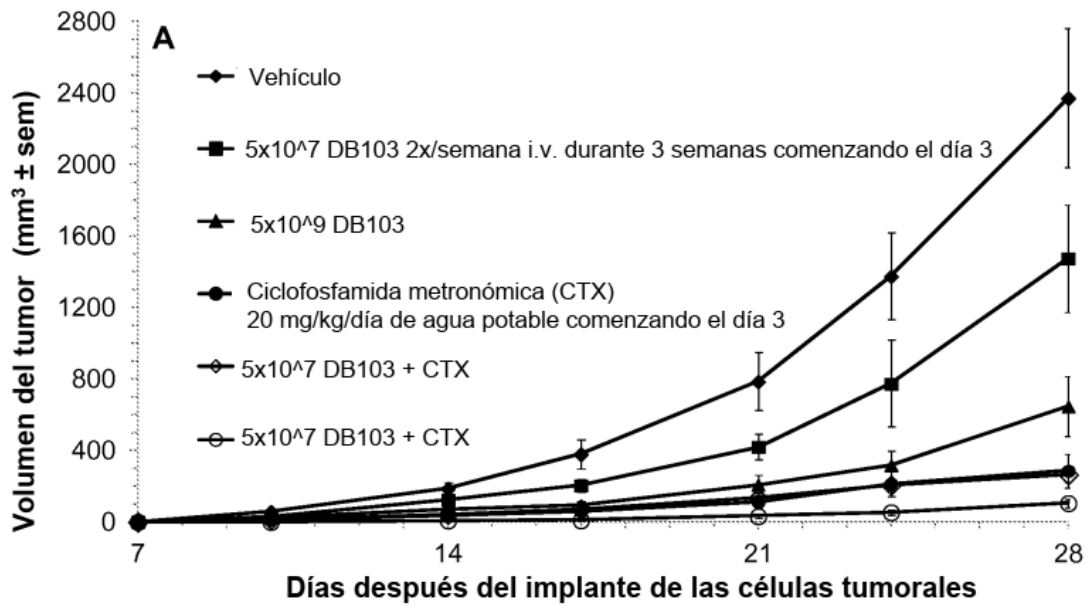


FIGURA 8A

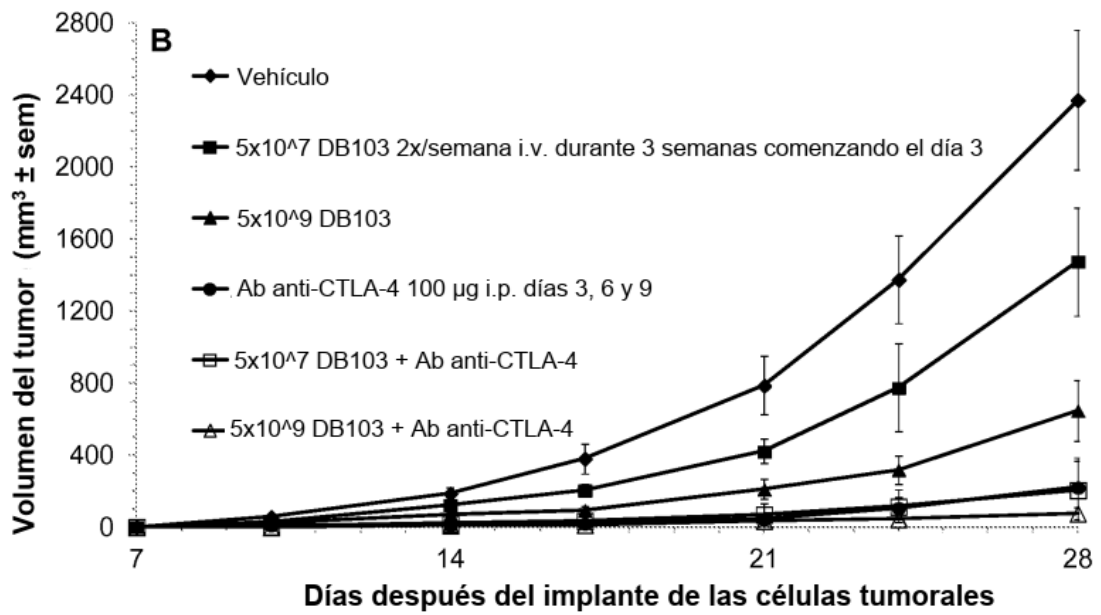


FIGURA 8B