

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 765 426**

51 Int. Cl.:

**A61K 9/50** (2006.01)

**A61K 9/127** (2006.01)

**A61K 47/68** (2007.01)

**A61K 47/69** (2007.01)

**A61K 31/704** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.01.2005 E 15162946 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.10.2019 EP 2992901**

54 Título: **Composiciones y métodos para la liberación dirigida de fármacos in vitro e in vivo a células de mamíferos mediante minicélulas intactas derivadas de bacterias**

30 Prioridad:

**02.02.2004 US 540590 P**

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

**09.06.2020**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**BRAHMBHATT, HIMANSHU y  
MACDIARMID, JENNIFER**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**ES 2 765 426 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 la liberación dirigida de fármacos *in vitro* e *in vivo* a células de mamíferos mediante minicélulas intactas derivadas de bacterias

**Antecedentes de la invención**

5 La presente invención se refiere a los esfuerzos en curso para lograr la liberación controlada de fármacos y el direccionamiento de fármacos a tejidos específicos, particularmente en el área de la quimioterapia contra el cáncer. Más particularmente, la invención se refiere a la liberación dirigida de fármacos mediante minicélulas bacterianas intactas, que pueden suministrar fármacos intracelularmente, dentro de las células objetivo  
10 deseadas *in vitro* e *in vivo*. Las minicélulas que contienen fármacos químicos o bioquímicos constituyen nuevos vehículos de liberación, capaces de dirigirse a células específicas. Un método de dirigir estos vehículos emplea moléculas biespecíficas que se unen específicamente a una estructura en la superficie de las minicélulas y a una estructura en la superficie de las células objetivo, tal como un receptor. Los ligandos biespecíficos median una interacción entre los minicélulas y las células objetivo, de modo que las células objetivo engloban a las minicélulas, que liberan su carga útil del fármaco en el citoplasma de las células objetivo. Una vez liberado  
15 citoplasmáticamente, el fármaco actúa sobre objetivos intracelulares, tales como los orgánulos intracelulares, el núcleo, el citoesqueleto, las enzimas y los cofactores, para lograr un efecto terapéutico. En otro método de liberación de fármacos, las células objetivo competentes en fagocitosis o endocitosis engloban minicélulas cargadas de fármacos sin el uso de ligandos biespecíficos.

20 En la actualidad, la mayoría de los fármacos utilizados para tratar el cáncer se administran sistémicamente. Si bien la administración sistémica de medicamentos anticancerosos citotóxicos juega un papel crucial en la terapéutica del cáncer, también genera serios problemas. Por ejemplo, la exposición sistémica de tejidos/órganos normales al fármaco administrado puede causar toxicidad severa (Sarosy y Reed, 1993). Esto se ve exacerbado por el hecho de que los fármacos de quimioterapia contra el cáncer administrados por vía sistémica a menudo deben administrarse en dosis muy altas para superar la escasa biodisponibilidad de los fármacos y el gran volumen de distribución dentro de un paciente. Además, la administración sistémica de fármacos puede ser invasiva, ya que a menudo requiere el uso de un catéter asegurado en un vaso sanguíneo principal. Debido a que la administración sistémica de fármacos a menudo requiere el uso de venas, ya sean periféricas o centrales, puede causar complicaciones locales como la flebitis. La extravasación de un fármaco también puede conducir a daños vesicantes/tisulares en el sitio local de administración, como se observa  
30 comúnmente con la administración de alcaloides de la vinca y de antraciclinas.

Debido a que los sistemas existentes para la administración dirigida de fármacos son seriamente deficientes, las estrategias actuales de tratamiento de fármacos contra el cáncer abordan malamente los problemas que acompañan a la administración de fármacos sistémicos. Un enfoque para abordar estos problemas implica simplemente modificar los horarios de administración o los regímenes de infusión, que pueden ser en bolo, intermitentes o continuos. Este enfoque, sin embargo, proporciona beneficios muy limitados.  
35

También existen algunos enfoques alternativos para la inyección intravenosa, cada uno diseñado para proporcionar una liberación regional, es decir, una liberación selectiva a una región tumoral. Ejemplos de tales alternativas incluyen implantes poliméricos, infusión intraperitoneal, infusión intrapleural, administración intraarterial, quimioembolización e inhalación de aerosoles. En particular, la administración intraperitoneal de la quimioterapia se ha estudiado ampliamente para el carcinoma de ovario y otros tumores abdominales (Kirmani *et al.*, 1994; Alberts *et al.*, 1996). Desafortunadamente, cada uno de estos métodos de administración, incluida la administración intraperitoneal, ha logrado solamente un éxito marginal en la administración selectiva de fármacos a un sitio tumoral y en la reducción de los efectos secundarios.  
40

Otros intentos para abordar los problemas con la liberación sistémico de fármacos anticancerosos citotóxicos incluyen el uso de formulaciones de fármacos y sistemas de liberación alternativos, que incluyen polímeros biodegradables de liberación controlada, portadores de microesferas poliméricas y liposomas, así como la administración conjunta de agentes citoprotectores con antineoplásicos. Chonn y Cullis, 1995; Kemp *et al.*, 1996; Kumanohoso *et al.*, 1997; Schiller *et al.*, 1996; Sharma *et al.*, 1996; Sipsos *et al.*, 1997.  
45

El uso de liposomas como portadores de fármacos para agentes quimioterapéuticos se propuso originalmente como un medio para manipular la distribución de fármacos para mejorar la eficacia antitumoral y reducir la toxicidad (revisado por Allen, 1997). A través de la encapsulación de fármacos en un portador macromolecular, tal como un liposoma, el volumen de distribución se reduce significativamente y la concentración de fármaco en un tumor aumenta. Esto causa una disminución en las cantidades y tipos de toxicidades inespecíficas, y un aumento en la cantidad de fármaco que puede administrarse efectivamente a un tumor (Papahadjopoulos y Gabizon, 1995; Gabizon y Martin, 1997; Martin, 1998). Los liposomas protegen los fármacos del metabolismo y la inactivación en plasma. Además, debido a las limitaciones de tamaño en el transporte de moléculas grandes o portadores a través de endotelios sanos, los fármacos se acumulan en un grado reducido en tejidos sanos (Mayer *et al.*, 1989; Working *et al.*, 1994).  
50  
55

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

Los portadores de fármacos liposómicos, desafortunadamente, tienen varios inconvenientes. Por ejemplo, *in vivo*, los fármacos a menudo se escapan de los liposomas a una velocidad suficiente para volverse biodisponibles, causando toxicidad en los tejidos normales. Del mismo modo, los liposomas son inestables *in vivo*, donde su descomposición libera el fármaco y causa toxicidad en los tejidos normales. Además, las formulaciones liposómicas de fármacos muy hidrófilos pueden tener una biodisponibilidad prohibitivamente baja en el sitio del tumor, porque los fármacos hidrófilos tienen una permeabilidad de membrana extremadamente baja. Esto limita la liberación del fármaco a una vez que los portadores liposómicos alcanzan el tumor. Los fármacos muy hidrófobos también tienden a asociarse principalmente con el compartimento de la bicapa de los liposomas, causando una baja estabilidad de atrapamiento debido a la rápida redistribución del fármaco a los componentes plasmáticos. Además, algunos fármacos, tales como 1-β-D-arabinofuranosilcitosina (ara-C) y metotrexato, solo ingresan a las células tumorales directamente, a través de transportadores de membrana (Plageman *et al.*, 1978; Wiley *et al.*, 1982; Westerhof *et al.*, 1991, 1995; Antony, 1992). En tales casos, un portador liposómico necesitaría liberar suficiente fármaco cerca del sitio del tumor para lograr un efecto terapéutico (Heath *et al.*, 1983; Matthay *et al.*, 1989; Allen *et al.*, 1992). Por último, el uso de formulaciones convencionales de liposomas aumenta el riesgo de un paciente de adquirir infecciones oportunistas (White, 1997), debido a la localización de fármacos en los macrófagos del sistema reticuloendotelial y una toxicidad de macrófagos concomitante (Allen *et al.*, 1984; Daemen *et al.*, 1995, 1997). Este problema se acentúa en pacientes inmunodeficientes, como los pacientes con SIDA que reciben tratamiento para el sarcoma de Kaposi.

El documento de patente de EE.UU. US2003/0203481 (D2) divulga minicélulas derivadas de bacterias capaces de cargar agentes terapéuticos que incluyen agentes activos, profármacos y moléculas pequeñas, pero estas minicélulas son 'poroplastos' con membranas externas interrumpidas.

Debido a que los problemas continúan obstaculizando significativamente el éxito de la terapéutica contra el cáncer, existe una necesidad urgente de estrategias de liberación dirigida de fármacos que suministren fármacos selectivamente a las células tumorales y órganos objetivo, o protejan los tejidos normales de los agentes antineoplásicos administrados. Dichas estrategias deberían mejorar la eficacia del tratamiento farmacológico al aumentar los índices terapéuticos de los agentes anticancerígenos, al tiempo que se minimizan los riesgos de toxicidad relacionada con los fármacos.

Una solicitud del documento de patente internacional, PCT/IB02/04632, ha descrito minicélulas recombinantes intactas que contienen moléculas terapéuticas de ácido nucleico. Tales minicélulas son vectores efectivos para administrar oligonucleótidos y polinucleótidos a células hospedantes *in vitro* e *in vivo*. Los datos presentados en el documento de patente internacional PCT/IB02/04632 demostraron, por ejemplo, que las minicélulas recombinantes que llevan plásmidos de expresión génica de mamíferos pueden administrarse a células fagocíticas y a células no fagocíticas. La solicitud también describió la transformación genética de cepas bacterianas parentales productoras de minicélulas con ácidos nucleicos heterólogos transportados en ADN plasmídicos que se replican episómicamente. Tras la separación de las bacterias parentales y las minicélulas, algunos de los ADN episomales se segregaron en los minicélulas. Las minicélulas recombinantes resultantes fueron englobadas fácilmente por las células fagocíticas de mamíferos y se degradaron dentro de los fagolisosomas intracelulares. Sorprendentemente, parte del ADN recombinante escapó de la membrana fagolisosómica y fue transportado al núcleo de la célula de mamífero, donde los genes recombinantes fueron expresados. Por lo tanto, la solicitud de patente mostró una utilidad para minicélulas en terapia génica humana y animal.

La presente invención se basa en estos descubrimientos recientes relacionados con minicélulas, y aborda las necesidades continuas de estrategias mejoradas de liberación de fármacos, especialmente en el contexto de la quimioterapia contra el cáncer.

## 55 **Compendio de la invención**

Para abordar estas y otras necesidades, la presente invención proporciona, en un aspecto, una composición que consiste esencialmente en minicélulas intactas que contienen un fármaco, tal como un fármaco de quimioterapia contra el cáncer. En un aspecto relacionado, la invención proporciona una composición que comprende (i) minicélulas intactas derivadas de bacterias e (ii) un vehículo farmacéuticamente aceptable para las mismas, donde las minicélulas contienen un fármaco. La invención proporciona una composición que

comprende: (a) una pluralidad de minicélulas intactas derivadas de bacterias que tienen paredes celulares intactas, en donde la pluralidad de minicélulas mantienen estructuras de lipopolisacárido y polipéptido derivadas de células bacterianas parentales en las superficies de las minicélulas, y en donde las minicélulas se cargan con una cantidad terapéuticamente eficaz de un fármaco de molécula pequeña, y (b) un vehículo farmacéuticamente aceptable para las mismas.

Según otro aspecto, la invención proporciona un método de liberación dirigida de fármacos que comprende poner en contacto ligandos biespecíficos con (i) minicélulas derivadas de bacterias que contienen un fármaco deseado e (ii) células de mamífero, preferiblemente células de mamífero no fagocíticas. Los ligandos biespecíficos tienen especificidad tanto para un componente superficial en las minicélulas como para un componente superficial en las células de mamífero. Como resultado, los ligandos hacen que las minicélulas se unan a las células de los mamíferos, las células de los mamíferos engloban las minicélulas y el fármaco se libera en el citoplasma de las células de los mamíferos.

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

En otro aspecto, la invención proporciona una composición que comprende (i) una minicélula derivada de bacterias que contiene una molécula de fármaco e (ii) un ligando biespecífico que es capaz de unirse a un componente superficial de la minicélula y a un componente superficial de una célula de mamífero.

La invención proporciona otro método de liberación de fármacos que implica poner en contacto minicélulas derivadas de bacterias que contienen un fármaco, con células objetivo de mamífero que son competentes para la fagocitosis o endocitosis. Las células de mamíferos engloban las minicélulas cargadas de fármacos, que luego liberan su carga útil de fármacos intracelularmente.

La invención proporciona además una metodología para cargar minicélulas con un fármaco. Uno de estos métodos implica crear un gradiente de concentración del fármaco entre un medio extracelular que contiene las minicélulas y el citoplasma de la minicélula. El fármaco se mueve naturalmente por este gradiente de concentración, hacia el citoplasma de la minicélula.

Otro método para cargar minicélulas con un fármaco implica cultivar una célula bacteriana parental recombinante en condiciones en donde la célula bacteriana parental transcribe y traduce un ácido nucleico terapéutico que codifica el fármaco, de modo que el fármaco se libera en el citoplasma de la célula bacteriana parental. Cuando la célula bacteriana parental se divide y forma minicélulas de progenie, las minicélulas también contienen el fármaco en su citoplasma.

Todavía otro método para cargar minicélulas con un fármaco implica cultivar una minicélula recombinante que contiene un ácido nucleico terapéutico que codifica el fármaco en condiciones tales que el ácido nucleico terapéutico se transcribe y traduce dentro de la minicélula.

La invención también proporciona el uso de minicélulas intactas derivadas de bacterias y ligandos biespecíficos en la preparación de un medicamento para su uso en un método de tratamiento de enfermedades o modificación de un rasgo mediante la administración del medicamento a una célula, tejido u órgano. En el medicamento, las minicélulas contienen una molécula de fármaco y ligandos biespecíficos que son capaces de unirse a las minicélulas y dirigirse a las células de mamífero. Dichos medicamentos son útiles para tratar diversas afecciones y enfermedades, incluidas enfermedades adquiridas tales como el SIDA, la neumonía y la tuberculosis, pero son particularmente útiles en el contexto de la quimioterapia contra el cáncer.

La invención proporciona mejoras significativas sobre las técnicas de terapia farmacológica convencionales al (i) reducir la toxicidad relacionada con el fármaco, ya que el fármaco se suministra específicamente intracelularmente dentro de las células objetivo, (ii) aliviar los efectos secundarios asociados al fármaco en el sitio de administración en un ser humano o animal, ya que el fármaco está empaquetado dentro de minicélulas y no es libre de interactuar con células y tejidos no objetivo en el sitio de administración, (iii) eliminar la necesidad de una infusión continua del fármaco, debido a que una dosis terapéutica de minicélulas empaquetadas con fármaco y dirigidas se pueden administrar mediante una inyección de rutina, (iv) reducir la dosis efectiva de un fármaco, ya que se logra la focalización específica, y (v) a veces eliminar la necesidad de purificar el fármaco, ya que el fármaco puede sintetizarse biológicamente por la minicélula vehículo de suministro del fármaco o la bacteria parental. El uso de minicélulas tanto para la biosíntesis de fármacos como para la liberación dirigida a las células de mamífero deseadas constituye una ventaja particular, ya que muchos fármacos se extraen convencionalmente de fuentes vegetales o marinas raras, o son muy difíciles de sintetizar

química. Además, algunos fármacos quimioterapéuticos, incluido el metotrexato, ingresan en las células de los mamíferos a través de un mecanismo de transporte activo asociado a la membrana.

### Breve descripción de los dibujos

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

10 La Figura 2 es un gráfico que muestra la liberación de fármacos a través de minicélulas<sub>DOX</sub> a células de adenocarcinoma de mama humano (MDA-MB-468) *in vitro*. Se realizó un ensayo de citotoxicidad celular en células tratadas con minicélulas<sub>DOX</sub> dirigidas a EGFR (<sup>EGFR</sup>minicélulas<sub>DOX</sub>), minicélulas<sub>DOX</sub> no dirigidas (<sup>no dirigidas</sup>minicélulas<sub>DOX</sub>), doxorubicina libre y células no tratadas. A los 6 días después del tratamiento, las células tratadas con doxorubicina libre o <sup>EGFR</sup>minicélulas<sub>DOX</sub> exhibieron solo aproximadamente un 30% de viabilidad.  
15 Las células no tratadas y las células tratadas con <sup>no dirigidas</sup>microceulas<sub>DOX</sub> mostraron una viabilidad celular normal.

La Figura 3 es un gráfico que muestra un efecto terapéutico muy significativo de las minicélulas empaquetadas con doxorubicina dirigidas a EGFR (<sup>EGFR</sup>minicélulas<sub>DOX</sub>) en xenoinjertos de cáncer de mama humano. El volumen tumoral se muestra en el eje y, y los días posteriores al establecimiento del xenoinjerto se muestran en el eje x. Los triángulos sólidos debajo del eje x indican los días en que se administraron varios tratamientos. Los triángulos abiertos debajo del eje x indican un cambio en el tratamiento de los grupos de control G5 y G6, donde se administraron <sup>EGFR</sup>minicélulas<sub>DOX</sub> en lugar de <sup>no dirigidas</sup>minicélulas<sub>DOX</sub>. La leyenda identifica los diversos tratamientos administrados a cada uno de los 8 grupos de ratones (n = 11 por grupo).

20 La Figura 4 es un gráfico que muestra un efecto terapéutico muy significativo de minicélulas empaquetadas con paclitaxel dirigidas a EGFR (<sup>EGFR</sup>minicélulas<sub>Pac</sub>) en xenoinjertos de cáncer de mama humano. El volumen tumoral se muestra en el eje y, y los días posteriores al establecimiento del xenoinjerto se muestran en el eje x. Los triángulos sólidos debajo del eje x indican los días en que se administraron varios tratamientos. La leyenda identifica los diversos tratamientos administrados a cada uno de los 8 grupos de ratones (n = 11 por grupo).

25 La Figura 5 es un gráfico que muestra un efecto terapéutico muy significativo de minicélulas empaquetadas con doxorubicina dirigidas a HER2/neu (<sup>HER2</sup>minicélulas<sub>DOX</sub>) en xenoinjertos de cáncer de ovario humano. Las minicélulas se derivaron de cepas parentales de *S. Typhimurium* (S.t.) o *E. coli* (E.c.) minCDE. El volumen tumoral se muestra en el eje y, y los días posteriores al establecimiento del xenoinjerto se muestran en el eje x. Los triángulos sólidos debajo del eje x indican los días en que se administraron varios tratamientos. La leyenda identifica los diversos tratamientos administrados a cada uno de los 7 grupos de ratones (n=11 por grupo).

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

### 45 Descripción detallada de las realizaciones preferidas

Los presentes inventores han determinado que las minicélulas intactas derivadas de bacterias son vehículos efectivos para empaquetar y suministrar fármacos a células de mamíferos objetivo *in vitro* e *in vivo*. Más particularmente, los inventores han descubierto que una minicélula que lleva una carga útil de fármaco puede dirigirse a las células objetivo, que internalizan la minicélula y la procesan de tal manera que la carga útil del fármaco se libera en el citoplasma de la célula objetivo. Sorprendentemente, el fármaco sobrevive a este proceso sin degradarse.

50 En un ejemplo de estos descubrimientos, los inventores observaron que las minicélulas empaquetadas con fármacos pueden dirigirse a células cancerosas, internalizarse en las células cancerosas *in vitro* y degradarse en endosomas o fagolisosomas tardíos, liberando así cantidades terapéuticamente eficaces de fármaco bioactivo en el citoplasma de las células cancerosas. Véase los ejemplos a continuación.

55 En otro ejemplo, estas observaciones fueron corroboradas por estudios *in vivo* usando xenoinjertos de tumor humano en ratones desnudos. La administración intravenosa de minicélulas empaquetadas con fármacos

demostró una reducción del xenoinjerto tumoral muy significativa en todos los ratones (11 ratones por grupo). Véase los ejemplos a continuación.

5 Por lo tanto, los inventores han descubierto (i) que se puede empaquetar una gama de diferentes fármacos en minicélulas intactas, (ii) que los fármacos se mueven en un sentido desde el entorno extracelular hacia el citoplasma de los minicélulas intactas, (iii) que concentraciones terapéuticamente significativas de fármaco se pueden transferir al citoplasma de las minicélulas intactas, (iv) que las membranas de minicélulas intactas son inmunes a la fuga de fármacos desde el citoplasma de la minicélula, (v) que la unión de ligandos biespecíficos a las estructuras superficiales de las minicélulas empaquetadas con fármacos no desestabiliza las minicélulas y que las minicélulas por lo tanto se pueden unir específicamente a las células de mamíferos objetivo tanto *in vitro* como *in vivo*, (vi) que las células de mamíferos competentes en fagocitosis o endocitosis engloban las minicélulas empaquetadas con fármacos, (vii) que las células de mamífero no fagocíticas engloban rápidamente las minicélulas empaquetadas con fármaco unidas al receptor de superficie (viii) que después de que las minicélulas englobadas se degradan dentro de las vacuolas, cantidades significativas del fármaco bioactivo escapan de la membrana vacuolar, (viii) que el fármaco escapado puede afectar a su objetivo intracelular dentro de la célula de mamífero, (ix) que las minicélulas empaquetadas con el fármaco quimioterapéutico pueden penetrar la red vascular permeable que rodea las masas tumorales *in vivo*, (x) que pueden conseguirse efectos terapéuticos muy significativos, incluida la regresión tumoral y la estabilización de la enfermedad, utilizando minicélulas empaquetadas con fármacos quimioterapéuticos, y (xi) que las minicélulas empaquetadas con fármacos reducen o eliminan significativamente la toxicidad no deseada.

20 La capacidad de los minicélulas para empaquetar fármacos es sorprendente por varias razones. Es sorprendente que las membranas de las minicélulas intactas sean permeables a una gama de fármacos hidrófilos, hidrófobos y anfipáticos estructuralmente diferentes. Por el contrario, las células bacterianas vivas exhiben una permeabilidad selectiva de la membrana a los solutos, por lo que parece que las minicélulas han perdido esta selectividad. También es sorprendente que las minicélulas no puedan expulsar los fármacos de su citoplasma, ya que las células bacterianas vivas extruyen sustancias químicas nocivas que entran en el citoplasma bacteriano. Incluso contra un gradiente osmótico inverso, en el que las minicélulas cargadas de fármaco se suspenden en solución salina tamponada con fosfato que no contiene fármaco, las minicélulas retienen el fármaco. Esto también es sorprendente porque los fármacos parecen simplemente difundirse en las minicélulas a través de membranas de minicélulas intactas, sin embargo, los canales de difusión no están disponibles para que los fármacos se difundan fuera de las minicélulas. Otro aspecto inesperado de la presente invención es que concentraciones de fármaco terapéuticamente significativas se puedan empaquetar dentro de las minicélulas, ya que el citoplasma bacteriano (y, por lo tanto, el citoplasma de las minicélulas) contiene concentraciones significativas de solutos biocompatibles. Por lo tanto, se creía que podría haber espacio intracelular de reserva insuficiente para acomodar altas concentraciones de solutos farmacológicos no biocompatibles, sin pérdida de integridad de minicélulas.

40 La capacidad de las minicélulas para suministrar fármacos también es sorprendente por varias razones. Es inesperado, por ejemplo, que las minicélulas empaquetadas con fármaco no filtren el fármaco al espacio extracelular. Este es un problema persistente con los vectores de liberación de fármacos liposomales, y las minicélulas, como los liposomas, son vesículas no vivas. Sin embargo, aunque las membranas de minicélulas intactas carecen de selectividad para la penetración del fármaco, la integridad de la membrana es suficiente para evitar la fuga de solutos intracelulares. También es sorprendente, y a diferencia de los vectores de liberación de fármacos liposomales, que la unión de ligandos a la superficie de las minicélulas empaquetadas con el fármaco no cause desestabilización de la integridad de la minicélula o perturbaciones de la membrana que provoquen la fuga del fármaco. Además, es inesperado que las minicélulas empaquetadas con el fármaco sean endocitosadas rápidamente por células de mamífero no fagocíticas, simplemente en virtud de un ligando biespecífico que las une. Hasta ahora se creía ampliamente que las partículas grandes, como las bacterias, solo pueden penetrar e invadir células de mamíferos no fagocíticas a través de un proceso activo que implica la secreción de proteínas asociadas a la invasión por un patógeno vivo. Las minicélulas son vesículas no vivas que carecen de la capacidad de invadir activamente las células de mamíferos no fagocíticas. Todavía otra sorpresa más fue que las minicélulas empaquetadas con fármacos que llevan un ligando biespecífico sean capaces de extravasar la neored vascular tumoral *in vivo*. Si bien existe un debate considerable con respecto a la fuga de la neored vascular del microambiente tumoral, la visión actual es que los poros en la neored vascular tienen un diámetro de 150-400 nm (Gabizon et al., 2003). Sin embargo, las minicélulas que portan un ligando de superficie tienen un diámetro de 400 nm a 600 nm, pero aún pueden extravasar la neored vascular tumoral *in vivo*. La capacidad de los fármacos empaquetados en minicélulas para evitar la degradación también es sorprendente por varias razones. Las minicélulas englobadas están sometidas a entornos lisosomales y endosomales tardíos que se sabe que son severos y que descomponen las minicélulas. A pesar de la dureza de estos entornos, los inventores observaron que se libera una gama de fármacos de las minicélulas en una forma biológicamente activa y permanecen significativamente inalterados. Quizás aún más sorprendente fue el descubrimiento de que una concentración significativa de fármaco es capaz de escapar, en su forma activa, hacia el citoplasma de las células de mamífero. Es decir, según la presente invención las concentraciones de fármaco dentro de las células de mamífero son suficientes para producir un efecto terapéutico tanto en experimentos *in vitro* como *in vivo*.

Aún otro descubrimiento sorprendente es que las minicélulas empaquetadas con fármacos minimizan los efectos secundarios adversos. Por ejemplo, en el sitio de la inyección intravenosa en la vena de la cola de los ratones sin pelo, las inyecciones de fármacos libres causan reacciones cutáneas graves, mientras que las minicélulas empaquetadas con fármacos no causan tales efectos secundarios adversos.

- 5 Según estos descubrimientos, la invención proporciona una composición que consiste esencialmente en minicélulas intactas que contienen un fármaco deseado, tal como un fármaco de quimioterapia contra el cáncer. La invención también proporciona una composición que comprende (i) minicélulas intactas derivadas de bacterias e (ii) un vehículo farmacéuticamente aceptable para las mismas, donde las minicélulas contienen un fármaco, tal como un fármaco de quimioterapia contra el cáncer.
- 10 Las minicélulas de la invención son formas anucleadas de *E. coli* u otras células bacterianas, engendradas por una alteración en la coordinación, durante la fisión binaria, de la división celular con segregación de ADN. La replicación cromosómica procarionota está vinculada a la fisión binaria normal, que implica la formación del tabique medio de las células. En *E. coli*, por ejemplo, la mutación de genes *min*, tal como *minCD*, puede eliminar la inhibición de la formación del tabique en los polos celulares durante la división celular, lo que resulta en la producción de una célula hija normal y una minicélula anucleada. Véase de Boer *et al.*, 1992; Raskin y de Boer, 1999; Hu y Lutkenhaus, 1999; Harry, 2001. Las minicélulas son distintas de otras vesículas pequeñas que se generan y liberan espontáneamente en ciertas situaciones y, a diferencia de las minicélulas, no se deben a reordenamientos genéticos específicos ni a la expresión de genes episomales. Para practicar la presente invención, es deseable que las minicélulas tengan paredes celulares intactas ("minicélulas intactas").
- 15 Además de las mutaciones del operón *min*, también se generan minicélulas anucleadas después de una gama de otros reordenamientos genéticos o mutaciones que afectan la formación del tabique, por ejemplo en el *divIVB1* en *B. subtilis*. Véase Reeve y Cornett, 1975; Levin *et al.*, 1992. Las minicélulas también pueden formarse después de una perturbación en los niveles de expresión génica de proteínas involucradas en la división celular/segregación cromosómica. Por ejemplo, la sobreexpresión de *minE* conduce a la división polar y la producción de minicélulas. De manera similar, las minicélulas sin cromosomas pueden ser el resultado de defectos en la segregación cromosómica, por ejemplo, la mutación *smc* en *Bacillus subtilis* (Britton *et al.*, 1998), delección de *spoOJ* en *B. subtilis* (Iretton *et al.*, 1994), mutación *MukB* en *E. coli* (Hiraga *et al.*, 1989), y mutación *parC* en *E. coli* (Stewart y D'Ari, 1992). Los productos genéticos pueden suministrarse *in trans*. Cuando se sobreexpresa a partir de un plásmido de alto número de copias, por ejemplo, *CafA* puede mejorar la tasa de división celular y/o inhibir la partición cromosómica después de la replicación (Okada *et al.*, 1994), lo que resulta en la formación de células encadenadas y minicélulas anucleadas (Wachi *et al.*, 1989; Okada *et al.*, 1993). Las minicélulas se pueden preparar a partir de cualquier célula bacteriana de origen gram positivo o gram negativo.
- 20
- 25
- 30

Las minicélulas de la invención contienen uno o más fármacos. El término "fármaco" incluye cualquier sustancia fisiológica o farmacológicamente activa que produzca un efecto local o sistémico en animales, particularmente mamíferos y seres humanos. Los fármacos pueden ser compuestos inorgánicos u orgánicos, sin limitación, incluidos péptidos, proteínas, ácidos nucleicos y moléculas pequeñas, cualquiera de los cuales puede estar caracterizado o no caracterizado. Pueden estar en varias formas, tales como moléculas sin cambios, complejos moleculares, sales farmacológicamente aceptables, tales como el clorhidrato, bromhidrato, sulfato, laurato, palmitato, fosfato, nitrito, nitrato, borato, acetato, maleato, tartrato, oleato, salicilato y similares. Para fármacos ácidos, se pueden usar sales de metales, aminas o cationes orgánicos, por ejemplo, amonio cuaternario. También se pueden usar derivados de fármacos, como bases, ésteres y amidas. Un fármaco que es insoluble en agua se puede usar en una forma que sea un derivado soluble en agua del mismo, o como un derivado base del mismo, que en cualquier instante, o por su liberación, se convierte mediante enzimas, hidrolizado por el pH del cuerpo o por otros procesos metabólicos a la forma terapéuticamente activa original.

35

40

- 45 Los fármacos que tienen alguna actividad fisiológica o farmacológica son útiles en esta invención, pero los agentes de quimioterapia contra el cáncer son fármacos preferidos. Los fármacos de quimioterapia contra el cáncer útiles incluyen mostazas nitrogenadas, nitrosoureas, etilenimina, alcanosulfonatos, tetrazina, compuestos de platino, análogos de pirimidina, análogos de purina, antimetabolitos, análogos de folato, antraciclinas, taxanos, alcaloides de la vinca, inhibidores de la topoisomerasa y agentes hormonales. Los ejemplos de fármacos de quimioterapia son actinomicina-D, alkeran, ara-c, anastrozol, asparaginasa, biCNU, bicalutamida, bleomicina, busulfano, capecitabina, carboplatino, carboplatinum, carmustina, CCNU, clorambucilo, cisplatino, cladribina, CPT-11, ciclofosfamida, citarabina, arabinósido de citosina, citoxan, dacarbazina, dactinomicina, daunorubicina, dextrazoxano, docetaxel, doxorubicina, DTIC, epirubicina, etilenimina, etopósido, floxuridina, fludarabina, fluorouracilo, flutamida, fotemustina, gemcitabina, herceptin, hexametilamina, hidroxurea, idarubicina, ifosfamida, irinotecan, iomustina, mecloretamina, melfalan, mercaptopurina, metotrexato, mitomicina, mitotano, mitoxantrona, oxaliplatino, paclitaxel, pamidronato, pentostatina, plicamicina, procarbazona, rituximab, esteroides, estreptozocina, STI-571, estreptozocina, tamoxifeno, temozolomida, teniposida, tetrazina, tioguanina, tiotepa, tomudex, topotecan, treosulfan, trimetrexato, vinblastina, vincristina, vindesina, vinorelbina, VP-16, y xeloda.
- 50
- 55

- 60 Las composiciones que contienen minicélulas de esta invención contienen preferiblemente menos de aproximadamente 1 célula bacteriana parental contaminante por  $10^7$  minicélulas, más preferiblemente

contienen menos de aproximadamente 1 célula bacteriana parental contaminante por  $10^8$  minicélulas, incluso más preferiblemente contienen menos de aproximadamente 1 célula bacteriana parental contaminante por  $10^9$  minicélulas, aún más preferiblemente contienen menos de aproximadamente 1 célula bacteriana parental contaminante por  $10^{10}$  minicélulas y lo más preferible contienen menos de aproximadamente 1 célula bacteriana parental contaminante por  $10^{11}$  minicélulas.

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

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

Los métodos de purificación particularmente eficaces explotan la filamentación bacteriana para aumentar la pureza de las minicélulas. Por lo tanto, un método de purificación de minicélulas puede incluir los pasos de (a) someter una muestra que contiene minicélulas a una condición que induce a las células bacterianas parentales a adoptar una forma filamentosa, seguido de (b) filtrar la muestra para obtener una preparación de minicélulas purificada.

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

Paso A: centrifugación diferencial de un cultivo celular bacteriano productor de minicélulas. Este paso, que se puede realizar a 2000 g durante aproximadamente 20 minutos, elimina la mayoría de las células bacterianas parentales, mientras que deja a las minicélulas en el sobrenadante.

Paso B: centrifugación en gradiente de densidad utilizando un medio de gradiente de densidad isotónico y no tóxico. Este paso separa las minicélulas de muchos contaminantes, incluidas las células bacterianas parentales, con una pérdida mínima de minicélulas. Preferiblemente, este paso se repite dentro de un método de purificación.

Paso C: filtración de flujo cruzado a través de un filtro de 0,45 mm para reducir aún más la contaminación de células bacterianas parentales.

Paso D: Filamentación inducida por estrés de las células bacterianas parentales residuales. Esto se puede lograr sometiendo la suspensión de minicélulas a cualquiera de varias condiciones ambientales que inducen estrés.

Paso E: tratamiento antibiótico para matar las células bacterianas parentales.

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

Paso G: filtración sin salida para eliminar las células bacterianas muertas filamentosas. Se puede emplear un filtro de 0,45  $\mu\text{m}$  para este paso.

Paso H: eliminación de endotoxinas de la preparación de minicélulas. Se pueden emplear perlas magnéticas recubiertas con anti-lípido A para este paso.

En otro aspecto, la invención proporciona un método de liberación dirigida de fármacos que comprende poner en contacto ligandos biespecíficos con (i) minicélulas derivadas de bacterias que contienen una molécula de fármaco e (ii) células de mamífero. Los ligandos biespecíficos, que tienen especificidad para los componentes celulares de las minicélulas y de los mamíferos, hacen que las minicélulas se unan a las células de los mamíferos, de modo que las células de los mamíferos engloben los minicélulas y el fármaco se libere al citoplasma de las células de los mamíferos.

Los inventores descubrieron que este enfoque es ampliamente aplicable a un rango de células de mamíferos, incluidas las células que normalmente son refractarias a la adhesión específica y la endocitosis de minicélulas. Por ejemplo, los ligandos de anticuerpos biespecíficos con especificidad anti-O-polisacárido en un brazo y

receptor anti-HER2, receptor anti-EGF o especificidad anti-receptor de andrógenos en el otro brazo unen eficazmente las minicélulas a los receptores respectivos en una gama de células no fagocíticas objetivo. Estas células incluyen las células de cáncer de pulmón, ovario, cerebro, mama, próstata y piel. Además, la unión eficiente precede a la endocitosis rápida de las minicélulas por cada una de las células no fagocíticas.

5 Las células objetivo de la invención incluyen cualquier célula en la que se va a introducir un fármaco. "Introducido", cuando se usa en referencia a un fármaco, significa que el fármaco transportado dentro de una minicélula se suministra a la célula objetivo, preferiblemente intracelularmente. Las células objetivo deseables se caracterizan por la expresión de un receptor de superficie celular que, al unirse a un ligando, facilita la endocitosis. Las células objetivo preferidas son no fagocíticas, lo que significa que las células no son fagocitos  
10 profesionales, tales como los macrófagos, las células dendríticas y las células Natural Killer (NK). Las células objetivo preferidas son también células de mamífero.

Los ligandos útiles en los métodos de liberación dirigida de fármacos de esta invención incluyen cualquier agente que se una a un componente de superficie en una célula objetivo y a un componente de superficie en una minicélula. Preferiblemente, el componente de superficie en una célula objetivo es un receptor, especialmente un receptor capaz de mediar la endocitosis. Los ligandos pueden comprender un componente de polipéptido y/o carbohidrato. Los anticuerpos son ligandos preferidos. Por ejemplo, un anticuerpo  
15 biespecífico que tiene especificidades duales para un componente de superficie en minicélulas intactas derivadas de bacterias y para un componente de superficie en células objetivo de mamífero, puede usarse eficientemente para dirigir las minicélulas a las células objetivo de mamífero *in vitro* e *in vivo*. Los ligandos útiles también incluyen receptores, enzimas, péptidos de unión, proteínas de fusión/quiméricas y moléculas  
20 pequeñas.

La selección de un ligando particular se realiza con dos criterios principales: (i) unión específica a uno o más dominios en la superficie de minicélulas intactas e (ii) unión específica a uno o más dominios en la superficie de las células objetivo. Por lo tanto, los ligandos tienen preferiblemente un primer brazo que lleva especificidad  
25 para una estructura superficial de minicélulas intacta derivada de bacterias y un segundo brazo que lleva especificidad para una estructura de superficie celular de mamífero. Cada uno de los brazos primero y segundo puede ser multivalente. Preferiblemente, cada brazo es monoespecífico, incluso si es multivalente.

Para la unión a minicélulas derivadas de bacterias, es deseable que un brazo del ligando sea específico para el componente O-polisacárido de un lipopolisacárido encontrado en la célula bacteriana parental. Otras  
30 estructuras de superficie de minicélulas que pueden explotarse para la unión de ligandos incluyen polipéptidos y carbohidratos expuestos a la superficie celular en las membranas externas, tales como pili, fimbriae y flagelos, segmentos peptídicos expuestos en la superficie celular.

Para la unión a las células objetivo, un brazo del ligando es específico para un componente superficial de una célula de mamífero. Dichos componentes incluyen proteínas de la superficie celular, péptidos y carbohidratos,  
35 ya sean caracterizados o no caracterizados. Los receptores de la superficie celular, especialmente aquellos capaces de activar la endocitosis mediada por el receptor, son componentes deseables de la superficie celular para el direccionamiento. Dichos receptores, si se sobre expresan en la superficie de la célula objetivo, confieren una selectividad adicional para dirigir las células a tratar, reduciendo así la posibilidad de liberación a células no objetivo.

40 A modo de ejemplo, uno puede apuntar a células tumorales, células metastásicas, células vasculares, tales como células endoteliales y células de músculo liso, células pulmonares, células renales, células sanguíneas, células de médula ósea, células cerebrales, células hepáticas, etc., o precursores de cualquier célula seleccionada mediante la selección de un ligando que se una específicamente a un motivo receptor de la superficie celular en las células deseadas. Los ejemplos de receptores de la superficie celular incluyen el  
45 antígeno carcinoembrionario (CEA), que se sobre expresa en la mayoría de los carcinomas de colon, recto, mama, pulmón, páncreas y tracto gastrointestinal (Marshall, 2003); receptores de hereulina (HER-2, *neu* o *c-erbB2*), que se sobre expresan con frecuencia en los cánceres de mama, ovario, colon, pulmón, próstata y cuello uterino (Hung *et al.*, 2000); receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), que se expresa altamente en una variedad de tumores sólidos, incluidos los de mama, cabeza y cuello, pulmón de células no  
50 pequeñas y próstata (Salomon *et al.*, 1995); receptor de asialoglicoproteína (Stockert, 1995); receptor de transferrina (Singh, 1999); receptor del complejo enzimático serpina, que se expresa en los hepatocitos (Ziady *et al.*, 1997); receptor del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR), que se sobre expresa en células de adenocarcinoma ductal pancreático (Kleeff *et al.*, 2002); receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR), para terapia génica antiangiogénica (Becker *et al.*, 2002 y Hoshida *et al.*, 2002); receptor de folato,  
55 que se sobre expresa selectivamente en el 90% de los carcinomas de ovario no mucinoso (Gosselin y Lee, 2002); glucocalix de la superficie celular (Batra *et al.*, 1994); receptores de carbohidratos (Thurnher *et al.*, 1994); y el receptor de inmunoglobulina polimérica, que es útil para la liberación de genes a las células epiteliales respiratorias y atractivo para el tratamiento de enfermedades pulmonares como la fibrosis cística (Kaetzel *et al.*, 1997).

En otro ejemplo, se pueden incorporar fármacos antivíricos, antimicrobianos y antiparasitarios en minicélulas intactas y se puede conseguir la liberación dirigida de los fármacos a células infectadas específicas, tales como linfocitos T CD4 + auxiliares infectados con VIH.

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

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

15 El término "anticuerpo" también abarca derivados de anticuerpos, tales como fragmentos de anticuerpos que retienen la capacidad de unirse específicamente a antígenos. Dichos fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos Fab (un fragmento que contiene el dominio de unión al antígeno y comprende una cadena ligera y parte de una cadena pesada unida por un enlace disulfuro), Fab' (un fragmento de anticuerpo que contiene un solo dominio de unión al antígeno que comprende un Fab y una porción adicional de la cadena pesada a través de la región bisagra, F(ab')<sub>2</sub> (dos moléculas Fab' unidas por enlaces disulfuro intercadena en las regiones bisagras de las cadenas pesadas), un Fab biespecífico (una molécula Fab que tiene dos dominios de unión al antígeno, cada uno de los cuales puede estar dirigida a un epítipo diferente), y un scFv (la región determinante variable de unión a antígeno de una cadena ligera y pesada simple de un anticuerpo unido por una cadena de aminoácidos).

20 Cuando los anticuerpos, incluidos los fragmentos de anticuerpos, constituyen parte o la totalidad de los ligandos, preferiblemente son de origen humano o se modifican para ser adecuados para su uso en seres humanos. Los denominados "anticuerpos humanizados" son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Osbourn *et al.*, 2003. Han sido modificados por manipulación genética y/o tratamiento *in vitro* para reducir su antigenicidad en un ser humano. Los métodos para humanizar anticuerpos se describen, por ejemplo, en los documentos de patente de EE.UU. N° 6.639.055, N° 5.585.089 y N° 5.530.101. En el caso más simple, los anticuerpos humanizados se forman injertando los bucles de unión a antígeno, conocidos como regiones determinantes de complementariedad (CDRs), de un mAb de ratón en una IgG de ser humano. Véase Jones *et al.*, 1986; Riechmann *et al.*, 1988; y Verhoeyen *et al.*, 1988. La generación de anticuerpos humanizados de alta afinidad, sin embargo, generalmente requiere la transferencia de uno o más residuos adicionales de las llamadas regiones marco (FRs) del mAb de ratón parental. También se han desarrollado varias variantes de la tecnología de humanización. Véase Vaughan *et al.*, 1998.

30 Los anticuerpos de seres humanos, en lugar de los "anticuerpos humanizados", también pueden emplearse en la invención. Tienen una gran afinidad por sus respectivos antígenos y se obtienen de forma rutinaria a partir de fragmentos variables de cadena sencilla muy grandes (scFvs) o bibliotecas que presentan el fago Fab. Véase Griffiths *et al.*, 1994; Vaughan *et al.*, 1996; Sheets *et al.*, 1998; de Haard *et al.*, 1999; y Knappik *et al.*, 2000.

45 Los ligandos útiles también incluyen anticuerpos biespecíficos de cadena sencilla, que típicamente son polipéptidos recombinantes que consisten en una porción de cadena ligera variable unida covalentemente a través de una molécula enlazadora a una porción de cadena pesada variable correspondiente. Véanse los documentos de patente de EE.UU. N° 5.455.030; N° 5.260.203 y N° 4.496.778. Los anticuerpos biespecíficos también se pueden hacer por otros métodos. Por ejemplo, se pueden crear heteroconjugados químicos uniendo químicamente anticuerpos intactos o fragmentos de anticuerpos de diferentes especificidades. Véase Karpovsky *et al.*, 1984. Sin embargo, tales heteroconjugados son difíciles de hacer de manera reproducible y son al menos dos veces más grandes que los anticuerpos monoclonales normales. Los anticuerpos biespecíficos también se pueden crear mediante intercambio de disulfuro, lo que implica la escisión enzimática y la reasociación de los fragmentos de anticuerpos. Véase Glennie *et al.*, 1987.

50 Como los fragmentos Fab y scFv son monovalentes, a menudo tienen baja afinidad por las estructuras objetivo. Por lo tanto, los ligandos preferidos hechos de estos componentes se manipulan en conjugados diméricos, triméricos o tetraméricos para aumentar la afinidad funcional. Véase Tomlinson y Holliger, 2000; Carter, 2001; Hudson y Souriau, 2001; y Todorovska *et al.*, 2001. Dichas estructuras conjugadas pueden crearse mediante reticulaciones químicas y/o genéticas.

Los ligandos biespecíficos de la invención son preferiblemente monoespecíficos en cada extremo, es decir, específicos para un único componente en las minicélulas en un extremo y específicos para un único

componente en las células objetivo en el otro extremo. Los ligandos pueden ser multivalentes en uno o ambos extremos, por ejemplo, en forma de los denominados diacuerpos, triacuerpos y tetracuerpos. Véase Hudson y Souriau, 2003. Un diacuerpo es un dímero bivalente formado por una asociación no covalente de dos scFvs, que produce dos sitios de unión a Fv. Del mismo modo, un triacuerpo resulta de la formación de un trímero trivalente de tres scFvs, produciendo tres sitios de unión, y un tetracuerpo resulta de la formación de un tetrámero tetravalente de cuatro scFvs, produciendo cuatro sitios de unión.

Se han aprobado varios anticuerpos monoclonales humanizados, humanos y de ratón y fragmentos de los mismos que tienen especificidad para receptores en células de mamíferos para uso terapéutico humano, y la lista está creciendo rápidamente. Véase Hudson y Souriau, 2003. Un ejemplo de dicho anticuerpo que puede usarse para formar un brazo de un ligando biespecífico tiene especificidad para HER2: Herceptin™; trastuzumab

Las regiones variables de anticuerpos también pueden fusionarse con una amplia gama de dominios de proteínas. La fusión a dominios de inmunoglobulina humana como IgG1 CH3 agrega masa y promueve la dimerización. Véase Hu *et al.*, 1996. La fusión a regiones de bisagra-Fc de la Ig humana puede agregar funciones efectoras. Además, la fusión a dominios de proteínas heterólogas de proteínas multiméricas promueve la multimerización. Por ejemplo, la fusión de un scFv corto a hélices anfipáticas cortas se ha usado para producir minianticuerpos. Véase Pack y Pluckthun, 1992. Los dominios de proteínas que forman heterodímeros, tales como fos/jun, se pueden usar para producir moléculas biespecíficas (Kostelny *et al.*, 1992) y, alternativamente, los dominios de homodimerización se pueden diseñar para formar heterodímeros mediante estrategias de ingeniería tales como "protuberancias en agujeros" (Ridgway *et al.*, 1996). Finalmente, se pueden seleccionar socios de proteínas de fusión que proporcionen tanto la multimerización como una función adicional, por ejemplo, la estreptavidina. Véase Dubel *et al.*, 1995.

En otro aspecto, la invención proporciona una composición de materia útil para introducir moléculas de fármaco en células objetivo de mamífero con alta eficiencia. La composición comprende (i) una minicélula derivada de bacterias y (ii) un ligando biespecífico. La minicélula y el ligando pueden ser cualquiera de los descritos en el presente documento. Por lo tanto, la minicélula contiene un fármaco y el ligando biespecífico es preferiblemente capaz de unirse a un componente superficial de la minicélula y a un componente superficial de una célula objetivo de mamífero.

Una composición que consiste esencialmente de minicélulas y ligandos biespecíficos de la presente invención (es decir, una composición que incluye tales minicélulas y ligandos con otros constituyentes que no interfieren indebidamente con la calidad de la composición que suministra el fármaco) puede formularse de manera convencional, usando uno o más vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables.

El término "farmacéuticamente aceptable" significa que un vehículo o excipiente no anula la actividad biológica de la composición que se administra, es químicamente inerte y no es tóxico para el organismo al que se administra. Las formulaciones pueden presentarse en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas o viales, o en envases multidosis, con o sin conservante añadido. La formulación puede ser una solución, una suspensión o una emulsión en vehículos oleosos o acuosos, y puede contener agentes de formulación, tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Una solución adecuada es isotónica con la sangre del receptor y se ilustra con solución salina, solución de Ringer y solución de dextrosa. Alternativamente, las composiciones pueden estar en forma de polvo liofilizado, para la reconstitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua estéril, libre de pirógenos o solución salina fisiológica. Las composiciones también pueden formularse como una preparación depót. Dichas formulaciones de acción prolongada pueden administrarse por implantación (por ejemplo, por vía subcutánea o intramuscular) o por inyección intramuscular.

Una composición de la presente invención puede administrarse a través de diversas rutas y a varios sitios en un cuerpo de mamífero, para lograr el(los) efecto(s) terapéutico(s) deseado(s) localmente o sistémicamente. La liberación puede realizarse, por ejemplo, por administración oral, por aplicación de la formulación a una cavidad corporal, por inhalación o insuflación, o por administración parenteral, intramuscular, intravenosa, intraportal, intrahepática, peritoneal, subcutánea, intratumoral o intradérmica. El modo y el sitio de administración dependen de la ubicación de las células objetivo. Por ejemplo, las células císticas fibróticas pueden ser dirigidas de manera eficiente mediante la liberación inhalado de las minicélulas recombinantes dirigidas. De manera similar, la metástasis tumoral puede tratarse de manera más eficiente mediante la administración intravenosa de minicélulas recombinantes dirigidas. El cáncer de ovario primario puede tratarse mediante la administración intraperitoneal de minicélulas recombinantes dirigidas.

La presente invención proporciona además la liberación de fármacos por medio de minicélulas derivadas de bacterias, que contienen un fármaco, en contacto con células de mamífero que son competentes en fagocitosis o endocitosis. Dichas células de mamífero, que son capaces de engullir las células bacterianas parentales a la manera de los patógenos bacterianos intracelulares, también engloban las minicélulas, que liberan su carga útil de fármacos en el citoplasma de las células de mamífero. Este enfoque de liberación de fármacos puede realizarse sin el uso de ligandos dirigidas.

Una variedad de mecanismos puede estar involucrados en la ingestión de las minicélulas por un tipo dado de célula, y la presente invención no depende de ningún mecanismo particular a este respecto. Por ejemplo, la fagocitosis es un proceso bien documentado en el que los macrófagos y otras células de fagocitos, tales como los neutrófilos, ingieren partículas extendiendo los pseudopodios sobre la superficie de la partícula hasta que la partícula está totalmente envuelta. Aunque se describe como fagocitosis "no específica", se ha demostrado la participación de receptores específicos en el proceso. Véase Wright y Jong (1986); Speert *et al.* (1988)

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

Otro proceso envolvente es la endocitosis, mediante la cual los patógenos intracelulares ejemplificados por especies de *Salmonella*, *Escherichia*, *Shigella*, *Helicobacter*, *Pseudomonas* y *Lactobacilli* entran a las células epiteliales de mamíferos y se replican allí. Dos mecanismos básicos a este respecto son la endocitosis mediada por receptor dependiente de clatrina, también conocida como "endocitosis de fosa recubierta" (Riezman, 1993), y endocitosis independiente de clatrina (Sandvig y Deurs, 1994). Cualquiera o ambos pueden estar involucrados cuando una célula competente para envolver que actúa por endocitosis (es decir, una célula hospedante "competente para endocitosis") envuelve las minicélulas de acuerdo con la invención. Las células competentes para endocitosis representativas son células epiteliales de mama, enterocitos en el tracto gastrointestinal, células epiteliales del estómago, células epiteliales del pulmón y células epiteliales del tracto urinario y vejiga.

Cuando se suministra un fármaco a una célula mamífera competente envolvente sin el uso de un ligando de direccionamiento, la naturaleza de la aplicación contemplada influirá en la elección de la fuente bacteriana para las minicélulas empleadas. Por ejemplo, las especies de *Salmonella*, *Escherichia* y *Shigella* llevan adhesinas que son reconocidas por los receptores intermediarios de endocitosis en los enterocitos en el tracto gastrointestinal, y pueden ser adecuadas para administrar un fármaco que sea eficaz para las células de cáncer de colon. Del mismo modo, las minicélulas derivadas de *Helicobacter pylori*, que llevan adhesinas específicas para las células epiteliales del estómago, podrían ser adecuadas para la liberación dirigida a las células de cáncer de estómago. La inhalación o insuflación puede ser ideal para administrar minicélulas intactas derivadas de una especie de *Pseudomonas* que llevan adhesinas reconocidas por receptores en las células epiteliales pulmonares. Las minicélulas derivadas de las bacterias *Lactobacilli*, que llevan adhesinas específicas para las células epiteliales del tracto urinario y de la vejiga, podrían ser adecuadas para la liberación intrauretral de un fármaco a un cáncer del tracto urinario o un cáncer de vejiga. La invención también proporciona el uso de minicélulas intactas derivadas de bacterias y ligandos biespecíficos en la preparación de fármacos para su uso en un método de tratamiento de enfermedades o modificación de un rasgo mediante la administración del medicamento a una célula, tejido u órgano. En el medicamento, las minicélulas contienen una molécula de fármaco y los ligandos biespecíficos son capaces de unirse a los minicélulas y a células objetivo de mamífero. Dichos fármacos son útiles para tratar diversas afecciones y enfermedades, incluidas enfermedades adquiridas tales como el SIDA, la neumonía y la tuberculosis, pero son particularmente útiles en el contexto de la quimioterapia contra el cáncer.

La invención proporciona además métodos para cargar minicélulas con un fármaco. Usando estos métodos, se puede lograr empaquetar fármacos ya sean hidrófilos o hidrófobos. Un método para cargar minicélulas con un fármaco consiste en crear un gradiente de concentración del fármaco entre un medio extracelular que contiene las minicélulas y el citoplasma de las minicélulas. Cuando el medio extracelular contiene una concentración de fármaco más alta que el citoplasma de las minicélulas, el fármaco se mueve naturalmente por este gradiente de concentración, hacia el citoplasma de las minicélulas. Sin embargo, cuando se invierte el gradiente de concentración, el fármaco no sale de las minicélulas.

Que cantidades terapéuticamente significativas de fármacos se puedan empaquetar así en minicélulas no vivas sin fugas es sorprendente por varias razones. Se sabe que la envoltura externa de las bacterias vivas, tanto Gram-negativas como Gram-positivas, forma una barrera efectiva para los solutos en el medio circundante, a la vez que es permeable al agua. Esto protege a las bacterias de los efectos nocivos de las moléculas tóxicas, tales como los biocidas y los antibióticos. También se sabe que la envoltura bacteriana confiere resistencia intrínseca a la difusión pasiva y la entrada intracelular de productos químicos hidrófobos que no pueden ingresar a través de canales hidrófilos llenos de agua, formados por proteínas asociadas a las membranas llamadas porinas.

Las minicélulas contienen la misma envoltura externa que sus células bacterianas parentales. Por lo tanto, es sorprendente que tanto los fármacos hidrófilos, ejemplificados por doxorrubicina y vinblastina, como los

fármacos hidrófobos, ejemplificados por paclitaxel, puedan transferirse fácilmente al citoplasma de la minicélula creando un gradiente de concentración simple del fármaco entre los ambientes extraminiocélula e intraminiocélula. Esto sugiere que la permeabilidad de la envoltura de las bacterias no vivas y sus derivados es bastante diferente de la permeabilidad de la envoltura de las bacterias vivas.

5 El descubrimiento de que el movimiento de fármacos se produce solo en una dirección en las minicélulas fue una sorpresa mayor. Está bien establecido que las bacterias vivas tienen procesos de flujo de salida activos para eliminar las entidades químicas tóxicas que ingresan a su citoplasma (revisado por Borges-Walmsley y Walmsley, 2001). Estos procesos están mediados por transportadores de múltiples fármacos, un grupo grande y diverso de proteínas capaces de proteger las células contra una amplia variedad de toxinas ambientales  
10 mediante la extrusión activa de compuestos nocivos. Hay al menos cinco familias conocidas, basadas en la similitud de secuencia, de transportadores de múltiples fármacos. Incluyen el (i) facilitador principal (MFS), (ii) división de resistencia-nodulación-división celular (RND), (iii) pequeña resistencia a múltiples fármacos, (iv) extrusión de múltiples fármacos y compuestos tóxicos, y (v) familias de casetes de unión a ATP. Estos transportadores de múltiples fármacos son proteínas unidas a la membrana bacteriana y están ampliamente  
15 distribuidas en las especies bacterianas.

Los transportadores de múltiples fármacos deberían conservarse en las membranas de minicélulas, sin embargo sorprendentemente parecen no ser funcionales, posiblemente porque las minicélulas no están vivas y carecen del ATP necesario para conducir a los transportadores de múltiples fármacos.

20 Para cargar minicélulas con fármacos que normalmente no son solubles en agua, los fármacos inicialmente se pueden disolver en un disolvente apropiado. Por ejemplo, el paclitaxel se puede disolver en una mezcla 1:1 de etanol y cremóforo EL (aceite de ricino polietoxilado), seguido de una dilución en PBS para lograr una solución de paclitaxel que se diluye parcialmente en medios acuosos y transporte cantidades mínimas del disolvente orgánico para asegurar que el fármaco permanezca en solución. Las minicélulas se pueden incubar en este medio final para cargar el fármaco. Por lo tanto, los inventores descubrieron que incluso los fármacos hidrófobos  
25 pueden difundirse en el citoplasma de las minicélulas para lograr una carga citoplasmática alta de fármaco y terapéuticamente significativa. Esto es inesperado ya que la membrana minicelular está compuesta por una bicapa de fosfolípidos hidrofóbos, que se esperaba que evitara la difusión de moléculas hidrofóbicas en el citoplasma.

30 Otro método para cargar minicélulas con un fármaco implica cultivar una célula bacteriana parental recombinante en condiciones en donde la célula bacteriana parental transcribe y traduce un ácido nucleico terapéutico que codifica el fármaco, de modo que el fármaco se libera en el citoplasma de la célula bacteriana parental. Por ejemplo, un grupo de genes que codifica la ruta biosintética celular para un fármaco deseado puede clonarse y transferirse a una cepa bacteriana parental que es capaz de producir minicélulas. La transcripción y la traducción genética del grupo de genes dan como resultado la biosíntesis del fármaco dentro  
35 del citoplasma de las células bacterianas parentales, llenando el citoplasma bacteriano con el fármaco. Cuando la célula bacteriana parental se divide y forma minicélulas de progenie, las minicélulas también contienen el fármaco en su citoplasma. Las minicélulas preempaquetadas pueden purificarse mediante cualquiera de los procesos de purificación de minicélulas conocidos en la técnica y descritos anteriormente.

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

45 Para producir fármacos directamente dentro de células bacterianas parentales o minicélulas, las células bacterianas parentales o minicélulas contienen una molécula de ácido nucleico que, tras la transcripción y/o traducción, funciona para mejorar o tratar una enfermedad o modificar un rasgo en una célula, tejido u órgano. Para los fines de la presente descripción, tales moléculas de ácido nucleico se clasifican como "moléculas terapéuticas de ácido nucleico". Por lo general, el ácido nucleico terapéutico se encuentra en un plásmido dentro de las bacterias parentales o minicélulas.

50 La molécula terapéutica de ácido nucleico codifica un producto farmacológico, tal como un ARN funcional (por ejemplo, antisentido o ARNsi) o un péptido, polipéptido o proteína, cuya producción se desea. Por ejemplo, el material genético de interés puede codificar una hormona, receptor, enzima o (poli) péptido de valor terapéutico. Una molécula terapéutica de ácido nucleico puede ser la contraparte normal de un gen que expresa una proteína que funciona de manera anormal o que está presente en niveles anormales en un estado de enfermedad, como es el caso, por ejemplo, con el regulador de la conductancia de la transmembrana de la fibrosis cística en la fibrosis cística (Kerem *et al.*, 1989; Riordan *et al.*, 1989; Rommens *et al.*, 1989), con la  $\beta$ -globina en la anemia falciforme, y con cualquiera de  $\alpha$ -globina,  $\beta$ -globina y  $\gamma$ -globina en la talasemia. La  
55 molécula terapéutica de ácido nucleico puede tener una transcripción de ARN antisentido o un pequeño ARN interferente, como se mencionó anteriormente.

En el tratamiento del cáncer, una molécula terapéutica de ácido nucleico adecuada para usar según la presente invención podría tener una secuencia que se corresponda con o se derive de un gen que esté asociado con la

supresión tumoral, tal como el gen p53, el gen de retinoblastoma y el gen que codifica el factor de necrosis tumoral. Una amplia variedad de tumores sólidos (cáncer, papilomas y verrugas) deberían ser tratables mediante este enfoque, de acuerdo con la invención. Los cánceres representativos a este respecto incluyen el carcinoma de colon, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de piel, cáncer de hígado, cáncer de huesos, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de cerebro, cáncer de cabeza y cuello, y linfoma. Los papilomas ilustrativos son el papiloma de células escamosas, el papiloma del plexo coroideo y el papiloma laríngeo. Ejemplos de afecciones de verrugas son las verrugas genitales, verrugas plantares, la epidermodisplasia verruciforme y las verrugas malignas.

Una molécula terapéutica de ácido nucleico para la presente invención también puede comprender un segmento de ADN que codifica una enzima que convierte un profármaco inactivo en uno o más metabolitos citotóxicos de modo que, tras la introducción *in vivo* del profármaco, la célula objetivo en efecto es obligada, quizás también con las células vecinas, a suicidarse. Las aplicaciones preclínicas y clínicas de dicho "gen suicida", que puede ser de origen no humano o humano, son revisadas por Spencer (2000), Shangara *et al.* (2000) y Yazawa *et al.* (2002). Ejemplos ilustrativos de genes suicidas de origen no humano son aquellos que codifican para la HSV-timidina kinasa (tk), citosina desaminasa (CDA) + uracil fosforribosiltransferasa, xantina-guanina fosforribosiltransferasa (GPT), nitrorreductasa (NTR), purina nucleósido fosforilasa (PNP, DeoD), citocromo P450 (CYP4B1), carboxipeptidasa G2 (CPG2) y D-aminoácido oxidasa (DAAO), respectivamente. Los genes suicidas de origen humano están ejemplificados por genes que codifican a la carboxipeptidasa A1 (CPA), desoxicitidina quinasa (dCK), citocromo P450 (CYP2B1,6), LNGFR/FKBP/Fas, FKBP/Caspasas y ER/p53, respectivamente.

Según la invención, el ácido nucleico terapéutico típicamente está contenido en un plásmido dentro de la célula bacteriana parental o minicélula. El plásmido también puede contener un segmento adicional de ácido nucleico que funciona como un elemento regulador, tal como un promotor, un terminador, un potenciador o una secuencia de señal, y que está operativamente unido al segmento terapéutico del ácido nucleico.

Un plásmido dentro de una célula bacteriana parental o minicélula de la invención también puede contener un elemento informador. Un elemento informador confiere a su huésped recombinante un fenotipo o característica fácilmente detectable, típicamente al codificar un polipéptido, de otra forma no producido por el huésped, que puede detectarse, tras la expresión, mediante análisis histológico o *in situ*, tal como por técnicas de imagen *in vivo*. Por ejemplo, un elemento informador entregado por una minicélula intacta, según la presente invención, podría codificar una proteína que produce, en la célula huésped englobante, un cambio colorimétrico o fluorométrico que es detectable por análisis *in situ* y que es una función cuantitativa o semicuantitativa de la activación transcripcional. Ejemplos ilustrativos de estas proteínas son las esterases, fosfatasa, proteasas y otras enzimas, cuya actividad genera un cromóforo o fluoróforo detectable.

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

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

### Ejemplos

Ejemplo 1. Empaquetamiento eficiente de los fármacos quimioterapéuticos para el cáncer hidrófilos, doxorubicina y vinblastina en minicélulas intactas derivadas de bacterias

Este ejemplo demuestra que los fármacos hidrófilos se pueden empaquetar en el citoplasma de minicélulas intactas derivadas de bacterias.

La doxorubicina es un antibiótico antimetabólico fuerte de antraciclina aislado de *Streptomyces peucetius*, y se emplea comúnmente para tratar el carcinoma de mama (Henderson *et al.*, 1989; Cowan *et al.*, 1991; Chan *et al.*, 1999; Paridaens *et al.*, 2000; Norris *et al.*, 2000). Incluso con la disponibilidad de taxanos y otros agentes nuevos, la doxorubicina sigue siendo un pilar de tratamiento para pacientes con enfermedad metastásica.

Los alcaloides de la vinca constituyen una clase química de gran interés en la quimioterapia contra el cáncer. Los compuestos principales, vinblastina y vincristina, se han empleado en la práctica clínica durante más de treinta años y siguen siendo ampliamente utilizados hasta el día de hoy. La vinblastina inhibe la proliferación

celular al tapar los extremos de los microtúbulos, suprimiendo así la dinámica de los microtúbulos del huso mitótico.

Se obtuvieron minicélulas a partir de una cepa mutante *minCDE* de *S. typhimurium* generada previamente, como se describe en la solicitud del documento de patente internacional PCT/IB02/04632, y se purificaron mediante un procedimiento de centrifugación en gradiente/filamentación/filtración/eliminación de endotoxinas descrito anteriormente.

El fármaco se empaquetó en las minicélulas creando un gradiente de concentración del fármaco entre los compartimentos extracelular e intracelular. El fármaco se movió por este gradiente hacia el citoplasma de la minicélula, a través de la membrana intacta de la minicélula.

Los minicélulas purificadas se empaquetaron con el fármaco quimioterapéutico doxorubicina (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EE.UU.) de la siguiente manera. Se centrifugaron  $7 \times 10^9$  minicélulas en solución de BSG, se desechó el sobrenadante y las minicélulas se resuspendieron en 940  $\mu$ l de BSG y 60  $\mu$ l de solución de doxorubicina (1 mg/ml; disuelta en agua destilada estéril). La suspensión se incubó durante la noche a 37° C con rotación para permitir que la doxorubicina se difundiera en el citoplasma de las minicélulas. El exceso de doxorubicina unida de forma no específica a la superficie externa de las minicélulas se lavó entonces por ultrafiltración celular agitada como sigue. La celda de ultrafiltración con agitación Amicon Modelo 8010 (Millipore, Billerica, MA, EE.UU.) se ensambló según las instrucciones del fabricante con un disco de membrana de ultrafiltración (polietersulfona; corte de peso molecular de 300 kDa; Millipore). La celda se lavó tres veces con agua destilada estéril seguida de otros tres lavados con BSG. Luego se llenó la celda con 9 ml de BSG reciente y se añadió la solución de 1 ml de minicélulas empaquetadas con doxorubicina. La celda se mantuvo a una presión de 10 psi, se agitó hasta que el volumen se redujo a 5 ml y se completó con 5 ml de BSG. La ultrafiltración continuó hasta que el volumen volvió a caer a 5 ml. Este procedimiento de relleno/ultrafiltración se realizó 6 veces para permitir un lavado completo de las superficies exteriores de las minicélulas empaquetadas con doxorubicina. Durante la última ultrafiltración, el volumen se redujo a 1 ml y la muestra se transfirió a un tubo de centrifuga Eppendorf estéril, seguido de centrifugación a 13.200 rpm durante 10 minutos para sedimentar las minicélulas empaquetadas con doxorubicina.

Se montaron minicélulas empaquetadas con doxorubicina sobre portaobjetos de vidrio y se visualizaron usando un microscopio de fluorescencia (microscopio óptico Leica modelo DM LB, aumento de 100x; Leica Microsystems, Alemania) ya que la doxorubicina es intrínsecamente fluorescente. Los resultados se capturaron utilizando la cámara Leica DC y el software de gestión de imágenes Leica IM. Se usó el filtro apropiado para permitir la visualización de la autofluorescencia de la doxorubicina (excitación 488 nm, emisión 550 nm; fluorescencia roja).

Los resultados revelaron que todas las minicélulas mostraban fluorescencia de color rojo brillante sugiriendo que la doxorubicina se había transferido al citoplasma de la minicélula y, a pesar de los extensos pasos de lavado utilizando el sistema de ultrafiltración de células agitadas, la doxorubicina no pudo difundirse fuera del citoplasma de la minicélula. Esto fue sorprendente porque, durante los pasos de lavado, el gradiente de concentración de doxorubicina se invirtió, es decir, la concentración de doxorubicina en el citoplasma de la minicélula era mayor que la del entorno extracelular (solución de BSG). Las minicélulas de control que no se incubaron con el fármaco no mostraron ninguna autofluorescencia de fondo.

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

Las minicélulas empaquetadas con el fármaco se montaron en portaobjetos de vidrio y se visualizaron usando un microscopio de fluorescencia como se indicó anteriormente y los resultados se capturaron usando la cámara Leica DC y el software de gestión de imágenes Leica IM. Se usó el filtro apropiado para permitir la visualización de la fluorescencia roja de vinblastina conjugada con BODIPY-FL.

Los resultados revelaron que todas las minicélulas mostraban fluorescencia de color rojo brillante, lo que indica que el fármaco se había transferido al citoplasma de la minicélula y, de forma similar a las observaciones para

la doxorubicina, que los pasos de lavado extensivos, utilizando el sistema de ultrafiltración de células agitadas, no dieron como resultado un flujo de salida del fármaco desde las minicélulas hacia el fluido extracelular. Esto también fue sorprendente, ya que es una creencia convencional que solo los solutos muy hidrófilos pueden ingresar en una célula bacteriana por difusión, posiblemente a través de canales de porina que se encuentran en las membranas bacterianas. Los resultados actuales muestran, sin embargo, que incluso los fármacos que no son muy hidrófilos pueden difundirse a través de la membrana de un derivado de células bacterianas no vivas, tal como una minicélula. Las minicélulas de control que no se incubaron con el fármaco no mostraron ninguna autofluorescencia de fondo.

5

10

Ejemplo 2. Empaquetado eficiente del fármaco quimioterapéutico hidrófobo para el cáncer paclitaxel en minicélulas intactas derivadas de bacterias

Este ejemplo muestra que los fármacos hidrófobos se pueden empaquetar en el citoplasma de minicélulas intactas derivadas de bacterias. Debido a que la membrana de la superficie de la minicélula se compone de una bicapa de fosfolípidos, no se esperaría la difusión de fármacos muy hidrófobos a través de esta barrera.

15

20

El taxol (paclitaxel; marca registrada de Bristol-Myers Squibb Company) es un diterpeno tricíclico originalmente aislado de la corteza de un tejo del Pacífico, y más recientemente de las agujas del tejo occidental *Taxus brevifolia*. El paclitaxel es uno de los agentes quimioterapéuticos más importantes y tiene una actividad antitumoral prometedor, especialmente contra los cánceres de ovario, mama y pulmón (Mekhail y Markman, 2002). El paclitaxel es un agente antimitótico que se une a la tubulina en una estequiometría de 1:1, los heterodímeros de tubulina estabilizan los microtúbulos y conducen a un alto porcentaje de células a detenerse en la fase G<sub>2</sub>/M, progresando lentamente en el ciclo celular sin citocinesis, formando células poliploides multinucleadas, y sufriendo apoptosis. El paclitaxel tiene una solubilidad acuosa extremadamente baja de 0,00025 mg/ml y tiene que solubilizarse en ciertos codisolventes tales como 50% de Cremophore EL y 50% de etanol.

25

30

35

Para demostrar que un fármaco hidrófobo como el paclitaxel podría transportarse al citoplasma de minicélulas, se usó un derivado fluorescente de paclitaxel, paclitaxel conjugado a Oregon Green® 488 (Molecular Probes, Eugene, OR, EE.UU.; absorbancia 496 nm, emisión 524 nm). Se adoptaron dos métodos diferentes para solubilizar el fármaco: (i) en etanol (para dar una solución madre de 7,58 mM), e (ii) en etanol:cremophore EL (solución madre de 1:1 vol/vol; 3,79 mM). Cada solución madre se diluyó 1:10 (vol/vol) en PBS para dar soluciones madre de 758  $\mu$ M y 379  $\mu$ M, respectivamente. Las últimas soluciones madre se añadieron a la suspensión de minicélulas (10<sup>9</sup> minicélulas) a una dilución de 1:20 para dar una concentración final de paclitaxel conjugado con Oregon Green® 488 en el entorno extracelular de las minicélulas de 40  $\mu$ M y 20  $\mu$ M, respectivamente. Las minicélulas se incubaron con el fármaco a 37° C durante la noche con rotación y posteriormente se lavaron con ultrafiltración como se describe en el Ejemplo 1 para la doxorubicina y vinblastina. Las minicélulas se resuspendieron y se visualizaron por microscopía de fluorescencia, también como se describe en el Ejemplo 1.

40

45

Los resultados revelaron que todas las minicélulas mostraron fluorescencia de color verde brillante, lo que sugiere que ambos métodos permitieron la transferencia de paclitaxel desde el medio extracelular a través de la membrana de la minicélula y hacia el citoplasma de la minicélula. Esto fue sorprendente ya que no se esperaba que el fármaco, muy hidrófobo, se difundiera en el citosol de la minicélula a través de la membrana bicapa de fosfolípidos (hidrófoba) de la minicélula. Además, de manera similar a las observaciones en los experimentos del Ejemplo 1, la inversión del gradiente osmótico durante los pasos de lavado extensivo no causó el flujo de salida del fármaco del citoplasma de la minicélula.

50

55

Los resultados de los Ejemplos 1 y 2 demuestran que las técnicas sencillas descritas anteriormente se pueden usar para empaquetar fácilmente fármacos tanto hidrófilos como hidrófobos en vehículos de liberación de fármacos en minicélulas.

Ejemplo 3. Métodos para determinar la concentración de fármaco en minicélulas intactas derivadas de bacterias.

50

55

Este ejemplo demuestra un método para determinar la concentración de un fármaco en minicélulas intactas derivadas de bacterias. Más particularmente, el ejemplo describe un método para determinar la concentración de doxorubicina presente en minicélulas<sub>DOX</sub>, y demuestra el efecto de la concentración de doxorubicina en una solución de carga. La aplicación de minicélulas empaquetadas con fármacos para fines terapéuticos requiere la capacidad de caracterizar una entidad de fármaco empaquetado, incluyendo la determinación de la cantidad de fármaco empaquetado. Anteriormente, sin embargo, no existían métodos para romper eficazmente las minicélulas intactas derivadas de bacterias o para romper las células bacterianas y extraer las moléculas de fármaco empaquetadas.

Las abreviaturas utilizadas a continuación incluyen (i) HCl; ácido clorhídrico (BDH AR MERCK, Australia), (ii) MeCN; acetonitrilo, grado de residuo de pesticida (Burdick & Jackson, MI, EE.UU.), (iii) IPA; alcohol isopropílico o 2-propanol, grado de residuo de pesticida (Burdick & Jackson), MQ; MilliQ agua RO pulida ( $R \geq 10^{18} \Omega$ ), C18

y RP18; se refieren a la química de la fase estacionaria presente en la columna de cromatografía (en este caso es una cadena de hidrocarburo de 18 carbonos de largo unida al grupo final de silanol de las partículas de sílice de 5 micras ( $\mu\text{m}$ ) de diámetro), (iv) HPLC y LC; Cromatografía líquida de alta resolución, (v) MS; espectrometría de masas, (vi) MS/MS; la fragmentación inducida por colisión de un ion principal seleccionado para producir un ion secundario definido (útil para eliminar los efectos de la matriz y aumentar la relación señal/ruido), (vii) ESI; fuente de ionización de electropulverización (la corriente de iones se genera en pulverización termoneumática en la cabeza de la entrada del MS).

Se incubaron  $10^9$  minicélulas intactas por separado en una solución de doxorubicina a concentraciones finales de 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200 y 250 mg/ml. Las mezclas se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  durante la noche con rotación. Las minicélulas se cosecharon por centrifugación a 13.200 rpm/5 minutos y se resuspendieron en BSG estéril. La suspensión de minicélulas se colocó en una cámara de filtración Amicon (tamaño de poro de 0,2  $\mu\text{m}$ ) y se lavó 10 veces con 10 ml de BSG por lavado. Las minicélulas se recogieron y dividieron en duplicados de  $5 \times 10^8$  minicélulas para la extracción de la doxorubicina.

Los minicélulas se centrifugaron a 13.200 rpm, y se descartó el sobrenadante. A cada pelet se añadió 500 ml de HCl-IPA 97 mM, seguido de 5 ciclos de vórtice de 1 minuto y sonicación de 1 minuto. Se añadió MQ (500  $\mu\text{l}$ ) y se repitieron los 5 ciclos de vórtice de 1 minuto y sonicación de 1 minuto. El extracto se centrifugó durante 5 minutos a 13.200 rpm para sedimentar los desechos, y el sobrenadante se transfirió a un inserto de vidrio de HPLC de 150  $\mu\text{l}$  y un vial. Debido a la autofluorescencia de la doxorubicina, se desarrolló un análisis basado en fluorescencia por HPLC del fármaco extraído y se realizó de la siguiente manera. Las características del método de HPLC incluyeron (i) Fase Móvil: formiato de amonio 100 mM + trietilamina al 0,05% (pH = 3,5): MQ: MeCN 28:42:30 a 1ml/min, (ii) Fase Estacionaria: Merck Lichrosphere RP18, 5  $\mu\text{m}$ , 4,0 mm x 250 mm, (iii) Temperatura de la Columna:  $40^\circ\text{C}$ , (iv) Volumen de Inyección: 15  $\mu\text{l}$ , (v) Detección: fluorescencia - Excitación 480 nm, Emisión 550 nm, (v) Sistema de HPLC: se utilizó un sistema Shimadzu 10AVP, que comprendía un inyector automático, un desgasificador de disolvente, una bomba cuaternaria, un calentador de columna ( $40^\circ\text{C}$ ) y un detector de fluorescencia, con la versión 7.2 SPI rev B de Shimadzu Corporation (Kyoto, Japón).

Las mediciones de doxorubicina se realizaron usando HPLC y LC-MS para confirmar que los datos eran confiables. El procedimiento de LC-MS y las características clave incluyeron (i) Fase Móvil: formiato de amonio 5 mM (pH = 3,5): MeCN = 76:24 a 0,2 ml/min, (ii) Fase Estacionaria: Phenomenex Luna C18 (2), 5  $\mu\text{m}$ , 2,0 mm x 150 mm, (iii) Temperatura de la columna:  $30^\circ\text{C}$ , (iv) Volumen de Inyección: 2  $\mu\text{l}$ , (v) Sistema de LC y MS: Los sistemas de LC y MS eran de Thermo-Finnigan (Boston, MA, EE.UU.). El sistema de LC comprendía un inyector automático con calentador de columna integrado y una bomba. El eluyente de la columna se transfirió directamente por electropulverización a la fuente de ionización del espectrómetro de masas con trampa de iones LCQ-Deca Thermo-Finnigan, (vi) Detección: El detector del MS se hizo funcionar en modo de iones positivos y modo de exploración MS/MS. El ion padre se estableció a  $m/z = 543,9$ , produciendo un ion hija a  $m/z = 396,8$ . El ion hija fue rastreado con fines de cuantificación.

Las tres determinaciones fluorescentes y los resultados de MS se representaron conjuntamente (Figura 1) para indicar sus determinaciones equivalentes [DOX] (dentro de las barras de error de las mediciones). Los resultados mostraron una clara correlación entre la concentración de la doxorubicina extraída de las minicélulas<sub>DOX</sub> y la concentración de carga externa de la doxorubicina. Estos experimentos se repitieron 3 veces con resultados similares. Además, las técnicas se adaptaron para determinar la concentración de otros fármacos quimioterapéuticos como paclitaxel, irinotecán, 5-fluorouracilo y cisplatino empaquetados en minicélulas intactas.

Ejemplo 4. Los fármacos y la unión de ligandos de superficie no causan inestabilidad de las minicélulas o pérdida de las estructuras embebidas en la membrana.

Este ejemplo demuestra que el empaquetamiento de fármacos en minicélulas y la unión de ligandos a la superficie de las minicélulas empaquetadas con fármacos no causa inestabilidad de las minicélulas, fugas de fármacos o pérdida de estructuras incrustadas en las membranas de minicélulas. El resultado es sorprendente ya que se esperaría que los fármacos, particularmente fármacos quimioterapéuticos muy nocivos, en el citoplasma desestabilizarían la membrana bicapa de las minicélulas.

Se diseñó un estudio para determinar si el empaquetado de fármacos en las minicélulas y/o la unión de ligandos biospecíficos a estructuras superficiales (por ejemplo, componente de O-antígeno de LPS) de las minicélulas provocaría la fuga del fármaco y/o la pérdida de las estructuras embebidas en la bicapa de las minicélulas con el ligando biospecífico (por ejemplo, desprendimiento de LPS). Las minicélulas ( $5 \times 10^8$ ) se empaquetaron con doxorubicina o con paclitaxel conjugado con Oregon Green® 488 (Molecular Probes, Eugene, OR, EE.UU.) como se describió anteriormente. La concentración de fármaco en las minicélulas<sub>DOX</sub> y minicélulas<sub>PAC</sub> se determinó como se describe en el Ejemplo 3, y los resultados mostraron 425 ng de DOX y 245 ng de paclitaxel, respectivamente.

Se construyó un BsAb con especificidades de O-antígeno de anti-*S. Typhimurium* y anti-EGFR como se describe en el documento de patente internacional, PCT/US2004/041010. Brevemente, el anticuerpo

biespecífico (BsAb) se construyó uniendo un O-antígeno de anticuerpo monoclonal (MAb) anti-*S. Typhimurium* (IgG1; Biodesign) y un MAb dirigida contra un receptor objetivo de la superficie celular que es EGFR antihumano de ratón (IgG2a; Oncogene) o receptor HER2/*neu* antihumano de ratón (IgG1; Serotec). Los dos anticuerpos se entrecruzaron a través de sus regiones Fc usando proteína recombinante purificada A/G (Pierce Biotechnology). Brevemente, se añadió proteína A/G (concentración final de 100 µg/ml) a 0,5 ml de una solución premezclada que contenía 20 µg/ml de cada uno de O-antígeno de anti-*S. Typhimurium* y EGFR MAbs anti-humano, y se incubaron durante la noche a 4° C. El exceso de anticuerpos se eliminó mediante incubación con perlas magnéticas conjugadas con proteína G y mezclando suavemente a temperatura ambiente durante 40 minutos. Después de la separación magnética de las perlas, el complejo de proteína A/G-BsAb se incubó con 5 x 10<sup>8</sup> minicélulas empaquetadas con fármaco durante 1 hora a temperatura ambiente para recubrirlas con anticuerpo mediante la unión del brazo Fab específico de O-antígeno al LPS de la superficie. Se usó Alexa-Fluor 488® (Molecular Probes; fluorescencia verde) o Alexa Fluor® 594 (Molecular Probes; fluorescencia roja) para conjugar el BsAb. Las minicélulas<sub>DOX</sub> se mezclaron con BsAb conjugado con Alexa-Fluor 488® y las minicélulas<sub>PAC</sub> se mezclaron con BsAb conjugado con Alexa Fluor® 594. Las diversas preparaciones de minicélulas se visualizaron usando un microscopio de fluorescencia Leica usando un objetivo 100x y los filtros apropiados para fluorescencia roja y verde.

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

Se obtuvieron resultados similares usando otros BsAbs, tales como anti-O-antígeno/anti-HER2/*neu*. Esto sugirió que los métodos son compatibles con el desarrollo de un vector de liberación de fármacos seguro, ya que el empaquetamiento del fármaco y la unión de BsAb no resultaron en la inestabilidad del vector o fuga de fármaco de la minicélula intacta.

Ejemplo 5. Liberación dirigida de doxorubicina *in vitro* a células de cáncer de cerebro humano no fagocíticas a través de minicélulas dirigidas a ligandos y empaquetadas con doxorubicina

Este ejemplo demuestra que un fármaco quimioterapéutico, la doxorubicina, empaquetado en minicélulas intactas que llevan un ligando biespecífico unido a la superficie celular, puede (a) unirse específicamente a una superficie de célula de mamífero objetiva no fagocítica, el receptor EGF en células de cáncer de cerebro humano, y (b) suministrar el fármaco intracelularmente dentro de la célula de mamífero después de la endocitosis y la descomposición de las minicélulas empaquetadas con doxorubicina.

Minicélulas derivadas de *S. typhimurium minCDE* se purificaron y empaquetaron con doxorubicina, como se describe en el Ejemplo 1.

Se construyó un anticuerpo biespecífico como se describió anteriormente y en la Solicitud de Patente de EE.UU. N° 10/602.021 y se describe brevemente en el Ejemplo 4.

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

El anticuerpo biespecífico se marcó con un tinte fluorescente para permitir la visualización y el seguimiento, mediante microscopía confocal de fluorescencia, de las minicélulas objetivo. El procedimiento fue el siguiente. Se usó el kit de etiquetado de proteínas Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, Eugene, OR, EE.UU.) para marcar el anticuerpo biespecífico. El colorante Alexa Fluor 488 (absorbancia 494 nm, emisión 519 nm; fluorescencia verde) se conjugó a través de los grupos amino libres del anticuerpo biespecífico según las instrucciones del fabricante.

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

Los portaobjetos se examinaron por microscopía confocal de fluorescencia (Fluoview, Olympus America, Melville, NY, EE.UU.). Se recogieron imágenes de fluorescencia y contraste de imagen diferencial (DIC) y los resultados revelaron que dentro de las 8 horas posteriores a la incubación, las minicélulas dirigidas empaquetadas con doxorubicina (que portaban el anticuerpo biespecífico conjugado con Alexa Fluor 488; fluorescencia verde), mostraban que la mayoría de las células estaban cubiertas por varios puntos fluorescentes verdes, mientras que las no dirigidas (que carecían del anticuerpo biespecífico marcado con fluorescencia) mostraron solo algunos puntos fluorescentes verdes en muy pocas células. Esto sugirió que el anticuerpo biespecífico específicamente permitió que las minicélulas empaquetadas con doxorubicina se adhirieran fuertemente a la superficie de las células de astrocitoma, presumiblemente a través del receptor EGF. Después de 24 horas de co-incubación de las células de astrocitoma y minicélulas empaquetadas con doxorubicina (dirigidas y no dirigidas), los resultados, cuando se visualizaron para fluorescencia roja (la autofluorescencia de la doxorubicina es roja), mostraron que la mayoría de las células de astrocitoma portaban puntos fluorescentes rojos intensos en la superficie celular y muchas células mostraron fluorescencia roja difusa dentro del citoplasma celular, según se determinó al examinar secciones a través de la célula mediante microscopía confocal de fluorescencia. Este resultado contrastó con el de las células de astrocitoma incubadas durante 24 horas con minicélulas empaquetadas con doxorubicina no dirigidas, donde solo se pudieron observar unos pocos puntos fluorescentes rojos (adhesión no específica de las minicélulas) en algunas células. Esto sugiere que muchas de las minicélulas empaquetadas con doxorubicina se habían internalizado, muy probablemente a través de endocitosis mediada por el receptor de EGF, y que algunas minicélulas se habían descompuesto y liberado la doxorubicina dentro del citoplasma de las células de astrocitoma. Los resultados se confirmaron aún más cuando las imágenes fluorescentes verdes y fluorescentes rojas se fusionaron para revelar que la mayoría de los puntos verdes se localizaban junto con los puntos rojos, dando como resultado puntos amarillos. La fluorescencia roja difusa observada anteriormente dentro del citoplasma de las células de astrocitoma permaneció roja, lo que sugiere que la doxorubicina (autofluorescencia roja) ya no estaba empaquetada dentro de las minicélulas (revelada en verde por el anticuerpo biespecífico localizado en la superficie de la minicélula), lo que sugiere que algunas minicélulas que habían sido endocitosadas se habían descompuesto y liberado la doxorubicina dentro del citoplasma de las células de astrocitoma.

Ejemplo 6. Eficiencia de la liberación de fármaco mediado por minicélulas a células de mamífero no fagocíticas.

Este ejemplo demuestra la eficiencia de la liberación de fármacos mediado por minicélulas a células de mamífero no fagocíticas. Se usó un ensayo de citotoxicidad colorimétrica (Promega; CellTiter 96 Aqueous One™). Las células de adenocarcinoma de mama humano MDA-MB-468 se trataron con  $EGFR^{minicélulas}_{DOX}$  o controles que comprendían doxorubicina libre y  $no\ dirigidas^{minicélulas}_{DOX}$ . Se sembraron células MDA-MB 468 a  $5 \times 10^6$  células en matraces T75 y se incubaron durante 48 horas para obtener  $\sim 1 \times 10^7$  células/matraz. Los medios se cambiaron y las células se trataron con  $10^9$   $no\ dirigidas^{minicélulas}_{DOX}$  o  $EGFR^{minicélulas}_{DOX}$ . La doxorubicina libre (50 ng/ml) también se incluyó como control positivo. Las células se incubaron durante 24 horas, se lavaron a fondo con 3 cambios de PBS y se tripsinizaron. Las células viables se contaron en un hemocitómetro usando el método de exclusión de tripán azul. Se distribuyeron  $1 \times 10^4$  células/ml por pocillo en placas de 24 pocillos (6 pocillos por tratamiento) y se incubaron durante 3, 4, 5 y 6 días con cambios de medios todos los días. El ensayo MTS se realizó en cada punto de tiempo según las instrucciones del fabricante. Brevemente, se añadieron 100  $\mu$ l de reactivo MTS a cada pocillo y se controló el desarrollo del color durante de 2,5 horas a 4 horas. Se transfirieron 100  $\mu$ l de cada pocillo a una placa de 96 pocillos y se leyó la absorbancia a 490 nm.

Los resultados mostraron (Figura 2) que la citotoxicidad de  $EGFR^{minicélulas}_{DOX}$  fue similar a la de la doxorubicina libre, lo que sugiere que las  $EGFR^{minicélulas}_{DOX}$  suministraron doxorubicina en su forma activa a las células MDA y que la eficacia de la administración del fármaco fue superior al 95%. Las  $no\ dirigidas^{minicélulas}_{DOX}$  no mostraron ninguna toxicidad para las células cancerosas, lo que sugiere que el mecanismo de direccionamiento es importante para la seguridad de la terapia farmacológica basada en minicélulas, ya que las células de mamíferos no fagocíticas no parecen endocitar inespecíficamente a las minicélulas.

Ejemplo 7. Liberación muy eficaz del fármaco quimioterapéutico doxorubicina a través de minicélulas dirigidas y empaquetadas con fármacos a xenoinjertos de cáncer de mama humano en ratones desnudos

Este ejemplo demuestra que minicélulas intactas dirigidas a ligandos biespecíficos y empaquetadas con doxorubicina pueden efectuar la regresión de los xenoinjertos de tumor de células de cáncer de mama humano establecidos en ratones hembra desnudos atímicos de 6 semanas de edad.

Como se describió anteriormente, se obtuvieron minicélulas de una cepa mutante *minCDE* de *S. typhimurium* y se purificaron usando un procedimiento de centrifugación en gradiente/filamentación/filtración/eliminación de endotoxinas. Las minicélulas purificadas se empaquetaron con el fármaco quimioterapéutico doxorubicina como se describe en el Ejemplo 1.

Se construyó un anticuerpo biespecífico como se describe en el Ejemplo 3. Se seleccionó un anticuerpo monoclonal anti-EGFR porque las células xenoinjertadas eran células de cáncer de mama humano MDA-MB-468 que se sabe que sobreexpresan el receptor de EGF en la superficie celular.

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

Los ratones usados en este ejemplo se compraron en Animal Resources Center, Perth, WA, Australia, y todos los experimentos con animales se realizaron de acuerdo con la guía de cuidado y uso de animales de laboratorio y con la aprobación del Comité de Ética Animal. Los experimentos se realizaron en la instalación de animales pequeños acreditada NSW Agriculture de EnGeneIC Pty Ltd (Sydney, NSW, Australia). Se cultivaron células de adenocarcinoma de mama humano (MDA-MB-468, ATCC; células epiteliales mamarias humanas; no fagocíticas) en cultivo de tejidos hasta confluencia completa en matraces T-75 en medio RPMI 1640 suplementado con suero de ternera bovina al 5% (GIBCO-BRL Life Technologies, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EE.UU.) y glutamina (Invitrogen) en una atmósfera humidificada de 95% de aire y 5% de  $\text{CO}_2$  a  $37^\circ\text{C}$ . Se inyectaron por vía subcutánea  $1 \times 10^6$  células en  $50\ \mu\text{l}$  de medio libre de suero junto con  $50\ \mu\text{l}$  de matrigel reducido de factor de crecimiento (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, EE.UU.), entre los omóplatos de cada ratón utilizando una aguja de calibre 23. Los tumores se midieron dos veces por semana usando un calibrador digital electrónico (Mitutoyo, Japón, precisión a 0,001) y se calculó el volumen tumoral medio usando la fórmula, longitud (mm) x ancho<sup>2</sup> (mm) X 0,5 = volumen ( $\text{mm}^3$ ). 16 días después de la implantación, los tumores alcanzaron volúmenes entre  $50\ \text{mm}^3$  y  $80\ \text{mm}^3$ , y los ratones fueron asignados al azar a siete grupos diferentes de 11 por grupo.

El experimento se diseñó de la siguiente manera. El grupo 1 (control) no recibió tratamiento. El grupo 2 (control) recibió doxorubicina libre ( $5\ \mu\text{g/g}$  de peso corporal del ratón) por vía intratumoral. Este control se incluyó para determinar el efecto de la doxorubicina libre en las células tumorales y para evaluar los efectos secundarios tóxicos. El grupo 3 (control) fue el mismo que el grupo 2, excepto que la doxorubicina se administró por vía intravenosa. El grupo 4 (control) recibió el anti-O antígeno/anti-EGFR BsAb y doxorubicina libre por vía intravenosa para mostrar el efecto de BsAb en ausencia de minicélulas. Los grupos 5 y 6 recibieron <sup>no dirigidas</sup>minicélulas<sub>DOX</sub> por vía intravenosa e intratumoral, respectivamente, para determinar si las minicélulas empaquetadas con fármaco pero no dirigidas podrían afectar la estabilización del tumor. Los grupos 7 y 8 recibieron minicélulas EGFR dirigidas <sup>EGFR</sup>Minicélulas<sub>DOX</sub> por vía intravenosa e intratumoral, respectivamente, para determinar si las minicélulas empaquetadas con fármaco dirigidas a receptor podrían realizar la estabilización del tumor. El grupo 8 se incluyó para determinar si las minicélulas dirigidas empaquetadas con doxorubicina administradas en la vena de la cola podían seguir la secuencia requerida de eventos para lograr la estabilización y/o regresión del tumor: es decir, permear la red vascular permeable en el sitio del tumor (región del omóplato), difundirse a través del microambiente tumoral, unirse específicamente a las células de cáncer de mama humano, ser endocitadas, descomponerse intracelularmente y liberar la carga útil de fármaco en su forma bioactiva en el citoplasma de las células cancerosas para provocar la muerte celular y, por lo tanto, la estabilización y/o regresión del tumor. Las minicélulas se administraron a una dosis de  $10^8$  y todos los tratamientos se administraron los días 17, 24, 27 y 56 después del establecimiento del xenoinjerto. Todas las mediciones fueron realizadas por un investigador que no conocía los tratamientos administrados. El análisis estadístico se realizó mediante análisis de varianza (ANOVA) y  $p < 0,05$  se consideró estadísticamente significativo.

Los resultados mostraron (Figura 3) que la estabilización/regresión tumoral muy significativa ( $p = 0,0004$ ) solo se observó con el tratamiento con <sup>EGFR</sup>Minicélulas<sub>DOX</sub>, ya fuera por vía intravenosa o intratumoral. No se observó regresión tumoral con Minicélulas<sub>DOX</sub> no dirigidas, lo que sugiere que el direccionamiento mediado por BsAb fue esencial. En el día 63, el tratamiento para el grupo de Minicélulas<sub>DOX</sub> se cambió al tratamiento <sup>EGFR</sup>Minicélulas<sub>DOX</sub> para determinar si los grandes volúmenes tumorales ( $800\ \text{mm}^3$  a  $1.200\ \text{mm}^3$ ) podrían retroceder mediante la terapia dirigida. El resultado fue una regresión tumoral dramática; para el día 79, con solo dos tratamientos con <sup>EGFR</sup>Minicélulas<sub>DOX</sub>, los volúmenes tumorales habían retrocedido a entre  $100\ \text{mm}^3$  y  $150\ \text{mm}^3$ . El experimento completo se realizó 3 veces, cada vez con resultados similares. Esto demostró que las minicélulas dirigidas por BsAb podían suministrar específicamente un fármaco quimioterapéutico a un xenoinjerto de tumor humano *in vivo*.

El resultado es una primera demostración de liberación dirigida de fármacos *in vivo* a células de mamífero no fagocíticas mediado por minicélulas derivadas de bacterias empaquetadas con fármacos intactos.

Curiosamente, la doxorubicina libre administrada en la vena de la cola de ratones (Grupos 3 y 4) mostró una reacción severa en el sitio de la inyección, un efecto secundario bien conocido de las inyecciones intravenosas de doxorubicina libre en seres humanos. Se cree que esta reacción, conocida como flebitis, es causada por la extravasación del fármaco en el sitio de inyección y la muerte asociada de células normales en la región localizada. Por el contrario, los ratones que recibieron minicélulas empaquetadas con doxorubicina dirigidas o no dirigidas no mostraron ninguna reacción adversa en el sitio de la inyección, lo que sugiere que la doxorubicina empaquetada con minicélulas evitó la reactividad de la doxorubicina libre con el tejido de la piel en el sitio de inyección. Además, a diferencia de los vectores de administración de liposomas, por ejemplo, DOXIL (doxorubicina liposomal), el fármaco no goteó desde las minicélulas.

Estos resultados sugieren lo siguiente: (a) las minicélulas pueden empaquetar un fármaco potencialmente muy tóxico como la doxorubicina en el citoplasma de la minicélula y el fármaco no parece escaparse de la

membrana de la minicélula. De aquí, la falta de reactividad de la piel en el sitio de la inyección de la vena de la cola (Grupos 5 y 7) que se observó con la doxorubicina libre (Grupos 3 y 4), (b) las minicélulas empaquetadas con doxorubicina son seguras para al menos los ratones desnudos cuando las minicélulas se inyectan por vía intravenosa o intratumoral (Grupos 5 a 8), lo que sugiere que el procedimiento de eliminación de la endotoxina libre (lipopolisacárido) adoptado e inventado previamente por los inventores actuales (solicitud del documento de patente internacional solicitud de patente estadounidense PCT/IB02/04632) es suficiente para proporcionar una dosis de minicélulas suficientemente libres de endotoxina para ser seguras para la administración intravenosa o subcutánea intratumoral, (c) las minicélulas dirigidas parecen ser lo suficientemente pequeñas como para permear la neored vascular tumoral permeable, permitiendo que las minicélulas empaquetadas con doxorubicina entren en el microambiente tumoral, (d) las minicélulas dirigidas empaquetadas con doxorubicina parecen unirse específicamente al receptor de EGF que se sabe que se sobreexpresa en la superficie de las células MDA-MB-468 y después de la endocitosis, las minicélulas se rompen y liberan la doxorubicina, lo que resulta en la muerte de las células tumorales y la regresión tumoral observada (Grupo 7; Figura 3), (e) después de la inyección intravenosa, las minicélulas dirigidas y empaquetadas con doxorubicina alcanzan el microambiente tumoral en una concentración significativa para lograr la regresión tumoral. En consecuencia, las minicélulas no parecen haber sido eliminadas por las células fagocíticas profesionales en circulación en cantidades significativas para obviar el efecto terapéutico observado.

Ejemplo 8. Liberación muy eficiente del fármaco quimioterapéutico hidrófobo paclitaxel a través de minicélulas dirigidas y empaquetadas con fármaco a xenoinjertos de cáncer de mama humano en ratones desnudos.

Este ejemplo demuestra la administración muy eficiente de un fármaco quimioterapéutico hidrófobo, paclitaxel, a xenoinjertos de cáncer de mama humano en ratones desnudos a través de minicélulas dirigidas y empaquetadas con fármaco. El experimento mostrado en el Ejemplo 7 se repitió usando <sup>EGFR</sup>Minicélulas<sub>Paclitaxel</sub> como tratamiento experimental. Los tratamientos incluyeron, (i) G1 - solo tumor, (ii) G2 - Paclitaxel libre (400 µg) administrado por vía intratumoral, (iii) G3 - Paclitaxel libre (400 µg) administrado por vía intravenosa, (iv) G4 - anti-O antígeno/anti-EGFR BsAb y Paclitaxel libre (400 µg) administrados por vía intravenosa, (v) G5 - <sup>no dirigidas</sup>minicélulas<sub>Pac</sub> administradas por vía intravenosa, (vi) G6 - <sup>no dirigidas</sup>minicélulas<sub>Pac</sub> administradas por vía intratumoral, (vii) G7 - <sup>EGFR</sup>minicélulas<sub>Pac</sub> administradas por vía intravenosa, (viii) G8 - <sup>EGFR</sup>minicélulas<sub>Pac</sub> administradas por vía intratumoral. Los diversos tratamientos se administraron los días 15, 21, 26, 29 y 33. Se utilizaron  $1 \times 10^8$  minicélulas en cada tratamiento de minicélulas.

Los resultados mostraron (Figura 4) una estabilización/regresión tumoral muy significativa ( $p = 0,0004$ ) en ratones tratados con <sup>EGFR</sup>minicélulas<sub>Pac</sub> y, una vez más, no importó si el tratamiento se administró por vía intravenosa o intratumoral. Los tratamientos de control que incluían <sup>no dirigidas</sup>minicélulas<sub>Pac</sub>, BsAb y paclitaxel libre tuvieron un efecto insignificante sobre el crecimiento tumoral. A lo largo del experimento, los ratones no mostraron signos evidentes de toxicidad, tales como fiebre, letargo, pérdida de apetito o muerte. El experimento se repitió 3 veces con resultados similares.

Este resultado es particularmente significativo, ya que otros vectores de administración de fármacos, como los liposomas, nanopartículas, etc., no han empaquetado con éxito cantidades terapéuticamente significativas de fármacos muy hidrófobos como el paclitaxel. En la mayoría de los casos, se hicieron intentos para cambiar la estructura química del vector o del fármaco para permitir el empaquetado del fármaco, lo que a menudo resultó en la pérdida de bioactividad. Nuestro resultado es el primero que muestra que no solo estos fármacos pueden empaquetarse fácilmente en minicélulas intactas, sino que pueden administrarse de manera segura específicamente a las células enfermas objetivo *in vivo* para lograr un efecto terapéutico.

Ejemplo 9. Demostración de la versatilidad de la liberación dirigida de fármacos basado en minicélulas a células de mamíferos.

Este ejemplo demuestra lo siguiente: (i) los vectores de minicélulas dirigidas y empaquetadas con fármacos son lo suficientemente versátiles como para lograr un efecto terapéutico en un rango de diferentes células no fagocíticas, (ii) el mecanismo de dirección es lo suficientemente versátil como para permitir el uso de diferentes objetivos del receptor en la superficie celular en células enfermas y no está restringido al receptor de EGF, y (iii) el vector de minicélulas en sí es lo suficientemente versátil como para permitir el uso de minicélulas derivadas de diferentes géneros bacterianos.

En un solo experimento de xenoinjerto en ratón desnudo, (i) se usaron células de cáncer de ovario humano (SKOV3; ATCC. EE.UU.) para establecer el xenoinjerto tumoral, (ii) el BsAb director se construyó usando antígeno O-MAb y anti-HER2/*neu* MAb (se sabe que este último receptor se sobreexpresa en la superficie de las células SKOV3), e (iii) las minicélulas utilizadas para el tratamiento se derivaron de cepas de *S. Typhimurium* y *E. coli minCDE*. Las minicélulas se empaquetaron con doxorubicina. Se incluyeron <sup>no dirigidas</sup>minicélulas<sub>Dox</sub>, BsAb (anti-HER2/anti-O antígeno) y doxorubicina libre como controles.

Los resultados mostraron (Figura 5) una estabilización tumoral significativa en ratones tratados con <sup>HER2</sup>minicélulas<sub>Dox</sub> derivadas de o *S. Typhimurium minCDE* o *E. coli minCDE* ( $p = 0,004$ ). Los xenoinjertos SKOV3 crecieron mucho más rápidamente que los xenoinjertos MDA-MB-468, y el experimento solo pudo

seguirse hasta 31 días después del establecimiento del xenoinjerto ya que los animales de control habían alcanzado el punto de muerte o eutanasia.

5 Estos resultados demostraron (i) que las minicélulas intactas se pueden usar para administrar fármacos *in vivo* a una gama de diferentes células de mamífero no fagocíticas, (ii) que los vectores de minicélulas intactos pueden dirigirse a una gama diversa de receptores de la superficie celular encontrados en las células enfermas, e (iii) que las minicélulas pueden derivarse de diferentes géneros o especies bacterianas, pero funcionan de manera similar, particularmente con respecto al liberación de fármacos a las células objetivo *in vivo*.

Ejemplo 10. Relación entre la dosis de minicélulas dirigidas, empaquetada con el fármaco y el efecto terapéutico sobre xenoinjertos de tumor humano en ratones desnudos.

10 Este ejemplo demuestra la relación dosis-efecto para minicélulas empaquetadas con fármacos. Más específicamente, el ejemplo muestra la dosis de minicélulas dirigidas y empaquetadas con fármacos requerida para lograr el máximo efecto terapéutico sobre xenoinjertos tumorales humanos en ratones desnudos.

15 Células MDA-MB-468 (adenocarcinoma de mama humano) se establecieron como xenoinjertos entre los omóplatos de ratones Balb/c *nu/nu*. Las minicélulas derivadas de *S. Typhimurium minCDE* se empaquetaron con doxorubicina utilizando dos concentraciones externas diferentes de doxorubicina, 60 µg/ml y 200 µg/ml como se describe en el Ejemplo 3. Las minicélulas<sub>DOX</sub> se purificaron (Ejemplo 1) y las muestras se analizaron por HPLC para determinar la concentración de doxorubicina empaquetada en 10<sup>8</sup> minicélulas. Los resultados mostraron que a concentraciones externas de doxorubicina de 60 µg/ml y 200 µg/ml, 10<sup>8</sup> minicélulas empaquetaban 85 ng y 660 ng de doxorubicina, respectivamente.

20 Las minicélulas<sub>DOX</sub> se dirigieron luego al EGFR que se sobreexpresa en células MDA-MB-468 y se prepararon seis dosis intravenosas de ratón diferentes, (i) G1 - 10<sup>8</sup> EGFR minicélulas<sub>DOX</sub> con un total de 660 ng de doxorubicina, (ii) G2 - 10<sup>8</sup> EGFR minicélulas<sub>DOX</sub> con un total de 85 ng de doxorubicina, (iii) G3 - 10<sup>7</sup> EGFR minicélulas<sub>DOX</sub> con un total de 66 ng de doxorubicina, (iv) G4 - 10<sup>7</sup> EGFR minicélulas<sub>DOX</sub> con un total de 8,5 ng de doxorubicina, (v) G5 - 10<sup>6</sup> EGFR minicélulas<sub>DOX</sub> con un total de 6,6 ng de doxorubicina, y (vi) G6 - 10<sup>6</sup> EGFR minicélulas<sub>DOX</sub> con un total de 0,85 ng de doxorubicina. Después del establecimiento del xenoinjerto con volúmenes tumorales entre 50 mm<sup>3</sup> y 80 mm<sup>3</sup>, las diversas dosis se administraron por vía intravenosa a los ratones. Los volúmenes tumorales se midieron como se describió previamente.

30 Los resultados mostraron (Figura 6) una relación clara entre la dosis de minicélulas y el efecto terapéutico. En términos de estabilización/regresión tumoral, 10<sup>8</sup> EGFR minicélulas<sub>DOX</sub> fue más efectiva que 10<sup>7</sup> EGFR minicélulas<sub>DOX</sub>, que a su vez fue más efectiva que 10<sup>6</sup> EGFR minicélulas<sub>DOX</sub>. Curiosamente, no hubo una diferencia importante en la concentración de doxorubicina entre las minicélulas administradas a los grupos 3 y 4 (6,6 ng y 8,5 ng respectivamente) y los grupos 5 y 6 (66 ng y 85 ng). Sin embargo, el tratamiento en el G4 fue más efectivo que en el G3 y, de manera similar, el tratamiento en el G6 fue más efectivo que en el G5. Esto sugirió que dentro del rango de minicélulas y concentraciones de fármacos analizados en este experimento, el efecto terapéutico se correlacionó con los números de minicélulas en lugar de con la concentración de fármaco transportada dentro de las minicélulas.

#### Publicaciones citadas

Esta solicitud incorpora como referencia cada una de las siguientes publicaciones:

40 Alberts et al., Intraperitoneal cisplatin plus intravenous cyclophosphamide versus intravenous cisplatin plus intravenous cyclophosphamide for Stage III ovarian cancer, *N. Engl. J. Med.*, 335: 1950-1955 (1996).

Allen et al., Chronic liposome administration in mice: effects on reticuloendothelial function and tissue distribution, *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, 229: 267-275 (1984).

Allen TM, Liposomes: opportunities in drug delivery, *Drugs*, 54 Suppl 4: 8-14 (1997).

45 Alkan-Onyuksel et al., A mixed micellar formulation suitable for the parenteral administration of taxol, *Pharm. Res.*, 11(2): 206-12 (1994).

Arndt et al., Alkylphospholipid liposomes: preparation, properties and use in cancer research, *Drugs of Today*, 34 (Supl. F): 83-96 (1998).

Barenholz, Liposome application: problems and prospects, *Curr. Opin. Colloid Interface. Sci.*, 6: 66-77 (2001).

50 Batra et al., Receptor-mediated gene delivery employing lectin-binding specificity, *Gene Ther.*, 1(4): 255-60 (1994).

Becker et al., Gene therapy of prostate cancer with the soluble vascular endothelial growth factor receptor Flk1, *Cancer Biol. Ther.*, 1(5): 548-53 (2002).

- Borges-Walmsley & Walmsley, The structure and function of drug pumps, *Trends Microbiol.* 9: 71-79 (2001).
- Britton *et al.*, "Characterization of a prokaryotic SMC protein involved in chromosome partitioning," *Genes Dev.*, 12: 1254 (1998).
- Carter, Improving the efficacy of antibody-based cancer therapies, *Nat. Rev. Cancer*, 1(2): 118-29 (2001).
- 5 Chan *et al.*, Prospective randomized trial of docetaxel versus Doxorubicin in patients with metastatic breast cancer, *J. Clin. Oncol.*, 17:2341-54 (1999).
- Chonn & Cullis, Recent advances in liposomal drug-delivery systems, *Curr. opinion in Biotechnology*, 6(6): 698-708 (1995).
- 10 Cowan *et al.*, Randomized trial of Doxorubicin, bisantrene, and mitoxantrone in advanced breast cancer, *J. Natl. Cancer Inst.*, 83: 1077-84 (1991).
- Cullis *et al.*, Influence of pH gradients on the transbilayer transport of drugs, lipids, peptides and metal ions into large unilamellar vesicles, *Biochim. Biophys. Acta*, 1331: 187-211 (1997).
- Daemen *et al.*, Liposomal Doxorubicin-induced toxicity: depletion and impairment of phagocytic activity of liver macrophages, *Int. J. Cancer*, 61: 716-721 (1995).
- 15 Daemen *et al.*, Toxicity of Doxorubicin entrapped within long-circulating liposomes, *J. Controlled Release*, 44: 1-9 (1997).
- de Haard *et al.*, A large non-immunized human Fab fragment phage library that permits rapid isolation and kinetic analysis of high affinity antibodies, *J. Biol. Chem.*, 274: 18218-18230 (1999).
- 20 DeMario MD and Ratain MI. Oral chemotherapy: rationale and future directions, *J. Clin. Oncol.*, 16(7): 2557-2567 (1998).
- Dubel *et al.*, Bifunctional and multimeric complexes of streptavidin fused to single chain antibodies (scFv), *J. Immunol. Methods*, 178: 201-209 (1995).
- Gabizon *et al.*, Pharmacokinetics of pegylated liposomal Doxorubicin: review of animal and human studies, *Clin. Pharmacokinet.*, 42: 419-36 (2003).
- 25 Glennie *et al.*, Preparation and performance of bispecific F(ab' gamma)2 antibody containing thioether-linked Fab' gamma fragments, *J. Immunol.*, 139(7): 2367-75 (1987).
- Gosselin & Lee, Folate receptor-targeted liposomes as vectors for therapeutic agents, *Biotechnol. Annu. Rev.*, 8: 103-31 (2002).
- Gregoriadis, Targeting of drugs: implications in medicine, *Lancet*, II: 241-6 (1981).
- 30 Griffiths *et al.*, Isolation of high affinity human antibodies directly from large synthetic repertoires, *EMBO J.*, 13: 3245-3260 (1994).
- Harry, "Bacterial cell division: Regulating Z-ring formation," *Mol. Microbiol.*, 40: 795 (2001).
- Heim *et al.*, "Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein," *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA*, 91: 12501 (1994).
- 35 Henderson *et al.*, Randomized clinical trial comparing mitoxantrone with Doxorubicin in previously treated patients with metastatic breast cancer, *J. Clin. Oncol.*, 7: 560-71 (1989).
- Hiraga *et al.*, "Chromosome partitioning in *Escherichia coli*: novel mutants producing anucleate cells," *J. Bacteriol.*, 171: 1496 (1989).
- 40 Hoshida *et al.*, Gene therapy for pancreatic cancer using an adenovirus vector encoding soluble flt-1 vascular endothelial growth factor receptor, *Pancreas*, 25(2): 111-21 (2002).
- Hu *et al.*, Minibody: A novel engineered anti-carcinoembryonic antigen antibody fragment (single-chain Fv-CH3) which exhibits rapid, high-level targeting of xenografts, *Cancer Res.*, 56: 3055-3061 (1996).
- Hu & Lutkenhaus, "Topological regulation of cell division in *Escherichia coli* involves rapid pole to pole oscillation of the division inhibitor MinC under the control of MinD and MinE," *Mol. Microbiol.*, 34: 82 (1999).
- 45 Hudson & Souriau, Recombinant antibodies for cancer diagnosis and therapy, *Expert Opin. Biol. Ther.*, 1: 845-855 (2001).

- Hudson & Souriau, Engineered antibodies, *Nat. Med.*, 9(1): 129-34 (2003).
- Hung *et al.*, Development of clinical trial of E1A gene therapy targeting HER-2/neu-overexpressing breast and ovarian cancer, *Adv. Exp. Med. Biol.*, 465: 171-80 (2000).
- 5 Ireton *et al.*, *spo0J* is required for normal chromosome segregation as well as the initiation of sporulation in *Bacillus subtilis*, *J. Bacteriol.*, 176: 5320 (1994).
- Janoff, A., editor, *Liposomes, Rational Design*. New York: Marcel Dekker (1998).
- Jones *et al.*, Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse, *Nature*, 321: 522-525 (1986).
- 10 Kaetzel *et al.*, The polymeric immunoglobulin receptor: structure and synthesis, *Biochem. Soc. Trans.*, 25: 475-480 (1997).
- Karpovsky *et al.*, Production of target-specific effector cells using hetero-cross-linked aggregates containing anti-target cell and anti-Fc gamma receptor antibodies, *J. Exp. Med.*, 160(6): 1686-701 (1984).
- 15 Kemp *et al.*, Amifostine pretreatment for protection against cyclophosphamide induced and cisplatin-induced toxicities: results of a randomized control trial in patients with advanced ovarian cancer, *J. Clin. Oncol.*, 14: 2101-2112 (1996).
- Kerem *et al.*, "Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis," *Science*, 245: 1073 (1989).
- Kirmanian *et al.*, A comparison of intravenous versus intraperitoneal chemotherapy for the initial treatment of ovarian cancer, *Gynecol. Oncol.*, 54(3): 338-344 (1994).
- 20 Kleeff *et al.*, Targeting of suicide gene delivery in pancreatic cancer cells via FGF receptors, *Cancer Gene Ther.*, 9(6): 522-32 (2002).
- Knappik *et al.*, Fully synthetic human combinatorial antibody libraries (HuCAL) based on modular consensus frameworks and CDRs randomized with trinucleotides, *J. Mol. Biol.*, 296: 57-86 (2000).
- Kostelny *et al.*, Formation of a bispecific antibody by the use of leucine zippers, *J. Immunol.*, 148(5): 1547-53 (1992).
- 25 Kumanohoso *et al.*, Enhancement of therapeutic efficacy of bleomycin by incorporation into biodegradable poly-D,L-lactic acid, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 40: 112-116 (1997).
- Lasic & Martin, editors, *Stealth liposomes*. Boca Raton: CRC Press (1995).
- Lasic & Papahadjopoulos, editors, *Medical Applications of Liposomes*. New York: Elsevier (1998).
- 30 Levin *et al.*, "Identification of *Bacillus subtilis* genes for septum placement and shape determination," *J. Bacteriol.*, 174: 6717 (1992).
- Mekhail & Markman, Paclitaxel in cancer therapy, *Expert Opin. Pharmacother.*, 3: 755-766 (2002).
- Norris *et al.*, Phase III comparative study of vinorelbine combined with Doxorubicin versus Doxorubicin alone in disseminated metastatic/ recurrent breast cancer, *J. Clin. Oncol.*, 18: 2385-94 (2000).
- 35 Okada *et al.*, "Possible function of the cytoplasmic axial filaments in chromosomal segregation and cellular division of *Escherichia coli*," *Sci. Prog.*, 77: 253 (1993-94).
- Okada *et al.*, "Cytoplasmic axial filaments in *Escherichia coli* cells: possible function in the mechanism of chromosome segregation and cell division," *J. Bacteriol.*, 176: 917 (1994).
- Osborn *et al.*, Current methods for the generation of human antibodies for the treatment of autoimmune diseases, *Drug Delivery Tech.*, 8: 845-851 (2003).
- 40 Pack & Pluckthun, Miniantibodies: use of amphipathic helices to produce functional, flexibly linked dimeric Fv fragments with high avidity in *Escherichia coli*, *Biochemistry*, 31(6): 1579-84 (1992).
- Paridaens *et al.*, Paclitaxel versus Doxorubicin as first-line single-agent chemotherapy for metastatic breast cancer, *J. Clin. Oncol.*, 18: 724-33 (2002).
- 45 Pikaar *et al.*, "Opsonic activities of surfactant proteins A and D in phagocytosis of gram-negative bacteria by alveolar macrophages," *J. Infect. Dis.*, 172: 481 (1995).

- Prasher *et al.*, "Using GFP to see the light," *Trends in Genetics*, 11: 320 (1995).
- Puisieux *et al.*, editores, *Liposomes, New Systems and New Trends in Their Applications*. Paris: Editions de Sant'e (1995).
- 5 Raskin & de Boer, "MinDE-dependent pole-to-pole oscillation of division inhibitor MinC in *Escherichia coli*," *J. Bacteriol.*, 181: 6419 (1999).
- Reeve, "Use of minicells for bacteriophage-directed polypeptide synthesis," *Methods Enzymol.*, 68: 493 (1979).
- Ridgway *et al.*, 'Knobs-into-holes' engineering of antibody CH3 domains for heavy chain heterodimerization, *Protein Eng.*, 9(7): 617-21 (1996).
- Riechmann *et al.*, Reshaping human antibodies for therapy, *Nature*, 332: 323-327 (1988).
- 10 Riezman, "Three clathrin-dependent budding steps and cell polarity," *Trends in Cell Biology.*, 3: 330 (1993).
- Riordan *et al.*, "Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA," *Science*, 245: 1066 (1989).
- Rommens *et al.*, "Identification of the cystic fibrosis gene: Chromosome walking and jumping," *Science*, 245: 1059 (1989).
- 15 Salomon *et al.*, Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 19: 183-232 (1995).
- Sandvig & Deurs, "Endocytosis without clathrin," *Trends in Cell Biology*, 4: 275 (1994).
- Sarosy & Reed, Taxol dose intensification and its clinical implications, *J. Natl. Med. Assoc.*, 85(6): 427-31 (1993).
- 20 Schiller *et al.*, Amifostine, Cisplatin, and Vinblastine in metastatic non-small cell lung cancer: a report of high response rates and prolonged survival, *J. Clin. Oncol.*, 14: 1913-1921 (1996).
- Shangara *et al.*, "Suicide genes: past, present and future perspectives," *Immunology Today*, 21: 48 (2000).
- Shapiro *et al.*, A randomized comparison of intra-arterial versus intravenous BCNU, with or without intravenous 5-fluorouracil, for newly diagnosed patients with malignant glioma, *J. Neurosurg.*, 76: 772-781 (1992).
- 25 Sharma *et al.*, Novel Taxol formulation: polyvinylpyrrolidone nanoparticle encapsulated Taxol for drug delivery in cancer therapy, *Oncology Res.*, 8(8-9): 281-286 (1996).
- Sheets *et al.*, Efficient construction of a large nonimmune phage antibody library: the production of high-affinity human single-chain antibodies to protein antigens, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 6157-6162 (1998).
- 30 Sipos *et al.*, Optimizing interstitial delivery of BCNU from controlled release polymers for the treatment of brain tumors, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 39: 383-389 (1997).
- Slepushkin *et al.*, Sterically stabilized pH-sensitive liposomes. Intracellular delivery of aqueous contents and prolonged circulation in vivo, *J. Biological Chem.*, 272(4): 2382-2388 (1997).
- Speert *et al.*, "Functional characterization of macrophage receptors for In-vitro phagocytosis of nonopsonized pseudomonas-aeruginosa," *J. Clin. Invest.*, 82: 872 (1988).
- 35 Spencer, "Developments in suicide genes for preclinical and clinical applications," *Molecular Therapeutics*, 2: 433 (2000).
- Stewart & D'Ari, "Genetic and morphological characterization of an *Escherichia coli* chromosome segregation mutant," *J. Bacteriol.*, 174: 4513 (1992).
- 40 Thurnher *et al.*, Carbohydrate receptor-mediated gene transfer to human T leukaemic cells, *Glycobiology*, 4(4): 429-35 (1994).
- Todorovska *et al.*, Design and application of diabodies, triabodies and tetrabodies for cancer targeting, *J. Immunol. Methods*, 248: 47-66 (2001).
- Tomlinson & Holliger, Methods for generating multivalent and bispecific antibody fragments, *Methods Enzymol.*, 326: 461-479 (2000).

- Vaughan *et al.*, Human antibodies with subnanomolar affinities isolated from a large non-immunized phage display library, *Nature Biotechnol.*, 14: 309-314 (1996).
- Vaughan *et al.*, Human antibodies by design, *Nature Biotechnol.*, 16: 535-539 (1998).
- 5 Verhoeyen *et al.*, Reshaping human antibodies: grafting an antilysozyme activity, *Science*, 239: 1534-1536 (1988).
- Wachi *et al.*, "New mre genes mreC and mreD, responsible for formation of the rod shape of *Escherichia coli* cells," *J. Bacteriol.*, 171: 6511 (1989).
- White, Liposomal daunorubicin is not recommended in patients with less than advanced HIV related Kaposi's sarcoma, *Aids*, 11: 1412-1413 (1997).
- 10 Woodle & Lasic, Sterically stabilized liposomes, *Biochim. Biophys. Acta*, 1113: 171-99 (1992).
- Wright & Jong, "Interferon-gama depresses binding of ligand by c3b and c3bi receptors on cultured human monocytes, an effect reversed by fibronectin," *Experimental Medi.*, 163: 1245 (1986).
- Yazawa *et al.*, "Current progress in suicide gene therapy for cancer," *World J. Surg.*, 26: 783 (2002).
- 15 Ziady *et al.*, Gene transfer into hepatoma cell lines via the serpin enzyme complex receptor, *Am. J. Physiol.*, 273(2 Pt 1): G545-52 (1997).

**REIVINDICACIONES**

1. Una composición que comprende:
  - 5 (a) una pluralidad de minicélulas intactas derivadas de bacterias que tienen paredes celulares intactas, en donde la pluralidad de minicélulas mantienen estructuras de lipopolisacárido y polipéptido derivadas de las células bacterianas parentales en las superficies de las minicélulas, y en donde las minicélulas se cargan con una cantidad terapéuticamente eficaz de un fármaco de molécula pequeña, y
  - (b) un vehículo farmacéuticamente aceptable para la misma.
2. La composición de la reivindicación 1, en donde la composición comprende menos de aproximadamente 1 célula bacteriana parental contaminante por  $10^{10}$  minicélulas.
- 10 3. La composición de la reivindicación 1 o 2, en donde la composición comprende menos de aproximadamente 1 célula bacteriana parental contaminante por  $10^{11}$  minicélulas.
4. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde las minicélulas derivadas de bacterias comprenden un ligando de superficie.
- 15 5. La composición de la reivindicación 4, en donde el ligando de superficie es un anticuerpo biespecífico unido a las minicélulas, en donde el anticuerpo biespecífico tiene especificidad para un receptor de superficie celular de mamífero y especificidad para las minicélulas.
- 20 6. La composición de la reivindicación 5, en donde el receptor de la superficie celular se selecciona del grupo que consiste en un antígeno carcinoembrionario (CEA), receptores de heregulina HER-2, neu, c-erbB-2, receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), receptor de la asialoglicoproteína, receptor de transferrina, receptor de complejo de enzima serpina, receptor del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR), receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR), receptor de folato, glucocalix de la superficie celular, receptor de carbohidratos y receptor de inmunoglobulina polimérica.
7. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde las minicélulas se derivan de *Salmonella typhimurium*.
- 25 8. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde el fármaco se selecciona del grupo que consiste en un fármaco antivírico, un fármaco antimicrobiano y un fármaco antiparasitario.
9. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde el fármaco es un fármaco quimioterapéutico.
- 30 10. La composición de la reivindicación 9, en donde el fármaco quimioterapéutico es la doxorubicina, vinblastina o paclitaxel.

FIGURA 1

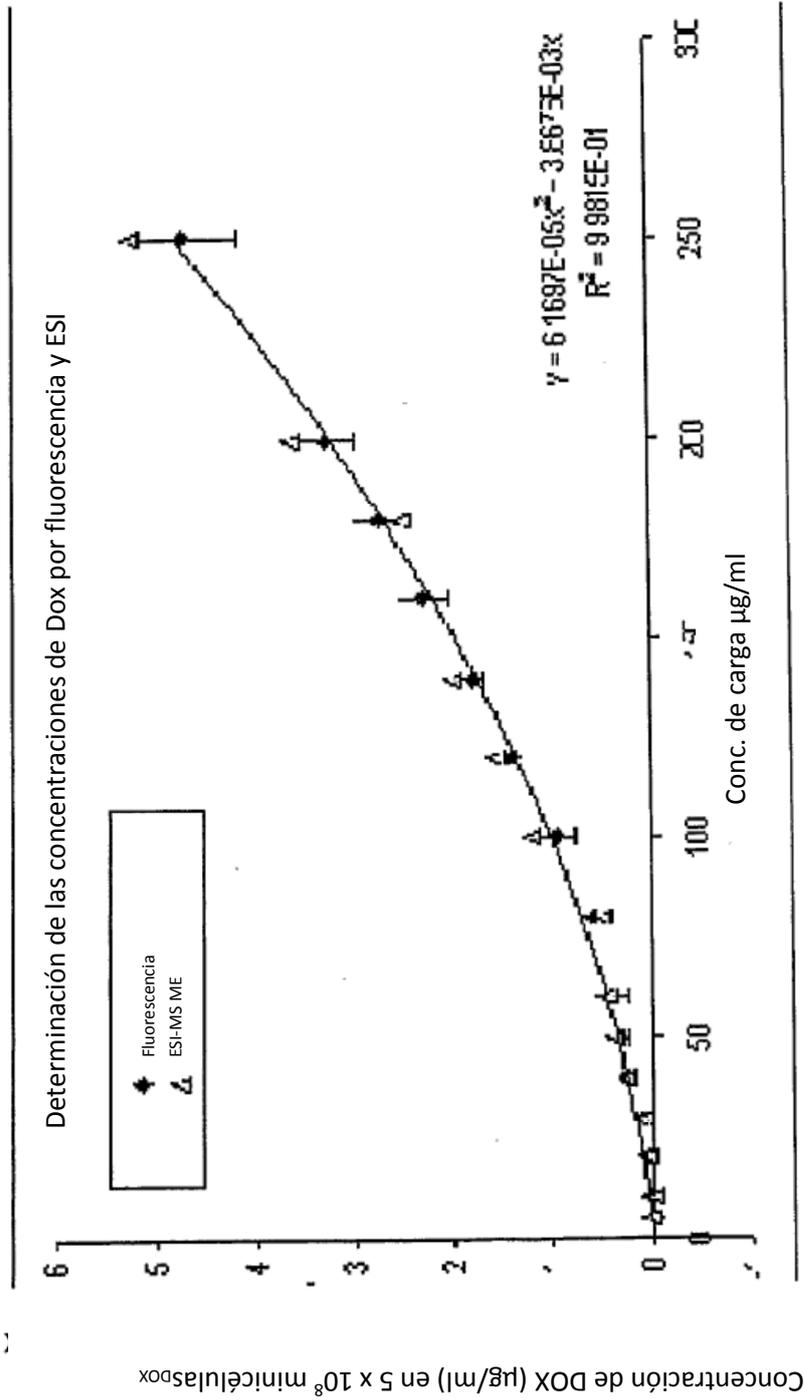


FIGURA 2

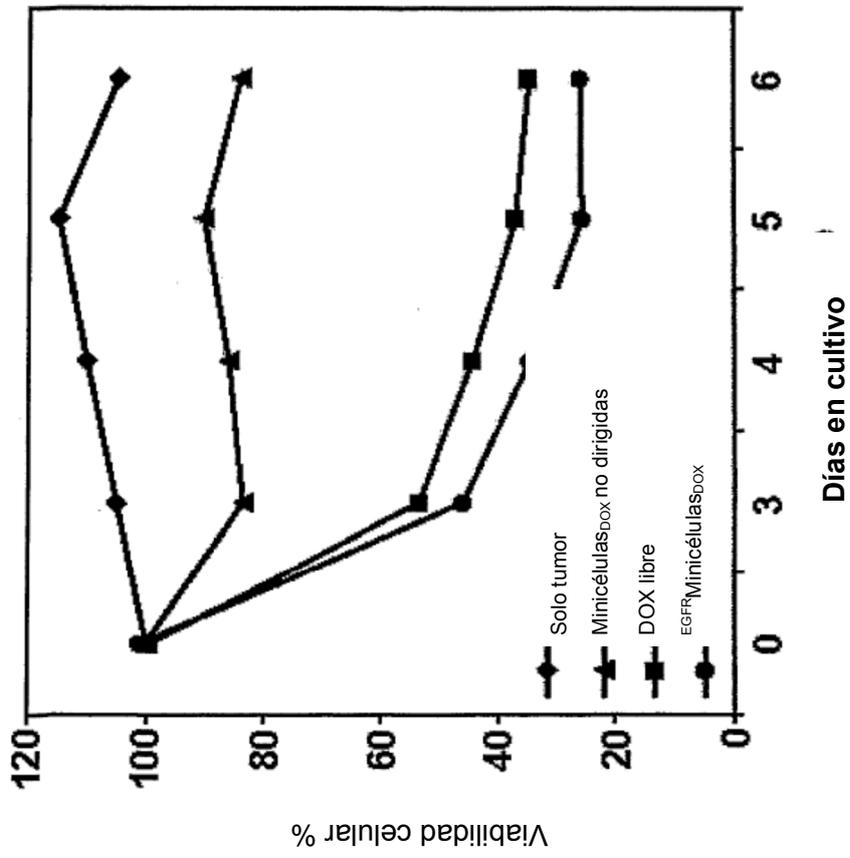


FIGURA 3

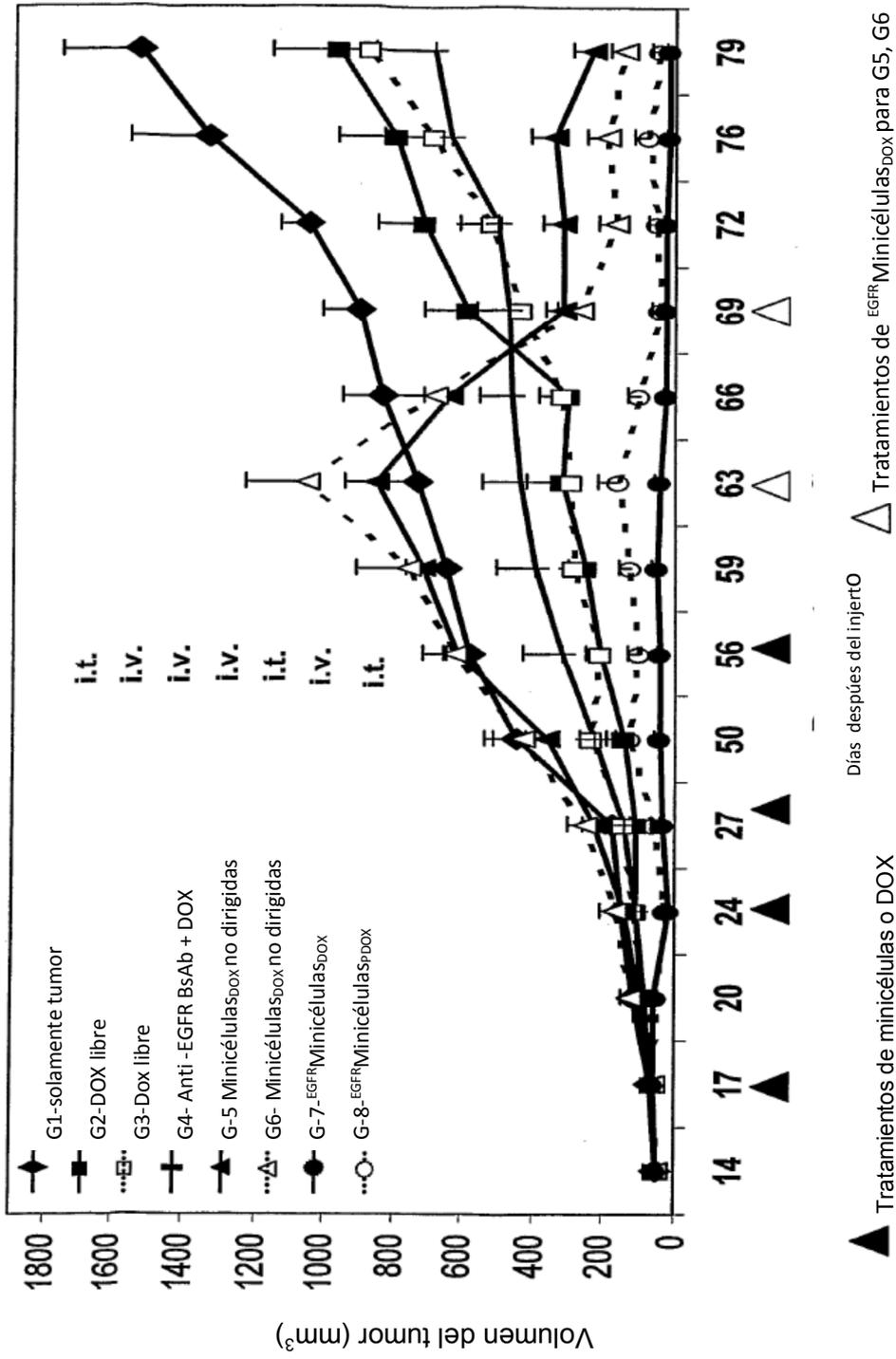


FIGURA 4

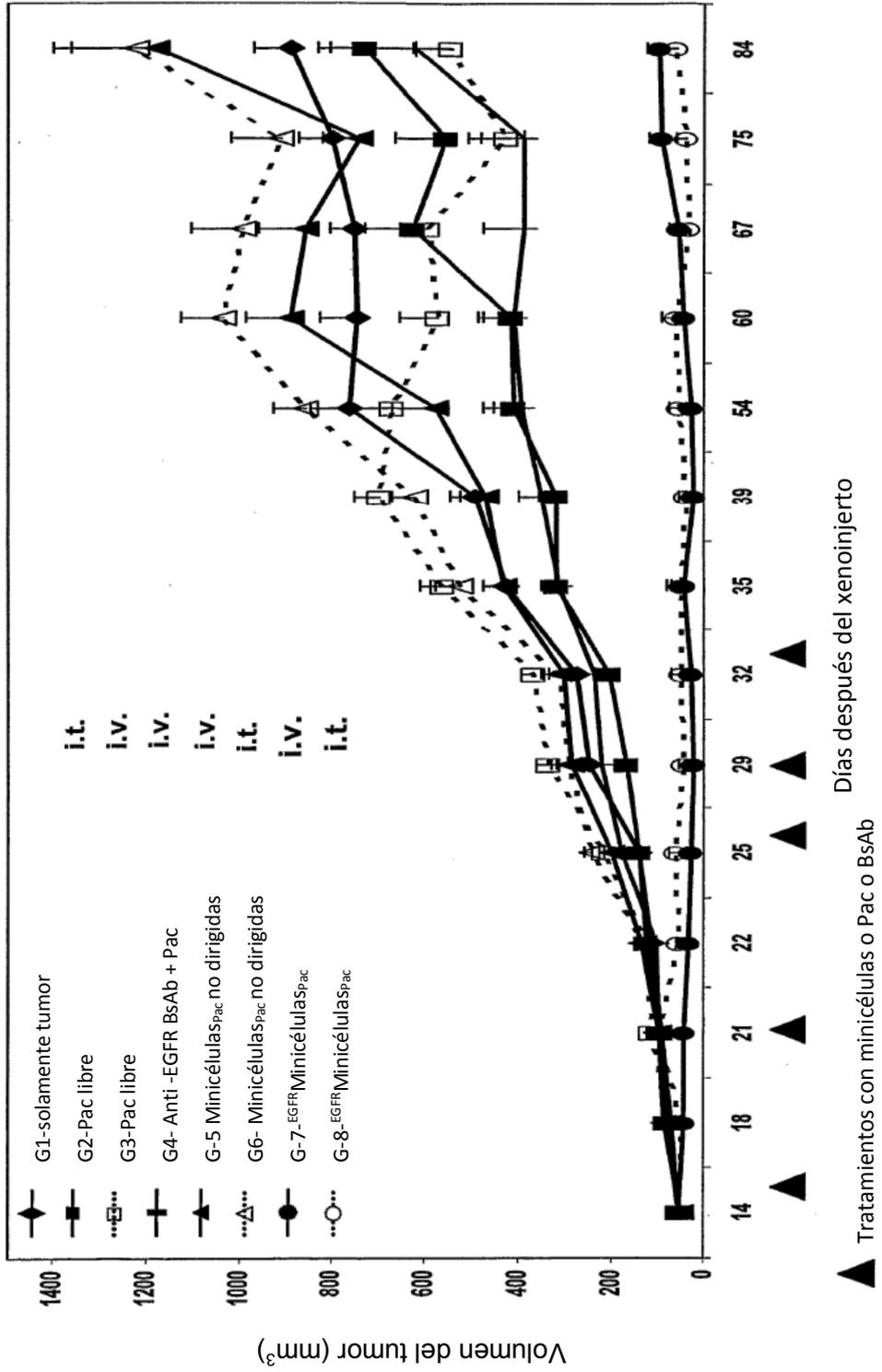


FIGURA 5

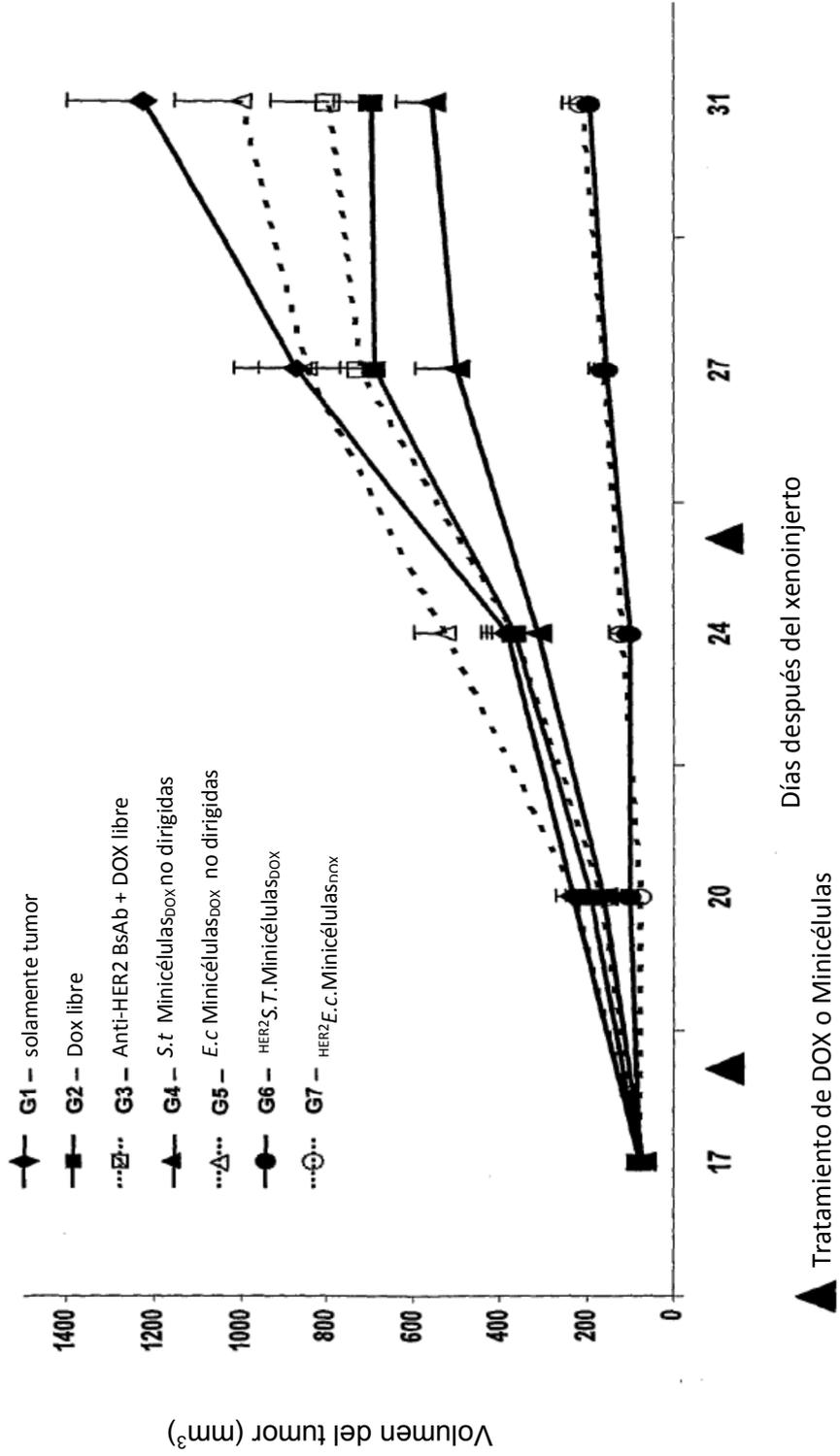


FIGURA 6

