

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 843 402**

51 Int. Cl.:

A61K 9/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.12.2012** **PCT/IB2012/002950**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.06.2013** **WO13088250**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.12.2012** **E 12857452 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.09.2020** **EP 2790668**

54 Título: **Minicélulas intactas de origen bacteriano para la administración de agentes terapéuticos a tumores cerebrales**

30 Prioridad:

13.12.2011 US 201161569907 P

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

16.07.2021

73 Titular/es:

ENGINEIC 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 2 843 402 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

Minicélulas intactas de origen bacteriano para la administración de agentes terapéuticos a tumores cerebrales

Referencia cruzada con solicitudes relacionadas

Esta solicitud reivindica el beneficio de prioridad para la solicitud provisional de EE.UU. N° de serie 61/569.907, presentada el 13 de diciembre de 2011.

Antecedentes

Los tumores cerebrales primarios consisten en un grupo diverso de neoplasias, derivadas de varias líneas celulares diferentes. De acuerdo con una clasificación de la Organización Mundial de la Salud (Louis *et al.*, 2007), los tumores del sistema nervioso central se clasifican en astrocíticos, oligodendrogiales, o mixtos (oligoastrocíticos). Estos tumores se clasifican además por subtipos y se clasifican, según la histología, del I a IV, siendo el grado IV el más agresivo. El glioblastoma multiforme (GBM), la forma más agresiva de tumor cerebral maligno primario, representa aproximadamente del 45% al 50% de todos los tumores cerebrales primarios (Wrensch *et al.*, 2002; Behin *et al.*, 2003) y representa la segunda causa de muerte por cáncer en adultos menores de 35 años (Allard *et al.*, 2009).

A pesar de los numerosos esfuerzos terapéuticos, que incluyen la cirugía citorreductora, la radioterapia y la quimioterapia, el pronóstico de los pacientes con glioma sigue siendo muy malo (Stewart, 2002; Stupp *et al.*, 2005). La mayoría desarrolla finalmente una enfermedad recurrente y progresiva, después de la cual la mediana de supervivencia es de aproximadamente 6 meses (Wong *et al.*, 1999; Lamborn *et al.*, 2008). La supervivencia media de los pacientes con GBM es de aproximadamente 12 a 14 meses (Stupp *et al.*, 2005).

Además, la metástasis cerebral a partir de tumores primarios, tales como de mama, pulmón y piel (melanoma) es un problema de salud pública importante y creciente. Se estima que en los Estados Unidos se diagnosticaron 250.000 pacientes con metástasis cerebral en 2009 (Fox *et al.*, 2011), que es más de 10 veces superior a la incidencia de tumores cerebrales primarios (Jemal *et al.*, 2009). El pronóstico para los pacientes con metástasis cerebral es muy malo, y la mayoría de los pacientes viven sólo de 4 a 6 meses después del diagnóstico. Los regímenes de tratamiento actuales proporcionan mínimos beneficios de supervivencia (Eichler y Loeffler, 2007).

La resección quirúrgica completa de los gliomas es casi imposible, debido a su naturaleza infiltrativa difusa y a su proximidad a estructuras cerebrales vitales. La terapia sistémica también es limitada, en virtud de la llamada barrera hematoencefálica (BHE). Véase, en general, Cecchelli *et al.* (2007).

Esta barrera reside dentro del endotelio capilar del cerebro, y ha sido objeto de estudio durante más de 100 años. De hecho, el hecho de que la mayoría de fármacos candidatos para los tumores cerebrales nunca lleguen a la clínica (Pardridge, 2007) se atribuye en gran parte a su incapacidad para cruzar la BHE y alcanzar niveles que tengan un efecto terapéutico (Groothuis, 2000).

A pesar de los grandes esfuerzos realizados durante varias décadas, las tasas de curación en el tratamiento de los cánceres cerebrales siguen siendo pésimas. El tratamiento del cáncer cerebral representa, por tanto, uno de los mayores desafíos en oncología. Además, el consenso predominante es que la BHE es el principal factor limitante en la administración de fármacos a los tumores cerebrales.

Por consiguiente, hay un esfuerzo considerable a nivel mundial dirigido a descubrir y desarrollar nuevos fármacos que sean lo suficientemente pequeños como para cruzar la BHE y mejorar el resultado de supervivencia de los pacientes con GBM. Además, se están desarrollando técnicas para transportar fármacos más allá de la BHE y al microambiente del tumor cerebral.

Entre los enfoques que se han estudiado, en un intento de evitar la limitación de la BHE, se encuentran los siguientes.

- Alteración hiperosmótica de la BHE (Kroll y Neuwelt, 1998).
- Modificación de la barrera química (Black *et al.*, 1997).
- Los intentos de vincular agentes terapéuticos con compuestos que tienen transportadores a través de la BHE (Bickel *et al.*, 2001; Zhang y Pardridge, 2007).
- Administración directa de fármacos dentro y alrededor de los tumores cerebrales (Hassenbusch *et al.*, 2002; Hau *et al.*, 2002; Reardon *et al.*, 2002; Weber *et al.*, 2002). Este enfoque implica la colocación de discos cargados de fármaco alrededor de un lecho de resección tumoral, la infusión de agentes dentro o alrededor de una cavidad de resección tumoral, o la infusión directa de fármacos en la masa tumoral.
- Administración mejorada por convección o "CED" (de sus siglas en inglés) (Bobo *et al.*, 1994; Morrison *et al.*, 1994; Hadjipanayis *et al.*, 2008; Hadjipanayis *et al.*, 2010). En la CED, una bomba de jeringa impone una pequeña diferencia de presión hidrostática para distribuir la infusión directamente a las regiones del sistema

nervioso central (SNC). La CED es un procedimiento quirúrgico mínimamente invasivo que proporciona convección de líquido en el cerebro mediante un gradiente de presión, que evita la BHE. Los agentes terapéuticos pueden administrarse al cerebro con un mínimo de toxicidad así como, por lo tanto, al tejido normal y a los órganos a los que se accede comúnmente por administración sistémica.

5 Compendio

En vista de los inconvenientes que afectan a los enfoques convencionales en esta área, se proporciona un método para administrar sistémicamente una cantidad eficaz terapéuticamente de una composición compuesta por una pluralidad de minicélulas intactas derivadas de bacterias, donde cada minicélula de la pluralidad abarca un agente anti-neoplásico. Del mismo modo, la presente descripción contempla el empleo de dicha composición para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un tumor cerebral. La pluralidad de minicélulas puede incluir al menos aproximadamente 10^8 minicélulas, que incluyen, pero no se limitan a, al menos aproximadamente 10^{10} minicélulas. Además, una composición como se describe aquí puede contener menos de aproximadamente 10 EU de endotoxina libre y/o como máximo 1 célula bacteriana parental por 10^8 minicélulas, *p.ej.*, por 10^{10} minicélulas.

El agente anti-neoplásico incluido en las minicélulas puede ser un radionúclido, por ejemplo, tal como itrio-90, tecnecio-99m, yodo-123, yodo-131, rubidio-82, talio-201, galio-67, flúor-18, xenón-133, o indio-111, que se puede unir a una proteína o a un carbohidrato en la superficie de las minicélulas, o se puede unir en la superficie del ligando dirigido al tumor unido a la superficie de las minicélulas. En este contexto, la composición puede contener, por ejemplo, entre aproximadamente 30 Gy y aproximadamente 100 Gy de radiactividad. El agente anti-neoplásico también puede ser un fármaco quimioterapéutico, donde, por ejemplo, la composición contiene como máximo aproximadamente 1 mg del mismo. Por otra parte, el agente anti-neoplásico puede ser un ácido nucleico funcional o un polinucleótido que codifica un ácido nucleico funcional. Por tanto, el ácido nucleico funcional puede inhibir un gen que promueve la proliferación de células tumorales, la angiogénesis o la resistencia a la quimioterapia y/o que inhibe la apoptosis o la detención del ciclo celular. Ejemplos de la clase de ácidos nucleicos funcionales son las moléculas de ácido ribonucleico seleccionadas del grupo que consiste en ARNip, miARN, ARNhc, ARNlinc, ARN antisentido y ribozima.

Conforme a determinadas realizaciones de acuerdo con cualquiera de lo anterior, cada minicélula de la pluralidad mencionada anteriormente puede comprender un ligando que tiene una especificidad para un receptor de superficie celular de mamífero no fagocítico, *por ejemplo.*, un antígeno de células tumorales. Por consiguiente, el ligando puede comprender, por ejemplo, un anticuerpo que reconoce específicamente dicho antígeno de células tumorales.

La metodología de esta descripción se puede emplear para tratar una variedad de tumores cerebrales, ejemplificados pero que no se limitan al grupo formado que consiste en glioblastoma, tumor astrocítico, tumor oligodendrogial, ependimoma, craneofaringioma, tumor pituitario, linfoma cerebral primario, tumor de la glándula pineal, tumor primario cerebral de células germinales, y combinaciones de los mismos. El tumor tratado puede ser un tumor cerebral primario o un tumor cerebral metastásico.

Otros objetivos, características, y ventajas son evidentes a partir de la siguiente descripción detallada. La descripción detallada y los ejemplos específicos se proporcionan sólo con fines ilustrativos, ya que varios cambios y modificaciones resultarán evidentes a partir de esta descripción.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Cuantificación del receptor de EGF en células tumorales de cerebro humano (U87-MG) y canino, que se trataron con MAb anti-EGFR, seguido de IgG de cabra anti-ratón conjugado con R-ficoeritrina. Las células se analizaron empleando FACS y se compararon con patrones de microperlas de R-ficoeritrina fluorescente. Las células de control se trataron de la misma manera, excepto por el anticuerpo primario. Los resultados de la cuantificación de EGFR revelaron una concentración de EGFR por célula (en orden decreciente) que para las células BCD-1, U87-MG, BCD-9, BCD-8 y J3T era de 2.866.854, 1.465.755, 930.440, 774.352 y 287.622, respectivamente. Los resultados para cada línea celular se muestran como control (curvas con borde oscuro) y tratados con MAb anti-EGFR (curvas sin borde oscuro).

Figura 2. Se muestran los resultados de un ensayo de proliferación celular (MTS) para determinar la sensibilidad a la doxorubicina de células cancerosas de cerebro humano (U87-MG). y canino. Barras de error, \pm SEM (error estándar de la media).

Figura 3. Los histogramas representativos de los análisis FACS muestran la eficacia de unión de EGFR minicélulas_{Dox} a las células cancerosas del cerebro humano y canino. > 95% de las células en cada caso mostraron una unión significativa de EGFR minicélulas_{Dox}. Las células tratadas con gp120 minicélulas_{Dox} no dirigidas específicamente no mostraron ninguna unión a las células. El anticuerpo anti-gp120 se dirige a la proteína gp120 de la cápside viral del VIH, que no se encuentra en ninguna de las células tumorales.

Figura 4. Las células de tumores cerebrales humanos y caninos se trataron con EGFR minicélulas_{Dox} y gp120 minicélulas_{Dox} control durante 3 horas. Las minicélulas unidas a las células tumorales se visualizaron después del tratamiento con IgG2a-AF488 de cabra anti-ratón (fluorescencia verde, que se muestra con punteado más claro), que se une al componente anti-LPS (IgG2a) de un anticuerpo biespecífico empleado para dirigirse a las respectivas

minicélulas. La imagen de la derecha o cada panel vertical se visualiza para la autofluorescencia de dox (fluorescencia roja, con punteado más oscuro) y muestra que el dox está dentro del núcleo de la mayoría de las células transfectadas. Las imágenes se capturaron utilizando un microscopio de fluorescencia Leica. Barra de escala, 20 μ m.

- 5 Figura 5. Estabilización/regresión tumoral en siete perros con tumores cerebrales en etapa tardía, después del tratamiento con EGFR minicélulas_{Dox}. Las imágenes por resonancia magnética antes del tratamiento (predosis) para cada perro se muestran en la columna vertical de la izquierda. Las columnas verticales central y derecha muestran imágenes de resonancia magnética (IRM), después del tratamiento con EGFR minicélulas_{Dox}, y se muestra el número posterior a la dosis para cada IRM. Las secciones IRM representadas incluyen la sección sagital (BCD-1 y -6), axial (BCD-2 a -5) y frontal (BCD-7). Los volúmenes de los tumores (dimensiones en cm) se muestran debajo de cada IRM, y una flecha indica la ubicación de los tumores respectivos.

Figura 6. Se determinaron los parámetros bioquímicos del suero, después del tratamiento, para siete perros con cánceres cerebrales (BCD-1 a BCD-7). Las líneas horizontales en cada gráfico representan el intervalo de referencia normal en perros. Barras de error, \pm SEM.

- 15 Figura 7. Los parámetros hematológicos del suero se determinaron después del tratamiento de siete perros con cáncer cerebral (BCD-1 a BCD-7). Las líneas horizontales en cada gráfico representan el intervalo de referencia normal en perros. Barras de error, \pm SEM.

Figura 8. Las respuestas de TNF α , IL-6, e IL-10 en suero se ilustran en los siete perros con cáncer cerebral, después del tratamiento con EGFR minicélulas_{Dox}.

- 20 Figura 9. Se muestran las respuestas de anticuerpos anti-LPS en 7 perros con cáncer cerebral (supervivencia), después del tratamiento con EGFR minicélulas_{Dox}.

Figura 10. Se ilustra la supervivencia (en días) de los 7 perros con cáncer cerebral (eje-y a mano izquierda y representado con barras), junto con el número de dosis de EGFR minicélulas_{Dox} administrado (eje-y a mano derecha y se muestran como rombos asociados con cada barra). Las barras con rayas indican perros que están en curso y en remisión. Las barras sólidas más oscuras indican perros que mostraron enfermedad estable hasta que el tumor reapareció, posiblemente debido al desarrollo de resistencia a dox, y estos perros se sacrificaron. La barra sólida más clara es para un perro que estaba en remisión, pero murió debido a una infección no relacionada.

Figura 11.

- 30 (a) Se muestran por separado las imágenes de RM y SPECT después del contraste de T1 registradas conjuntamente, (i) y (iii), y en una visualización de imagen fusionada (ii) en los tres planos ortogonales (frontal, sagital, y transaxial). El área de captación y la región en la que se localizó se indican con flechas. La captación fue menor que en los focos extracerebrales, visto bilateralmente a ambos lados de la cabeza, pero fue la única captación observada dentro del cerebro.

- 35 (b) Se muestran los resultados para otro animal. Las vistas transaxiales sólo se muestran para IRM (i) y SPECT (iii). La captación intensa es evidente en la anomalía demostrada en la resonancia magnética. La imagen (ii) es una visualización co-registrada de imágenes de RM, SPECT, e imágenes fusionadas después del contraste T1. Las flechas indican un área de localización intensa de minicélulas radiomarcadas, que corresponden a una parte de la anomalía en la imagen de RM.

- 40 (c) Se muestran imágenes planas 2D de cuerpo entero a los 30 minutos y 3 horas después de la inyección. Junto con la tiroides y algo de captación en el cuello, se observa una captación temprana en el hígado, con algo de excreción en el intestino visible en las exploraciones tardías.

- 45 Figura 12. Xenoinjertos de cáncer de páncreas humano (MIA PaCa) en ratones Balb/c *nu/nu* (n = 8 por grupo) se administraron i.v. (vía intravenosa) bien con Gemcitabina (Gemzar®) libre o bien con minicélulas empaquetadas con Gemzar dirigidas a EGFR (EGFR Minicélulas_{Gemzar}). Todos los tratamientos de minicélulas recibieron 10^9 minicélulas por dosis. Los días de tratamiento se muestran debajo del eje-x (triángulos). Barras de error: \pm SEM. El gráfico muestra el volumen del tumor en los días indicados después de la administración.

- 50 Figura 13. Xenoinjertos de cáncer de mama humano (MDA-MB-468) en ratones Balb/c *nu/nu* (n = 8 por grupo) se administraron i.v. con carboplatino libre o con minicélulas, empaquetadas con carboplatino, que se dirigen o no a EGFR (EGFR Minicélulas_{Carboplatino}). Todos los tratamientos de minicélulas recibieron 10^9 minicélulas por dosis. Los días de tratamiento se muestran debajo del eje x (flechas). Barras de error: \pm SEM. El gráfico muestra el volumen del tumor en los días indicados después de la administración.

Descripción detallada

La presente divulgación proporciona composiciones y métodos para el tratamiento de tumores cerebrales. A este respecto, los inventores descubrieron que las minicélulas intactas derivadas de bacterias empaquetadas con uno o

más agentes anti-neoplásicos, tras la administración sistémica, se acumulan rápidamente en el microambiente de un tumor cerebral, en concentraciones terapéuticamente significativas. Este hallazgo fue sorprendente porque las minicélulas, de aproximadamente 400 nm de diámetro, son mucho más grandes de lo que la comprensión convencional establece como el límite superior de 12 nm para una partícula que es capaz de cruzar la barrera hematoencefálica (BHE). Véase Sarin *et al.* (2008) y Laquintana *et al.* (2009).

Por consiguiente, los inventores determinaron que se puede tratar una amplia variedad de tumores cerebrales, tanto primarios como metastásicos, administrando sistémicamente una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición compuesta por una pluralidad de tales minicélulas, siendo cada minicélula un vehículo para un agente activo contra el tumor.

(A) Definiciones

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos empleados en esta descripción tienen el mismo significado que el comúnmente entendido por los expertos en la técnica relevante.

Por conveniencia, el significado de ciertos términos y frases empleados en la memoria descriptiva, los ejemplos, y las reivindicaciones adjuntas se proporcionan a continuación. Otros términos y frases se definen a lo largo de la memoria.

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

"Cáncer", "neoplasia", "tumor", "malignidad" y "carcinoma", empleados indistintamente en la presente memoria, se refieren a células o tejidos que muestran un fenotipo de crecimiento anormal caracterizado por una pérdida significativa del control de la proliferación celular. Los métodos y las composiciones de esta descripción se aplican particularmente a células malignas, pre-metastásicas, metastásicas y no metastásicas.

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

Los términos "individuo", "sujeto", "huésped", y "paciente" empleados indistintamente en esta descripción, se refieren a cualquier sujeto mamífero para el que se desea diagnóstico, tratamiento o terapia. El individuo, sujeto, huésped, o paciente puede ser un ser humano o un animal. Por tanto, sujetos adecuados pueden incluir, pero no se limitan a, primates, vacas, caballos, perros, gatos, cobayas, conejos, ratas, y ratones.

Los términos "tratamiento", "que trata", "tratar", y similares, se refieren a la obtención de un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado en un paciente con tumor cerebral. El efecto puede ser profiláctico en términos de prevención total o parcial del tumor cerebral o síntoma del mismo, y/o puede ser terapéutico en términos de una estabilización o curación parcial o completa del tumor cerebral y/o efecto adverso atribuible al tumor cerebral. El tratamiento cubre cualquier tratamiento de un tumor cerebral en un mamífero, particularmente en un ser humano. Un efecto deseado, en particular, es la respuesta tumoral, que se puede medir como la reducción de la masa tumoral o la inhibición del aumento de la masa tumoral. Además de la respuesta del tumor, también se puede emplear clínicamente un aumento de la supervivencia general, la supervivencia sin progreso, o el tiempo hasta la recurrencia del tumor o una reducción del efecto adverso, como un efecto de tratamiento deseado.

(B) Tratamientos

La presente divulgación se refleja y se sustenta en la evidencia experimental de que, según el descubrimiento de los inventores, las minicélulas intactas y derivadas de bacterias, que tienen aproximadamente 400 nm de diámetro, tras la administración intravenosa (iv) se acumulan rápidamente en el microambiente del tumor cerebral en concentraciones terapéuticamente significativas. Los inventores también descubrieron que esta penetración de tumores cerebrales no se basa en la endocitosis/transcitosis endotelial de la BHE ni en ningún otro mecanismo por el que se ha propuesto que las nanopartículas entran en el microambiente del tumor cerebral. Por lo tanto, desde el punto de vista del conocimiento convencional, estos descubrimientos fueron bastante inesperados.

1. Conocimiento convencional sobre un límite de tamaño para cruzar la BHE

Las nanopartículas se han considerado como vehículos potenciales para tomar fármacos que atraviesan la BHE (Juillerat-Jeanneret, 2008). Es ilustrativa a este respecto una estrategia de administración de fármacos con nanopartículas dirigida a superar la BHE mediante la unión de nanopartículas a receptores en el lumen de las células endoteliales que comprenden la BHE, seguida de endocitosis y transcitosis a través de las células endoteliales y en el microambiente del tumor cerebral. Otro enfoque implica aprovechar un "efecto mejorado de permeación y retención", que se analiza a continuación, para efectuar el paso de partículas a través de pequeños espacios entre las células endoteliales de la BHE.

2. Transcitosis de nanopartículas

Se demostró que las nanopartículas de poli(cianoacrilato de butilo (PBCA) recubiertas con polisorbato 80 (Tween®

80) permiten la administración al cerebro de una serie de fármacos que no cruzan la BHE en forma libre (Kreuter *et al.*, 1995, 1997, 2001, 2002, 2003, y 2008; Steiniger *et al.*, 2004).

Dado que el polisorbato 80 promueve selectivamente la adsorción de ciertas proteínas plasmáticas (en particular, las apolipoproteínas E y B, (Petri *et al.*, 2007; Re *et al.*, 2011) en la superficie de estas nanopartículas, permite la unión de estas nanopartículas con los respectivos receptores de lipoproteínas de baja densidad (LDLr; Xin *et al.*, 2011) que se sabe que se sobre-expresan en los vasos capilares sanguíneos endoteliales asociados con la BHE (Dehouck *et al.*, 1994).

Después de la unión al LDLr, las nanopartículas son interiorizadas por las células endoteliales de los vasos sanguíneos (Zensi *et al.*, 2009), sometidas a transcitosis a través de estas células y después transportadas al microambiente del tumor cerebral.

Un esfuerzo mundial para desarrollar nanopartículas para tratar tumores cerebrales se centra en encontrar formas innovadoras de atravesar la BHE mediante la transcitosis de las células endoteliales asociadas a la BHE y su entrada al microambiente del tumor cerebral. Este es un desafío importante en virtud del hecho de que estas partículas deben permanecer intactas durante el movimiento intracelular de transcitosis y no ser degradadas por los lisosomas. Estos últimos son compartimentos intracelulares muy ácidos, que normalmente degradan los materiales que sufren endocitosis.

Un serio inconveniente adicional de este enfoque es el hecho de que el LDLr no es exclusivo de la BHE. Sólo se sobreexpresa en las células endoteliales asociadas con la BHE. Por lo tanto, estas nanopartículas tienen el potencial de ingresar en una gran cantidad de tejidos normales y en el sistema nervioso central normal, ya que estos receptores están ubicuamente localizados en las células endoteliales de todo el sistema circulatorio. Hasta ahora, no se han encontrado receptores que sean exclusivos sólo de los vasos sanguíneos asociados a la BHE y, por lo tanto, el potencial de toxicidad grave para los tejidos normales sigue siendo una preocupación.

3. Entrada pasiva en tumores cerebrales

Una evidencia reciente ha indicado que el límite superior fisiológico del tamaño de poro en la BHE de la microvasculatura del glioma maligno es sólo aproximadamente de 12 nm (Sarin *et al.*, 2008). Además, se ha demostrado que las moléculas deberían ser tan pequeñas como <400 Daltons (Bickel, 2005; Pardridge, 2007) para ser capaces de atravesar los poros que se encuentran en la BHE.

Las limitaciones de tamaño son ampliamente aceptadas entre los investigadores y médicos en el campo. Por ejemplo, una revisión de la bibliografía reciente concluyó que las nanopartículas deben ser menores de 12 nm y tener semividas sanguíneas prolongadas para atravesar la BHE de la microvasculatura del glioma maligno (Laquintana *et al.*, 2009).

Se ha estudiado una variedad de nanopartículas a este respecto, que incluyen liposomas, nanopartículas poliméricas, nanopartículas de lípidos sólidos, micelas poliméricas, y dendrímeros. Después de la administración intravenosa, estas partículas se pueden extravasar, debido a la alteración de la BHE de los vasos del tumor cerebral, no sólo hacia el tumor cerebral, sino también en menor medida hacia el tejido cerebral normal (Moghimi *et al.*, 2005).

Esta focalización pasiva de nanopartículas en tumores cerebrales con BHE alterada generalmente está relacionada con el efecto de retención y permeabilidad mejorada (EPR) mencionado anteriormente, que se considera que juega un papel crítico en la administración de fármacos a tumores sólidos. Por ejemplo, Laquintana *et al.* (2009) refleja la opinión actual de que los liposomas, que normalmente oscilan entre 50 y 150 nm, permanecen dentro de la microvasculatura, por lo que pequeños fármacos quimioterapéuticos encapsulados se difunden a través de la membrana del liposoma y a través de los poros con la BHE de los gliomas malignos. Por tanto, no se cree que las partículas más grandes (50 a 150 nm) se puedan extravasar a través de la BHE mediante alteraciones en la barrera.

Por lo tanto, el entendimiento convencional es que, para cruzar la BHE pasivamente a través del efecto EPR y alcanzar cantidades significativas farmacológicamente en el microambiente del tumor cerebral, las nanopartículas deben tener un tamaño <12 nm y las macromoléculas, tales como los fármacos, deben tener un peso molecular de < 400 Daltons. Esta comprensión se destaca en un artículo de revisión de Pardridge (2010), que enfatiza que "el factor más importante en el desarrollo de fármacos cerebrales es la disponibilidad de una tecnología eficaz de focalización de fármacos cerebrales".

Esto se debe a que la mayoría de los fármacos candidatos para el sistema nervioso central (SNC) no atraviesan la barrera hematoencefálica (BHE). Los biofarmacéuticos, que son fármacos de moléculas grandes, no atraviesan la BHE. Por lo tanto, en ausencia de tecnología dirigida al cerebro, no se pueden desarrollar proteínas recombinantes, anticuerpos monoclonales, péptidos, ARN de interferencia corto (ARNip), y terapias génicas cerebrales, porque estos fármacos no atraviesan la BHE. Con respecto a las moléculas pequeñas, generalmente se supone que estos agentes atraviesan la BHE. Sin embargo, >98% de todas las moléculas pequeñas no atraviesan la BHE (Pardridge *et al.*, 2005). Sólo las moléculas pequeñas solubles en lípidos con un peso molecular (PM) <400 Daltons (Da) atraviesan la BHE a través de la mediación de lípidos. Sin embargo, la mayoría de los fármacos de moléculas pequeñas tienen un PM > 400 Da, o tienen una alta solubilidad en agua, lo que evita la difusión libre a través de la

BHE. Por lo tanto, incluso si el desarrollador de fármacos del SNC se centra en moléculas pequeñas, es probable que aún se requiera una tecnología de focalización de fármacos a la BHE para completar con éxito el programa de desarrollo de fármacos de moléculas pequeñas del SNC para la mayoría de los fármacos.

4. Barreras adicionales para la entrada a tumores cerebrales

- 5 Además de la BHE, la penetración cerebral está aún más restringida por una escasez relativa de fenestras y de vesículas pinocitóticas dentro de las células endoteliales de los capilares del cerebro, así como por la presencia de la matriz extracelular circundante, los pericitos y los procesos del pie de los astrocitos (Hawkins y Davis, 2005). Además, la BHE habitualmente se considera inaccesible a fármacos y macromoléculas a través de numerosas proteínas transportadoras de fármacos, que movilizan los fármacos fuera del cerebro.
- 10 Por ejemplo, se ha demostrado que los transportadores dependientes de ATP pueden restringir en gran medida la penetración cerebral de agentes terapéuticos, incluso aquellos con propiedades fisicoquímicas favorables que se predijo que atravesarían la BHE con relativa facilidad. La mayoría de estos transportadores pertenecen a dos superfamilias, el casete de unión a ATP (ABC) y las familias de transportadores de solutos. La glicoproteína P (P-gp, ABCB1), la proteína de resistencia al cáncer de mama (BCRP, ABCG2), y las proteínas asociadas a la resistencia a
- 15 múltiples fármacos (MRPs, ABCCs) son miembros importantes de la familia ABC. Véase Schinkel (1999), Borst *et al.* (2000), Sun *et al.* (2003), Schinkel y Jonker (2003), Kushara y Sugiyama (2005), Loscher y Potschka (2005), y Nicolazzo y Katneni (2009).

Por consiguiente, los presentes inventores encontraron realmente sorprendente que las minicélulas intactas derivadas de bacterias se acumularan en los tumores cerebrales, a pesar del hecho de que las minicélulas son considerablemente más grandes (~400 nm) que el límite de tamaño superior de consenso (<12 nm) para que las nanopartículas entren en tumores cerebrales. También fue inesperado el hallazgo de que las minicélulas ingresaran al cerebro de forma pasiva, a través de la BHE alterada. A este respecto, los inventores hicieron la sorprendente observación de que los vasos sanguíneos asociados con tumores cerebrales no son sólo similares a la BHE. Incluso en una etapa temprana, se encontró que un tumor en crecimiento tiene muchos vasos sanguíneos, particularmente

20 en su núcleo. Tales vasos sanguíneos muestran una pérdida de integridad; es decir, los vasos tienen grandes fenestraciones y tienen "fugas", a diferencia de los vasos similares a la BHE. Por lo tanto, en contravención del entendimiento convencional, las partículas que son tan grandes como minicélulas, *es decir*, mucho más grandes que las limitaciones de tamaño de poro de la BHE de consenso discutidas anteriormente, no obstante son más pequeñas que las fenestraciones en las paredes del vaso sanguíneo con fugas; por tanto, se pueden extravasar pasivamente a través de estas fenestraciones y entrar en el microambiente del tumor cerebral.

Por otra parte, los inventores encontraron según el hallazgo que el tamaño relativamente grande de las minicélulas intactas derivadas de bacterias en realidad es un factor positivo, incluso clave, en la rapidez con la que se alcanzan concentraciones de minicélula significativas terapéuticamente en el microambiente del tumor cerebral. Es decir, cuanto más pequeña es la partícula, más probable es que la partícula sea restringida por el flujo sanguíneo en los vasos

35 sanguíneos. Por el contrario, las minicélulas son partículas de una masa relativamente mayor y, por tanto, se ven menos afectadas por la fuerza ejercida por el flujo sanguíneo. En consecuencia, es más probable que las minicélulas sigan un camino a través de los capilares sanguíneos que den como resultado colisiones repetidas contra las paredes endoteliales de los capilares sanguíneos. Este fenómeno puramente físico aumenta la probabilidad de que las minicélulas, como partículas más grandes, sean empujadas a través de las fenestraciones en la vasculatura con fugas que, como descubrieron los inventores, es el sello distintivo de la BHE alterada en los tumores.

Hay más de 100 mil millones de capilares en el cerebro humano, que presentan una longitud total de aproximadamente 400 millas y, sin embargo, el volumen intra-endotelial de estos capilares es sólo de aproximadamente 1 µL/g de cerebro (Pardridge, 2011). Se cree que esta alta densidad de vasos sanguíneos en el cerebro también contribuye a la acumulación rápida y de alta concentración de minicélulas en los tumores

45 cerebrales, según el hallazgo.

Reconociendo que el diámetro del lumen capilar asociado con la BHE puede ser tan pequeño como 1 µm, los inventores tuvieron la idea de que partículas tan grandes como minicélulas derivadas de bacterias intactas (~ 400 nm) serían aproximadamente la mitad del diámetro de los vasos capilares sanguíneos asociados con la BHE y, por lo tanto, se extravasarían rápidamente desde la BHE alterada, donde los espacios tienen un tamaño superior a 400

50 nm. Por otro lado, debido a que las fenestraciones en la vasculatura normal del cuerpo de los mamíferos no superan los 100 µm de tamaño, las minicélulas intactas derivadas de bacterias que se introducen sistémicamente, de acuerdo con el hallazgo, se retienen en el sistema vascular general hasta que se eliminan mediante células fagocíticas profesionales en el sistema reticuloendotelial o hasta que se extravasan pasivamente desde la vasculatura con fugas al microambiente del tumor cerebral.

Por consiguiente, cuando se administran por vía i.v. dos tipos de nanopartículas en igual cantidad, *por ejemplo* nanopartículas de menos de 12 nm de diámetro y minicélulas intactas derivadas de bacterias, entonces uno esperaría que la concentración circulante de las partículas más pequeñas disminuyera rápidamente, ya que se extravasarían de la circulación sanguínea en los tejidos normales, donde la vasculatura tiene poros mayores de 12 nm. Se sabe, por ejemplo, que el hígado y el tejido gastrointestinal tienen fenestraciones vasculares normales de

aproximadamente 100 nm (Wisse *et al.*, 2008), y la piel periférica tiene fenestraciones en el intervalo de ~40 nm. Por el contrario, las minicélulas serían demasiado grandes para salir de la vasculatura normal; por lo tanto, se esperaría que permanecieran en una alta concentración en la circulación sanguínea normal, por lo que un mayor número se extravasaría al microambiente del tumor cerebral, como se describió anteriormente.

- 5 De acuerdo con una realización, por lo tanto, la presente divulgación proporciona un tratamiento para un tumor cerebral que implica administrar una cantidad eficaz terapéuticamente de una composición compuesta por una pluralidad de minicélulas intactas derivadas de bacterias que portan un agente anti-neoplásico. La administración de la composición que contiene minicélulas es preferiblemente sistémica, *por ejemplo*, intravenosa o intra-arterial.

(C) Agentes anti-neoplásicos

- 10 Como se señaló, las composiciones de minicélulas de la presente divulgación son útiles para administrar agentes anti-neoplásicos a los tumores cerebrales. En este contexto, la frase "agente anti-neoplásico" denota un fármaco, ya sea químico o biológico, que previene o inhibe el crecimiento, desarrollo, maduración, o propagación de células neoplásicas.

- 15 En el contexto de esta divulgación, la selección de un agente anti-neoplásico para tratar un paciente con tumor cerebral determinado depende de varios factores, de acuerdo con la práctica médica convencional. Estos factores incluyen, pero no se limitan a, la edad del paciente, la puntuación de Karnofsky, y cualquier terapia previa que el paciente haya recibido. Véase, en general, PRINCIPLES AND PRACTICE OF NEURO-ONCOLOGY, M. Mehta (Demos Medical Publishing 2011), y PRINCIPLES OF NEURO-ONCOLOGY, D. Schiff y P. O'Neill, eds. (McGraw-Hill 2005).

- 20 De manera más general, el estándar de atención aplicable a un cáncer cerebral determinado recomienda, en primera instancia, las consideraciones clínicas que deben informar la elección del agente activo a utilizar. Esta perspectiva guiaría la selección, por ejemplo, de un agente activo a partir de una lista, que se reproduce a continuación en la Tabla 1, que ha publicado la Universidad de California en Los Ángeles sobre agentes anti-neoplásicos que son adecuados para tratar tumores cerebrales.

Tabla 1. Agentes anti-neoplásicos conocidos para tratar tumores cerebrales

| | | |
|--|---|-------------------------------------|
| 5FC | Accutane Hoffmann-La Roche | AEE788 Novartis |
| AMG-102 | Antineoplastón | AQ4N (Banoxantrona) |
| AVANDIA (maleato de rosiglitazona) | Avastin (Bevacizumab) Genetech | BCNU |
| BiCNU Carmustina | Carboplatino | CCI-779 |
| CCNU | CCNU Lomustina | Celecoxib (sistémico) |
| Cloroquina | Cilengitida (EMD 121974) | Cisplatino |
| CPT -11 (CAMPTOSAR, irinotecán) | Cytosan | Dasatinib (BMS-354825, Sprycel) |
| Terapia de células dendríticas | Etopósido (Eposina, Etopophos, Vepesid) | GDC-0449 |
| Gleevec (mesilato de imatinib) | GLIADEL Wafer | Hidroxiclороquina |
| Hidroxiurea | IL-13 | IMC-3G3 |
| Terapia inmunológica | Iressa (ZD-1839) | Lapatinib (GW572016) |
| Metotrexato para el cáncer (sistémico) | Novocure | OSI-774 |
| PCV | Procarbazina | RAD001 Novartis (inhibidor de mTOR) |
| Rapamicina (Rapamune, Sirolimus) | RMP-7 | RTA 744 |
| Simvastatina | Sirolimus | Sorafenib |
| SU-101 | SU5416 Sugén | Sulfasalazina (Azulfidina) |
| Sutent (Pfizer) | Tamoxifeno | TARCEVA (erlotinib HCl) |
| Taxol | TEMODAR Schering-Plough | TGF-B Antisentido |
| Thalomid (talidomida) | Topotecán (sistémico) | VEGF Trap |
| VEGF Trap | Vincristina | Vorinostat (SAHA) |
| XL 765 | XL184 | XL765 |
| Zarnestra (tipifarnib) | ZOCOR (simvastatina) | |

25

De acuerdo con la divulgación, también se puede seleccionar un fármaco de una de las clases detalladas a continuación, para empaquetarlo en minicélulas intactas derivadas de bacterias, que luego se administran para tratar un cáncer cerebral.

- Agentes alquilantes polifuncionales, ejemplificados por Ciclofosfamida (Cytosan), Mecloretamina, Melfalán (Alkeran), Clorambucilo (Leukeran), Tiotepa (Thioplex), Busulfán (Myleran).
- Fármacos alquilantes, ejemplificados por Procarbazina (Matulane), Dacarbazina (DTIC), Altretamina (Hexalen), Clorambucilo, Cisplatino (Platinol), Carboplatino, Ifosfamida, Oxaliplatino.
- 5 • Antimetabolitos, ejemplificado por Metotrexato (MTX), 6-Tiopurinas (Mercaptopurina [6-MP], Tioguanina [6-TG]), Mercaptopurina (Purinethol), Tioguanina, Fludarabina fosfato, Cladribina: (Leustatina), Pentostatina, Flurouracilo (5-FU), Citarabina (ara-C), Azacitidina.
- 10 • Alcaloides vegetales, terpenoides e inhibidores de la topoisomerasa, ejemplificados por Vinblastina (Velban), Vincristina (Oncovin), Vindesina, Vinorelbina, Podofilotoxinas (etopósido {VP-16} y tenipósido {VM-26}), Camptotecinas (topotecán e irinotecán), Taxanos, tales como Paclitaxel (Taxol) y Docetaxel (Taxotere).
- Antibióticos, ejemplificados por Doxorrubicina (Adriamicina, Rubex, Doxil), Daunorrubicina, Idarubicina, Dactinomicina (Cosmegen), Plicamicina (Mitramicina), Mitomicina: (Mutamycin), Bleomicina (Blenoxane).
- 15 • Agentes hormonales, ejemplificados por inhibidores de estrógenos y andrógenos (Tamoxifeno y Flutamida), agonistas de hormonas liberadoras de gonadotropina (Leuprolida y Goserelina (Zoladex)), inhibidores de aromatasas (Aminoglutetimida y Anastrozol (Arimidex)).
- Fármacos varios contra el cáncer, ejemplificados por Amsacrina, Asparaginasa (El-spar), Hidroxiurea, Mitoxantrona (Novantrone), Mitotano (Lysodren), derivados del ácido retinoico, factores de crecimiento de la médula ósea (sargramostim y filgrastim), Amifostina.
- Agentes que alteran el metabolismo del folato *por ejemplo* Pemetrexed.
- 20 • Agentes hipometilantes del ADN, *por ejemplo*, Azacitidina, Decitabina.
- Inhibidores de la vía de la poli(adenosina difosfato [ADP]-ribosa) polimerasa (PARP), tales como Iniparib, Olaparib, Veliparib.
- Inhibidores de la vía PI3K/Akt/mTOR, por ejemplo Everolimus.
- 25 • Inhibidores de histona desacetilasa (HDAC), por ejemplo, Vorinostat, Entinostat (SNDX-275), Mocetinostat (MGCD0103), Panobinostat (LBH589), Romidepsina, Ácido valproico.
- Inhibidores de la quinasa dependiente de ciclina (CDK), por ejemplo, Flavopiridol, Olomoucine, Roscovitine, Kenpaulona, AG-024322 (Pfizer), Fascaplisina, Ryuvidina, Purvalanol A, NU2058, BML-259, SU 9516, PD-0332991, P276-00.
- 30 • Inhibidores de la proteína de choque térmico (HSP90), por ejemplo., Geldanamicina, Tanespimicina, Alvespimicina, Radicicol, Deguelina, BIIB021.
- Inhibidores murinos de doble minuto 2 (MDM2), por ejemplo., Cis-imidazolina, benzodiazepinediona, espiro-oxindoles, Isoquinolinona, Tiofeno, 5-Deazaflavina, Triptamina.
- inhibidores de la quinasa del linfoma anaplásico (ALK), por ejemplo., Aminopiridina, Diaminopirimidina, Piridoisoquinolina, Pirrolopirazol, Indolocarbazol, Pirrolopirimidina, Dianilinoipirimidina.
- 35 • Inhibidores de la poli [ADPRibosa] polimerasa (PARP), ilustrado por Benzamida, Ftalazinona, Indol tricclico, Benzimidazol, Indazol, Pirrolocarbazol, Ftalazinona, Isoindolinona.

Los agentes activos utilizables en la presente divulgación no se limitan a las clases de fármacos o agentes particulares enumerados anteriormente. Diferentes plataformas de descubrimiento continúan produciendo nuevos agentes que se dirigen a firmas moleculares únicas de células cancerosas; de hecho, se han descubierto miles de estos fármacos químicos y biológicos, de los cuales sólo algunos se enumeran aquí. Sin embargo, la sorprendente capacidad de las minicélulas intactas derivadas de bacterias para acomodar el empaquetamiento de una diversa variedad de agentes activos, hidrófilos o hidrófobos, significa que esencialmente cualquier fármaco, cuando se empaqueta en minicélulas, tiene el potencial de tratar un cáncer cerebral, de acuerdo con la hallazgos en la presente divulgación.

En principio, la idoneidad potencial de un agente anti-neoplásico dado para tratar un tumor cerebral está en parte en función de si el agente puede administrarse eficazmente al cerebro. Con el beneficio de los presentes hallazgos, en los que las minicélulas cargadas con fármaco atraviesan la BHE y entregan una carga útil de fármaco en un tumor cerebralde manera específica, muchos fármacos que de otro modo no habrían demostrado su eficacia para tratar un tumor cerebral ahora serán candidatos viables para dicho tratamiento. Por consiguiente, en esta descripción, la categoría "agente anti-neoplásico" no se limita a fármacos de eficacia conocida para la terapia del cáncer cerebral,

sino que también abarca agentes que se determinan por tener una o más de las actividades mencionadas anteriormente contra las células neoplásicas.

Asimismo, son ilustrativos de la clase de agentes anti-neoplásicos los radionúclidos, los fármacos quimioterapéuticos, y los ácidos nucleicos funcionales, que incluyen, pero no se limitan a, los reguladores de ARN.

5 1. Radionúclidos

Un "radionúclido" es un átomo con un núcleo inestable, *es decir*, caracterizado por un exceso de energía disponible para impartir bien a una partícula de radiación recién creada dentro del núcleo o bien a un electrón atómico. Por lo tanto, un radionúclido sufre una desintegración radiactiva, y emite rayos gamma y/o partículas subatómicas. Se conocen numerosos radionúclidos en la técnica, y se sabe que varios de ellos son adecuados para uso médico, tales como itrio-90, tecnecio-99m, yodo-123, yodo-131, rubidio-82, talio-201, galio-67, flúor-18, xenón-133, e indio-111.

Los radionúclidos se han utilizado ampliamente en la medicina nuclear, en particular como emisores de rayos beta para dañar las células tumorales. Por lo tanto, los radionúclidos se emplean de manera adecuada, como agentes anti-neoplásicos en la presente divulgación.

Los radionúclidos se pueden asociar con minicélulas intactas derivadas de bacterias mediante cualquier técnica conocida. Por lo tanto, una proteína u otro resto de superficie de minicélulas (véase más abajo) se puede marcar con un radionúclido, utilizando un medio de marcaje disponible comercialmente, tal como el empleo del reactivo de yodación Pierce, un producto de Pierce Biotechnology Inc. (Rockford, IL), detallado en Rice *et al.* (2011). Alternativamente, se pueden incorporar radionúclidos en proteínas que se encuentran dentro de las minicélulas.

En la última situación, una cepa bacteriana productora de minicélulas se transforma con ADN plasmídico que codifica una proteína extraña. Cuando se forman minicélulas durante la división celular asimétrica, varias copias del ADN plasmídico se segregan en el citoplasma de la minicélula. Las minicélulas recombinantes resultantes se incuban, en presencia de aminoácidos radiomarcados, en condiciones tales que la proteína extraña expresada dentro de la minicélula, a partir del ADN plasmídico, incorpore los aminoácidos portadores de radionúclidos. De acuerdo con el protocolo de Clark-Curtiss y Curtiss (1983), por ejemplo, las minicélulas recombinantes se incuban en un medio de crecimiento mínimo que contiene ³⁵S-metionina, mediante la cual las proteínas codificadas por plásmidos de nueva expresión incorporan ³⁵S-metionina. Se puede utilizar un enfoque similar para que las minicélulas recombinantes se empaqueten con otros radiomarcadores, según se desee.

Los oligosacáridos en la superficie de la minicélula también pueden marcarse radiactivamente empleando, por ejemplo, protocolos bien establecidos descritos por Fukuda (1994). Es ilustrativo de tales oligosacáridos que son endémicos de minicélulas, el componente O-polisacárido del lipopolisacárido (LPS) que se encuentra en la superficie de minicélulas derivadas de bacterias Gram-negativas (véase más abajo).

Una metodología preferida a este respecto es radiomarcarse un anticuerpo biespecífico que se emplea para dirigir minicélulas a tumores específicos. Véase la sección G, de abajo y la publicación de Patente US 2007/0237744, cuyo contenido se incorpora en la presente memoria como referencia. Es decir, el anticuerpo biespecífico "revestido" en una minicélula expone una cantidad significativa de proteína de superficie adicional para el radiomarcaje. Por consiguiente, es posible lograr una actividad específica más alta del radiomarcador asociado con la minicélula recubierta de anticuerpo. Por el contrario, el radiomarcaje de minicélulas sin recubrimiento, *es decir*, cuando el radionúclido marca sólo restos endémicos, puede dar como resultado un marcaje más débil (actividad específica más baja). En una realización, se cree que este marcaje más débil ocurre porque las proteínas asociadas a la membrana externa de las minicélulas derivadas de bacterias Gram-negativas están enmascaradas por LPS, que, como se analiza más adelante, comprende largas cadenas de O-polisacárido que cubren la superficie de la minicélula.

Para tratar un tumor cerebral, una composición de la divulgación se administraría en una dosis o en múltiples dosis que proporciona en su totalidad un nivel de irradiación en el tumor que es suficiente al menos para reducir la masa tumoral, si no elimina el tumor por completo. El progreso del tratamiento se puede controlar a lo largo de esta línea, caso por caso. Sin embargo, en términos generales, la cantidad de radiactividad empaquetada en la composición será normalmente del orden de aproximadamente 30 a 50 Gy, aunque la invención también contempla una mayor cantidad de radiactividad, digamos, aproximadamente 50 a 100 Gy, lo que proporciona un intervalo entre aproximadamente 30 Gy y aproximadamente 100 Gy.

En algunos casos, la cantidad de radiactividad empaquetada en la composición puede ser incluso menor que la mencionada anteriormente, dada la administración altamente eficiente y específica de los radionúclidos nacidos de minicélulas para un tumor cerebral. Por consiguiente, en un aspecto, la composición contiene de aproximadamente 20 a 40 Gy, o de aproximadamente 10 a 30 Gy, o de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 Gy, o menos de 10 Gy.

2. Fármacos quimioterapéuticos

Un agente anti-neoplásico empleado en la presente divulgación también puede ser un fármaco quimioterapéutico. En esta descripción, "fármaco quimioterapéutico", "agente quimioterapéutico" y "quimioterapia" se emplean indistintamente para connotar un fármaco que tiene la capacidad de matar o destruir una célula neoplásica. Un agente

quimioterapéutico puede ser un fármaco de molécula pequeña o un fármaco biológico, como se detalla a continuación.

La subcategoría "fármaco de molécula pequeña" abarca compuestos orgánicos caracterizados por tener (i) un efecto sobre un proceso biológico y (ii) un peso molecular relativamente bajo, en comparación con una macromolécula. Los fármacos de molécula pequeña normalmente tienen aproximadamente 800 Daltons o menos, donde "aproximadamente" indica que el valor de peso molecular calificado está sujeto a variaciones en la precisión de la medición y a un error experimental del orden de varios Daltons o decenas de Dalton. Por tanto, un fármaco de molécula pequeña puede tener un peso molecular de aproximadamente 900 Daltons o menos, aproximadamente 800 o menos, aproximadamente 700 o menos, aproximadamente 600 o menos, aproximadamente 500 o menos, o aproximadamente 400 Daltons o menos. Más específicamente, un fármaco quimioterapéutico de molécula pequeña puede tener un peso molecular de aproximadamente 400 Daltons o más, aproximadamente 450 Daltons o más, aproximadamente 500 Daltons o más, aproximadamente 550 Daltons o más, aproximadamente 600 Daltons o más, aproximadamente 650 Daltons o más, aproximadamente 700 Daltons o más, o aproximadamente 750 Daltons o más. En otra realización, el fármaco quimioterapéutico de molécula pequeña empaquetado en las minicélulas tiene un peso molecular entre aproximadamente 400 y aproximadamente 900 Daltons, entre aproximadamente 450 y aproximadamente 900 Daltons, entre aproximadamente 450 y aproximadamente 850 Daltons, entre aproximadamente 450 y aproximadamente 800 Daltons, entre aproximadamente 500 y aproximadamente 800 Daltons, o entre aproximadamente 550 y aproximadamente 750 Daltons.

Para los propósitos de esta descripción, un "fármaco biológico" se define, por el contrario, para denotar cualquier macromolécula activa biológicamente que se pueda crear por un proceso biológico, excluyendo los "ácidos nucleicos funcionales", que se analizan a continuación, y los polipéptidos que por tamaño se clasifican como fármacos de moléculas pequeñas como se definió anteriormente. La subcategoría "fármaco biológico", por tanto, es exclusiva y no se superpone con las subcategorías de fármaco de molécula pequeña y ácido nucleico funcional. Son ilustrativos de fármacos biológicos las proteínas y anticuerpos terapéuticos, ya sean naturales o recombinantes o sintéticos, por ejemplo, producidos empleando las herramientas de la química médica y el diseño de fármacos.

Hasta ahora se entendía de forma generalizada que las moléculas de más de 400 Daltons no podrían atravesar los poros que se encuentran en la BHE (Bickel, 2005; Pardridge, 2007); por tanto, no serían adecuados para tratar tumores cerebrales. Sin embargo, cuando se empaquetan en minicélulas, estos fármacos quimioterapéuticos llegan a las células tumorales cerebrales específicas, sin atravesar la BHE.

Por otra parte, tanto si se trata de un fármaco de pequeño peso molecular como de un fármaco biológico, determinadas moléculas diseñadas con fines quimioterapéuticos fallan durante los ensayos clínicos o pre-clínicos debido a una toxicidad inaceptable u otros problemas de seguridad. Los presentes inventores han demostrado que el empaquetamiento de un fármaco quimioterapéutico en una minicélula, seguido de la administración sistémica a un paciente con tumor, tal como un paciente con tumor cerebral, da como resultado la administración del fármaco a las células tumorales. Además, incluso después de que las células tumorales se rompan y el citoplasma que contiene el fármaco se libere al tejido normal cercano, el resultado no es tóxico para el tejido normal. Esto se debe a que el fármaco ya está unido a las estructuras celulares del tumor, tal como el ADN, y ya no puede atacar a las células normales. Por consiguiente, la presente invención es particularmente útil para la administración a un paciente con tumor de fármacos quimioterapéuticos altamente tóxicos.

Las frases "fármaco quimioterapéutico altamente tóxico" o "fármaco quimioterapéutico supertóxico" en esta descripción se refieren a fármacos quimioterapéuticos que tienen una dosis letal relativamente baja en comparación con su dosis eficaz para un cáncer dirigido. Por lo tanto, en un aspecto, un fármaco quimioterapéutico altamente tóxico tiene una dosis letal media (LD_{50}) que es menor que su dosis eficaz media (ED_{50}) para un cáncer dirigido, tal como (1) un tipo de cáncer para el que se diseña el fármaco, (2) el primer tipo de cáncer en el que se realiza un ensayo clínico o pre-clínico para ese fármaco, o (3) el tipo de cáncer en que el fármaco muestra la mayor eficacia entre todos los cánceres probados. Por ejemplo, un fármaco quimioterapéutico altamente tóxico puede tener una LD_{50} que es inferior a aproximadamente 500%, 400%, 300%, 250%, 200%, 150%, 120%, o 100% de la ED_{50} del fármaco para un cáncer dirigido. En otro aspecto, un fármaco quimioterapéutico altamente tóxico tiene una dosis subletal máxima (*es decir*, la dosis más alta que no causa toxicidad grave o irreversible) que es menor que su dosis mínima eficaz para un cáncer diana, *por ejemplo* aproximadamente 500%, 400%, 300%, 250%, 200%, 150%, 120%, 100%, 90%, 80%, 70%, 60% o 50% de la dosis mínima eficaz.

Según una divulgación de la presente descripción, por lo tanto, se trata un tumor cerebral en un sujeto mediante un método que comprende la administración sistémica de una cantidad eficaz terapéuticamente de una composición compuesta por una pluralidad de minicélulas intactas derivadas de bacterias, cada una de las cuales comprende un fármaco quimioterapéutico altamente tóxico. Los maitansinoides y duocarmicinas, que se analizan a continuación, son representativos de la clase de fármacos quimioterapéuticos supertóxicos empleados de esta manera. Por tanto, la presente invención se refiere a una composición para su uso en el tratamiento de un tumor cerebral mediante administración sistémica según la reivindicación 1.

Los fármacos de quimioterapia cancerosa adecuados en el contexto incluyen mostazas de nitrógeno, nitrosorueas, etilenimina, alcanosulfonatos, tetrazina, compuestos de platino, análogos de pirimidina, análogos de purina, antimetabolitos, análogos de folato, antraciclinas, taxanos, alcaloides de la vinca, inhibidores de topoisomerasa, y

agentes hormonales, *entre otros*.

Los fármacos quimioterapéuticos que son ilustrativos de la subcategoría de fármacos de molécula pequeña son Actinomicina-D, Alkeran, Ara-C, Anastrozol, BiCNU, Bicalutamida, Bleomicina, Busulfano, Capecitabina, Carboplatino, Carboplatino, Carmustina, CCNU, Clorambucilo, Cisplatino, Cladribina, CPT 11, Ciclofosfamida, Citarabina, Citosina arabinósido, Citoxano, Dacarbazina, Dactinomicina, Daunorrubicina, Dexrazoxano, Docetaxel, Doxorrubicina, DTIC, Epirubicina, Etilenimina, Etopósido, Floxuridina, Fludarabina, Fluoruracilo, Flutamida, Fotemustina, Gemcitabina, Hexametilamina, Hidroxiurea, Idarrubicina, Ifosfamida,, Irinotecán, Lomustina, Mecloretamina, Melfalán, Mercaptopurina, Metotrexato, Mitomicina, Mitotano, Mitoxantrona, Oxaliplatino, Paclitaxel, Pamidronato, Pentostatina, Plicamicina, Procarbazina, Esteroides, Estreptoocina, STI-571,, Estreptoocina, Tamoxifeno, Temozolomida, Tenipósido, Tetracina, Tioguanina, Tiotepa, Tomudex, Topotecán, Treosulfano, Trimetrexato, Vinblastina, Vincristina, Vindesina, Vinorelbina, VP-16, y Xeloda.

Los maitansinoides (peso molecular: ~738 Daltons) son un grupo de derivados químicos de la maitansina, que tienen una potente citotoxicidad. Aunque se considera inseguro para el uso en pacientes humanos, debido a problemas de toxicidad, los maitansinoides son adecuados para la administración a pacientes con tumores cerebrales a través de minicélulas, de acuerdo con la presente invención.

Las duocarmicinas (peso molecular: ~588 Daltons) son una serie de productos naturales relacionados, aislados por primera vez de la bacteria *Streptomyces*. También tienen una potente citotoxicidad, pero se consideran inseguros para el uso humano. Al igual que los maitansinoides, las duocarmicinas son fármacos quimioterapéuticos adecuados para su uso en la invención.

La subcategoría de fármacos quimioterapéuticos biológicos incluye, sin limitación, Asparaginasa, AIN-457, Bapineuzumab, Belimumab, Brentuximab, Briakinumab, Canakinumab, Cetuximab, Dalotuzumab, Denosumab, Epratuzumab, Estafenatox, Farletuzumab, Figitumumab, Galiximab, Gemtuzumab, Girentuximab (WX-G250), Herceptin, Ibritumomab, Inotuzumab, Ipilimumab, Mepolizumab, Muromonab-CD3, Naptumomab, Necitumumab, Nimotuzumab, Ocrelizumab, Ofatumumab, Otelixizumab, Ozogamicina, Pagibaximab, Panitumumab, Pertuzumab, Ramucirumab, Reslizumab, Rituximab, REGN88, Solanezumab, Tanezumab, Teplizumab, Tiuxetan, Tositumomab, Trastuzumab, Tremelimumab, Vedolizumab, Zalutumumab, y Zanolimumab.

La composición puede contener como máximo aproximadamente 1 mg del fármaco quimioterapéutico. Alternativamente, la cantidad del fármaco quimioterapéutico puede ser como máximo aproximadamente 750 µg, 500 µg, 250 µg, 100 µg, 50 µg, 10 µg, 5 µg, 1 µg, 0,5 µg, o 0,1 µg. En otro aspecto, la composición contiene un fármaco quimioterapéutico que tiene una cantidad de menos de aproximadamente 1/1.000, o alternativamente menos de aproximadamente 1/2.000, 1/5.000, 1/10.000, 1/20.000, 1/50.000, 1/100.000, 1/200.000 o 1/500.000 de la cantidad eficaz terapéuticamente del fármaco cuando se emplea sin empaquetarse en minicélulas. De acuerdo con otro aspecto más de la divulgación, la composición puede contener al menos aproximadamente 1 nmol del fármaco quimioterapéutico. Por consiguiente, la divulgación también abarca realizaciones donde la cantidad del fármaco quimioterapéutico es al menos aproximadamente 2 nmol, aproximadamente 3 nmol, aproximadamente 4 nmol, aproximadamente 5 nmol, aproximadamente 10 nmol, aproximadamente 20 nmol, aproximadamente 50 nmol, aproximadamente 100 nmol, y aproximadamente 800 nmol, respectivamente.

3. Ácidos nucleicos funcionales

"Ácido nucleico funcional" se refiere a una molécula de ácido nucleico que, tras la introducción en una célula huésped, interfiere específicamente con la expresión de una proteína. Con respecto a tratar un tumor cerebral, de acuerdo con la divulgación, es preferible que se administre una carga útil de ácido nucleico funcional a las células tumorales a través de minicélulas intactas derivadas de bacterias que inhiben un gen que promueve la proliferación de células tumorales, la angiogénesis o la resistencia a la quimioterapia y/o que inhibe la apoptosis o la detención del ciclo celular (*es decir*, un "gen promotor de tumores").

Por lo general, las moléculas funcionales de ácido nucleico empleadas en esta descripción tienen la capacidad de reducir la expresión de una proteína mediante la interacción con un transcrito de una proteína. Esta categoría de carga útil de minicélulas para la divulgación incluye ARNs reguladores, como ARNs_i, ARNs_{hc}, ARN cortos (normalmente de menos de 400 bases de longitud), microARN (miARN), ribozimas y ARN señuelo, ácidos nucleicos antisentido, y LincRNA, *entre otros*. A este respecto, "ribozima" se refiere a una molécula de ARN que tiene una actividad enzimática que puede escindir repetidamente otras moléculas de ARN de una manera específica de la secuencia de bases de nucleótidos. "Oligonucleótido antisentido" indica una molécula de ácido nucleico que es complementaria a una porción de una transcripción genética particular, de modo que la molécula puede hibridar con el transcrito y bloquear su traducción. Un oligonucleótido antisentido puede comprender ARN o ADN. La categoría "LincRNA" o "ARN no codificante intergénico largo" abarca transcritos que no codifican proteínas de más de 200 nucleótidos. Los LincRNA pueden regular la transcripción, el empalme, y/o la traducción de genes, como se explica por Khalil et al., *Proc Nat'l Acad. EE.UU.* 106: 11667-72 (2009), por ejemplo.

Cada uno de los tipos de ARN regulador puede ser la fuente de la molécula de ácido nucleico funcional que inhibe un gen promotor de tumores como se describe anteriormente y, por lo tanto, es adecuado para su uso según la

presente divulgación. Por tanto, en una realización preferida de la divulgación, las minicélulas intactas portan moléculas de ARNip que median un mecanismo de interferencia de ARN silenciador de genes (ARNi) post-transcripcional, que puede servir para dirigirse a genes promotores de tumores. Por ejemplo, véase MacDiarmid *et al.*, *Nature Biotech.* 27: 645-51 (2009) (las minicélulas que presentan anticuerpos administran, con el fármaco quimioterapéutico ARNip que contrarresta el desarrollo de la resistencia al fármaco), y Oh y Park, *Advanced Drug Delivery Rev.* 61: 850-62 (2009) (administración de ARNip terapéutico para tratar el cáncer de mama, ovario, cuello uterino, hígado, pulmón y próstata, respectivamente).

Como se ha indicado, "ARNip" se refiere generalmente a moléculas de ARN bicatenario de aproximadamente 10 a aproximadamente 30 nucleótidos de longitud que se denominan por su capacidad para interferir específicamente con la expresión de proteínas. Preferiblemente, las moléculas de ARNip tienen una longitud de 12-28 nucleótidos, más preferiblemente una longitud de 15-25 nucleótidos, aún más preferiblemente una longitud de 19-23 nucleótidos y lo más preferiblemente una longitud de 21-23 nucleótidos. Por lo tanto, las moléculas de ARNip pueden tener 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 ó 29 nucleótidos de longitud.

La longitud de una hebra designa la longitud de una molécula de ARNip. Por ejemplo, un ARNip que se describe como de 21 ribonucleótidos de largo (un 21-mer) podría comprender dos hebras opuestas de ARN que se aparean para 19 pares de bases contiguas. Los dos ribonucleótidos restantes en cada hebra formarían un "saliente". Cuando un ARNip contiene dos cadenas de diferentes longitudes, la más larga de las cadenas designa la longitud del ARNip. Por ejemplo, un dsRNA (ARN bicatenario) que contiene una hebra de 21 nucleótidos de longitud y una segunda hebra de 20 nucleótidos de longitud, constituye un 21-mer

Las herramientas para ayudar al diseño de ARNip específicamente y ARN regulador generalmente están fácilmente disponibles. Por ejemplo, una herramienta de diseño de ARNip informatizada está disponible en Internet en www.dharmacon.com.

En otra realización preferida, las minicélulas intactas de la presente divulgación portan miARN, que, al igual que ARNip, son capaces de mediar un mecanismo de interferencia de ARN silenciador de genes (ARNi) post-transcripcional. También al igual que ARNip, el efecto de silenciamiento de genes mediado por miRNA se puede aprovechar para dirigirse a genes promotores de tumores. Por ejemplo, véase Kota *et al.*, *Cell* 137: 1005-17 (2009) (la administración de un miARN a través de la transfección da como resultado la inhibición de la proliferación de células cancerosas, la apoptosis específica del tumor y una protección drástica frente la progresión de la enfermedad sin toxicidad en el modelo de cáncer de hígado murino), y Takeshita *et al.*, *Molec. Ther.* 18: 181-87 (2010) (la administración de miARN sintético mediante transfección transitoria inhibe el crecimiento de células tumorales de próstata metastásica en tejidos óseos).

Aunque ambos miden la interferencia de ARN, miARN y ARNip tienen destacadas diferencias. En este sentido, "miARN" se refiere generalmente a una clase de moléculas de ARN monocatenario de 17 a 27 nucleótidos (en lugar de bicatenarias como en el caso del ARNip). Por lo tanto, las moléculas de miARN pueden tener 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 nucleótidos de longitud. Preferiblemente, las moléculas de miARN tienen una longitud de 21-25 nucleótidos.

Otra diferencia entre los miARN y los ARNip es que generalmente los primeros no complementan completamente el ARNm diana. Por otro lado, el ARNip debe ser completamente complementario al ARNm diana. En consecuencia, el ARNip generalmente da como resultado el silenciamiento de una única diana específica, mientras que el miARN es heterogéneo.

Además, aunque ambos se ensamblan en RISC (complejo de silenciamiento inducido por ARN), ARNip y miARN difieren en su procesamiento inicial respectivo antes del ensamblaje de RISC. Estas diferencias se describen en detalle en Chu *et al.*, *PLoS Biology* 4: 1122-36 (2006), y Gregory *et al.*, *Methods in Molecular Biology* 342: 33-47 (2006).

Varias bases de datos sirven como depósitos de miARN. Por ejemplo, véase miRBase (www.mirbase.org) y tarbase (<http://diana.cslab.ece.ntua.gr/DianaToolsNew/index.php?r=tarbase/index>). En el uso convencional, los miARN se nombran normalmente con el prefijo "-mir", combinado con un número secuencial. Por ejemplo, un nuevo miARN descubierto después del mir-352 de ratón se llamará mir-353 de ratón.

Una vez más, las herramientas para ayudar al diseño de ARN regulador, incluido el miARN, están fácilmente disponibles. En este sentido, una herramienta de diseño de miARN informatizada está disponible en Internet en wmd2.weigelworld.org/cgi-bin/mirnatools.pl.

Como se señaló anteriormente, un ácido nucleico funcional empleado en la divulgación puede inhibir un gen que promueve la proliferación de células tumorales, la angiogénesis o la resistencia a la quimioterapia. El gen inhibido también puede inhibir por sí mismo la apoptosis o la detención del ciclo celular. A continuación se proporcionan ejemplos de genes que se pueden dirigir mediante un ácido nucleico funcional.

Los ácidos nucleicos funcionales de la divulgación se dirigen preferiblemente al gen o transcrito de una proteína que promueve la resistencia a fármacos, inhibe la apoptosis o promueve un fenotipo neoplásico. En la técnica se ha logrado la aplicación exitosa de estrategias de ácido nucleico funcionales en estos contextos, pero sin los beneficios

de los vectores de minicélulas. Véase, *por ejemplo*, Sioud (2004), Caplen (2003), Nieth *et al.* (2003), Caplen y Mousses (2003), Duxbury *et al.* (2004), Yague *et al.* (2004), y Duan *et al.* (2004).

Las proteínas que contribuyen a la resistencia farmacológica constituyen dianas preferidas de los ácidos nucleicos funcionales. Las proteínas pueden contribuir a la resistencia farmacológica adquirida o la resistencia farmacológica intrínseca. Cuando las células enfermas, tales como las células tumorales, responden inicialmente a los fármacos, pero se vuelven refractarias en los ciclos de tratamiento posteriores, se adquiere el fenotipo resistente. Los objetivos útiles involucrados en la resistencia farmacológica adquirida incluyen transportadores de casetes de unión a ATP, tales como la glicoproteína P (P-gp, P-170, PGY1, MDR1, ABCB1, proteína asociada a MDR, proteína 1 de resistencia farmacológica múltiple), MDR-2 y MDR-3. MRP2 (proteína asociada a la resistencia farmacológica múltiple), BCR-ABL (región de rotura de conglomerados-protooncogén de Abelson), una proteína asociada a la resistencia a STI-571, proteína relacionada con la resistencia pulmonar, ciclooxigenasa-2, factor nuclear kappa, XRCC1 (grupo 1 de complementación cruzada de rayos X), ERCC1 (gen de complementación cruzada de reparación por escisión), GSTP1 (glutatión S-transferasa), β -tubulina mutante, y factores de crecimiento, tales como IL-6, son dianas adicionales involucradas en la resistencia farmacológica adquirida.

Dianas útiles de manera particular que contribuyen a la resistencia farmacológica incluyen transportadores de casete de unión a ATP, tales como glicoproteína P, MDR-2, MDR-3, BCRP, APT11a, y LRP.

Las dianas útiles también incluyen proteínas que promueven la resistencia a la apoptosis. Éstas incluyen Bcl-2 (leucemia/linfoma de células B), Bcl-X_L, A1/Bfl 1, quinasa de adhesión focal, dihidrodiol deshidrogenasa, y proteína mutante p53.

Las dianas útiles incluyen además proteínas supresoras de tumores oncogénicos y mutantes. Ejemplos de éstas son β -Catenina, PKC- α (proteína quinasa C), C-RAF, K-Ras (V12), ARN helicasa Dead box DP97, DNMT1 (ADN metiltransferasa 1), FLIP (proteína inhibidora tipo Flice), C-Sfc, 53BP1, proteína del grupo Polycomb EZH2 (potenciador de homólogo de zeste), ErbB1, HPV-16 E5 y E7 (virus del papiloma humano temprano 5 y temprano 7), Fortilin y MC11P (proteína de leucemia de células mieloides 1), DIP13 α (proteína de interacción con DDC 13a), MBD2 (dominio de unión de metil CpG), p21, KLF4 (factor 4 de tipo Kruppel), tpt/TCTP (proteína tumoral de control traduccional), SPK1 y SPK2 (esfingosina quinasa), P300, PLK1 (quinasa tipo Polo 1), Trp53, Ras, ErbB1, VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular), BAG-1 (atanogén 1 asociado a BCL2), MRP2, BCR-ABL, proteína asociada a resistencia STI-571, proteína relacionada con resistencia pulmonar, ciclooxigenasa- 2, factor nuclear kappa, XRCC1, ERCC1, GSTP1, β -tubulina mutante, y factores de crecimiento.

También son útiles como dianas los elementos reguladores globales ejemplificados por las proteínas de unión al elemento de poliadenilación citoplasmática (CEPBs). Por ejemplo, CEPB4 se sobre-expresa en glioblastoma y cáncer de páncreas, donde la proteína activa cientos de genes asociados con el crecimiento tumoral, y no se detecta en células sanas (Ortiz-Zapater *et al.*, 2011). De acuerdo con la presente descripción, por lo tanto, el tratamiento de un glioblastoma podría realizarse mediante la administración de una composición que contiene minicélulas intactas derivadas de bacterias que incluyan un agente que contrarreste la sobreexpresión de CEPB4, tal como un ARNip u otra molécula de ácido nucleico funcional que altere la expresión de CEPB4 por las células tumorales cerebrales.

(D) Tumores cerebrales

El hecho de que la pérdida de la integridad vascular, como se detalla anteriormente, sea característica de todos los tipos y etapas de tumores cerebrales significa que la metodología de acuerdo con la presente divulgación puede adaptarse para su uso para tratar cualquier tumor cerebral. En este sentido, "tumor cerebral" connota una neoplasia sólida intracraneal o en el canal espinal central.

Hay más de 120 tipos de tumores cerebrales. La mayoría de las instituciones médicas utilizan el sistema de clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para identificar los tumores cerebrales. La OMS clasifica los tumores cerebrales por origen celular y por cómo se comportan las células, desde los menos agresivos (benignos) hasta los más agresivos (malignos). A algunos tipos de tumores se les asigna un grado, que va desde el grado I (menos maligno) hasta el grado IV (el más maligno), lo que significa la tasa de crecimiento. Existen variaciones en los sistemas de clasificación, según el tipo de tumor. La clasificación y el grado de un tumor individual ayudan a predecir su comportamiento probable. Los tipos diagnosticados con mayor frecuencia incluyen neuroma acústico, astrocitoma (incluido el astrocitoma pilocítico de Grado I, astrocitoma de Grado II de grado bajo, astrocitoma anaplásico de Grado III, y glioblastoma de Grado IV (GBM)), cordoma, linfoma del SNC, craneofaringioma, otros gliomas (glioma del tronco encefálico, ependimoma, glioma mixto, glioma y subependimoma del nervio óptico), meduloblastoma, meningioma, tumores cerebrales metastásicos, oligodendroglioma, tumores pituitarios, tumor neuroectodérmico primitivo (PNET), otras afecciones relacionadas con el cerebro, y schwannoma.

Entre los niños, estos tipos de tumores cerebrales son más comunes: glioma del tronco encefálico, craneofaringioma, ependimoma, astrocitoma pilocítico juvenil (APJ), meduloblastoma, glioma del nervio óptico, tumor pineal, tumores neuroectodérmicos primitivos (PNET), y tumor rabdoide.

La presente tecnología puede aplicarse al tratamiento de cualquier tumor cerebral, que incluyen pero no se limitan a, los tipos y grados anteriormente mencionados, siempre que se haya desencadenado la angiogénesis. En la práctica, este

criterio se aplica al menos cuando un tumor es detectable por resonancia magnética, *es decir.*, cuando haya crecido a un tamaño tal que se requiera una nueva vascularización. Por tanto, la metodología descrita es adecuada para tratar un tumor cerebral primario o un tumor cerebral secundario metastásico, en cualquiera de las siguientes etapas:

5 Grado I: El tejido es benigno. Las células se parecen casi a las células cerebrales normales, y el crecimiento celular es lento.

Grado II: El tejido es maligno. Las células se parecen menos a las células normales que a las células de un tumor de grado I.

Grado III: El tejido maligno tiene células que se ven muy diferentes a las células normales. Las células anormales están creciendo activamente. Estas células de apariencia anormal se denominan anaplásicas.

10 Grado IV: El tejido maligno tiene células que parecen más anormales y tienden a crecer muy rápido.

Se sabe que diferentes tipos de tumores sobre-expresan ciertos receptores en su superficie celular. Por ejemplo, los cánceres de mama que producen metástasis en el cerebro tienden a tener una mayor proporción de células de cáncer de mama metastásicas que sobre-expresan el receptor HER2 (Palmieri *et al.*, 2007). Los mismos autores demostraron que la expresión del receptor de EGF también es mucho mayor en las metástasis cerebrales. En otro
15 ejemplo, se ha demostrado que el receptor de integrina $\alpha\beta 1$ se sobre-expresa en células de cáncer de pulmón que han producido metástasis en el cerebro (Yoshimasu *et al.*, 2004).

Así informado, un tratamiento según la presente descripción de metástasis cerebrales resultantes de un cáncer primario particular podría adaptarse en consecuencia para emplear un ligando dirigido, para las minicélulas empaquetadas con el agente, que tiene una especificidad apropiada para el cáncer primario. Por tanto, para las
20 metástasis cerebrales que resultan de un cáncer de mama primario, un tratamiento podría emplear un ligando que muestra especificidad por HER2, con el ligando unido a la minicélula. De manera similar, para tratar metástasis cerebrales causadas por cáncer pulmonar primario, el ligando sería uno que muestra especificidad por $\alpha\beta 1$, tal como un anticuerpo anti- $\alpha\beta 1$, y así sucesivamente.

De acuerdo con la tecnología convencional, se entiende que la administración sistémica de anticuerpos monoclonales como el anti-HER2, como en el producto de Roche/Genentech, trastuzumab, no trata las metástasis cerebrales resultantes del cáncer de mama primario. Esta comprensión parte del hecho de que los agentes activos de anticuerpos no atraviesan la barrera hematoencefálica con la suficiente eficacia como para alcanzar concentraciones significativas terapéuticamente en el tumor metastásico cerebral. Por ejemplo, véase Stemmler *et al.* (2007) (los niveles de trastuzumab en el líquido cefalorraquídeo aumentan sólo en condiciones de deterioro de la
30 barrera hematoencefálica, tal como carcinomatosis meníngea o radioterapia). Por lo tanto, lo más sorprendente y significativo es la eficacia de una composición como se describe aquí, para tratar cánceres cerebrales metastásicos, dirigidos por un ligando de la manera mencionada anteriormente.

(E) Minicélulas

"Minicélula" se refiere a un derivado de una célula bacteriana que carece de cromosomas ("libre de cromosomas") y es engendrado por una alteración en la coordinación, durante la fisión binaria, de la división celular con segregación del ADN. Las minicélulas son distintas de otras vesículas pequeñas, tal como las llamadas "vesículas de membrana" (~ 0,2 μm o menos de tamaño), que se generan y liberan espontáneamente en determinadas situaciones, pero que no se deben a reordenamientos genéticos específicos o a la expresión génica episomal. Del mismo modo, las minicélulas intactas son distintas de los fantasmas bacterianos, que no se generan debido a reordenamientos genéticos específicos o a la expresión génica episomal. Las minicélulas derivadas de bacterias empleadas en esta descripción están completamente intactas y, por tanto, se distinguen de otras formas libres de cromosomas de derivados celulares bacterianos caracterizadas por una membrana externa o definitoria que se rompe o degrada, incluso se elimina. Véase la patente U.S. Nº 7.183.105 en la columna 111, líneas 54 y siguientes. La membrana intacta que caracteriza las minicélulas de la presente divulgación permite la retención de la carga útil terapéutica
45 dentro de la minicélula hasta que la carga útil se libere, después de la absorción, dentro de una célula tumoral.

La minicélula empleada en esta descripción se puede preparar a partir de células bacterianas, tales como *E. coli* y *S. typhimurium*. La replicación cromosómica procariota está relacionada con la fisión binaria normal, que implica la formación del tabique de la célula media. En *E. coli*, por ejemplo, la mutación de genes *min*, tales como *minCD*, puede eliminar la inhibición de la formación de tabiques en los polos celulares durante la división celular, lo que da como resultado la producción de una célula hija normal y una minicélula sin cromosomas. Véase de Boer *et al.*, 1992; Raskin y de Boer, 1999; Hu y Lutkenhaus, 1999; Harry, 2001.

Además de mediante mutaciones del operón *min*, las minicélulas sin cromosomas también se generan después de una variedad de otros reordenamientos genéticos o mutaciones que afectan la formación del tabique, por ejemplo, en el *divVB1* en *B. subtilis*. Véase Reeve y Cornett (1975). Las minicélulas también pueden formarse tras una perturbación en los niveles de expresión génica de proteínas implicadas en la división celular/segregación cromosómica. Por ejemplo, la sobre-expresión de *minE* conduce a la división polar y a la producción de minicélulas. De manera similar, las minicélulas sin cromosomas pueden resultar de defectos en la segregación cromosómica, *por*
55

ejemplo., la mutación *smc* en *Bacillus subtilis* (Britton *et al.*, 1998), la supresión *spoOJ* en *B. subtilis* (Ireton *et al.*, 1994), la mutación *mukB* en *E. coli* (Hiraga *et al.*, 1989) y la mutación *parC* en *E. coli* (Stewart y D'Ari, 1992). Además, CafA puede mejorar la tasa de división celular y/o inhibir la partición cromosómica después de la replicación (Okada *et al.*, 1994), lo que da como resultado la formación de células encadenadas y minicélulas sin cromosomas.

Por consiguiente, se pueden preparar minicélulas para la presente divulgación a partir de cualquier célula bacteriana, ya sea de origen Gram-positivo o Gram-negativo. Además, las minicélulas empleadas en la divulgación deben poseer paredes celulares intactas (*es decir*, son "minicélulas intactas"), como se indicó anteriormente, y deben distinguirse y separarse de otras vesículas pequeñas, tales como vesículas de membrana, que no son atribuibles a reordenamientos genéticos específicos o a expresión génica episomal.

En una realización dada, las bacterias parentales (fuente) de las minicélulas pueden ser Gram positivas, o pueden ser o Gram negativas, como se mencionó. En un aspecto, por lo tanto, las bacterias parentales son una o más seleccionadas de Terra-/Glidobacteria (BV1), Proteobacteria (BV2), BV4 incluyendo espiroquetas, Sphingobacteria, y Planctobacteria. Según otro aspecto, las bacterias son una o más seleccionadas de Firmicutes (BV3), tales como Bacilli, Clostridia o Tenericutes/Mollicutes, o Actinobacteria (BV5), tales como Actinomycetales o Bifidobacteriales.

En otro aspecto más, las bacterias son una o más seleccionadas de Eobacteria (Chloroflexi, Deinococcus-Thermus), Cyanobacteria, Thermodesulfobacteria, termófilos (Aquificae, Thermotogae), Alpha, Beta, Gamma (Enterobacteriaceae), Delta o Epsilon Proteobacteria, Spirochaetes Fibrobacteres, Chlorobi/Bacteroidetes, Chlamydiae/Verrucomicrobia, Planctomycetes, Acidobacteria, Chrysiogenetes, Deferribacteres, Fusobacteria, Gemmatimonadetes, Nitrospirae, Synergistetes, Dictyoglomi, Lentisphaerae Bacillales, Bacillaceae, Listeriaceae, Staphylococcaceae, Lactobacillales, Enterococcaceae, Lactobacillaceae, Leuconostocaceae, Streptococcaceae, Clostridiales, Halanaerobiales, Thermoanaerobacterales, Mycoplasmatales, Entomoplasmatales, Anaeroplasmatales, Acholeplasmatales, Haloplasmatales, Actinomycineae, Actinomycetaceae, Corynebacterineae, Mycobacteriaceae, Nocardiaceae, Corynebacteriaceae, Frankineae, Frankiaceae, Micrococcineae, Brevibacteriaceae, y Bifidobacteriaceae.

Para uso farmacéutico, una composición de la divulgación debe comprender minicélulas que se aislen lo más minuciosamente posible de componentes inmunogénicos y otros contaminantes tóxicos. La metodología para purificar minicélulas derivadas de bacterias para eliminar la endotoxina libre y las células bacterianas parentales se describe en la Patente WO 2004/113507. En resumen, el proceso de purificación logra la eliminación de (a) vesículas más pequeñas, tal como vesículas de membrana, que generalmente tienen un tamaño inferior a 0,2 μm , (b) endotoxinas libres liberadas de las membranas celulares, y (c) bacterias parentales, vivas o muertas, y sus desechos, que también son fuentes de endotoxinas libres. Dicha eliminación se puede realizar con, *entre otros*, un filtro de 0,2 μm para eliminar vesículas más pequeñas y restos celulares, un filtro de 0,45 μm para eliminar las células parentales tras la inducción de las células parentales para formar filamentos, antibióticos para matar células bacterianas vivas, y anticuerpos contra endotoxinas libres.

Detrás del procedimiento de purificación hay un descubrimiento de los presentes inventores de que, a pesar de la diferencia de sus fuentes bacterianas, todas las minicélulas intactas tienen un tamaño de aproximadamente 400 nm, *es decir*, son más grandes que las vesículas de membrana y otras vesículas más pequeñas y, sin embargo, más pequeñas que las bacterias parentales. La determinación del tamaño de las minicélulas se puede realizar mediante el empleo del estado sólido, tal como microscopía electrónica, o mediante técnicas basadas en líquidos, *por ejemplo*, dispersión dinámica de la luz. El valor de tamaño obtenido por cada una de estas técnicas puede tener un intervalo de error, y los valores pueden diferir algo entre técnicas. Por tanto, el tamaño de las minicélulas en estado seco se puede medir mediante microscopía electrónica, tal como aproximadamente 400 nm \pm 50 nm. Por otro lado, la dispersión dinámica de la luz puede medir las mismas minicélulas para que tengan un tamaño de aproximadamente 500 nm \pm 50 nm. Además, las minicélulas dirigidas a ligando, y empaquetadas con el fármaco, pueden medirse de nuevo empleando la dispersión de luz dinámica, para que sean de aproximadamente 600 nm \pm 50 nm.

Esta dispersión de valores de tamaño se acomoda fácilmente en la práctica, *por ejemplo*, con el propósito de aislar las minicélulas de los componentes inmunogénicos y de otros contaminantes tóxicos, como se describió anteriormente. Es decir, una minicélula intacta derivada de bacterias se caracteriza por un citoplasma rodeado por una membrana rígida, que le da a la minicélula una estructura rígida, y esférica. Esta estructura es evidente en las micrografías de transmisión electrónica, en las que se mide el diámetro de la minicélula, a través de la minicélula, entre los límites exteriores de la membrana rígida. Esta medición proporciona el valor de tamaño mencionado anteriormente de 400 nm \pm 50 nm.

Otro elemento estructural de una minicélula derivada de bacterias Gram-negativas es el componente O-polisacárido del lipopolisacárido (LPS), que está embebido en la membrana externa a través del anclaje del lípido A. El componente es una cadena de unidades repetidas de restos de carbohidratos con hasta 70 a 100 unidades repetidas de cuatro a cinco azúcares por cadena. Debido a que estas cadenas no son rígidas, en un ambiente líquido, tal como el *in vivo*, pueden adoptar una estructura ondulada y flexible que les da la apariencia general de algas en un ambiente de mar de coral; *es decir*, las cadenas se mueven con el líquido mientras permanecen ancladas a la membrana de la minicélula.

Influenciada por el componente O-polisacárido, la dispersión dinámica de la luz puede proporcionar un valor para el tamaño de la minicélula de aproximadamente 500 nm a aproximadamente 600 nm, como se indicó anteriormente. Sin embargo, las minicélulas de bacterias Gram negativas y Gram positivas pasan fácilmente a través de un filtro de 0,45 μm , lo que confirma un tamaño de minicélula eficaz de $400 \text{ nm} \pm 50 \text{ nm}$. La dispersión de tamaños mencionada anteriormente está incluida en la presente invención y, en particular, se indica con el calificativo "aproximadamente" en la frase "aproximadamente 400 nm de tamaño" y similares.

En relación con los contaminantes tóxicos, una composición de la divulgación puede contener menos de aproximadamente 350 EU de endotoxina libre. Son ilustrativos a este respecto los niveles de endotoxina libre de aproximadamente 250 UE, aproximadamente 200 UE, aproximadamente 150 UE, aproximadamente 100 UE, aproximadamente 90 UE, aproximadamente 80 UE, aproximadamente 70 UE, aproximadamente 60 UE, aproximadamente 50 UE, aproximadamente 40 UE, aproximadamente 30 UE, aproximadamente 20 UE, aproximadamente 15 UE, aproximadamente 10 UE, aproximadamente 9 UE, aproximadamente 8 UE, aproximadamente 7 UE, aproximadamente 6 UE, aproximadamente 5 UE, aproximadamente 4 UE, aproximadamente 3 UE, aproximadamente 2 UE, aproximadamente 1 UE, aproximadamente 0,9 UE, aproximadamente 0,8 UE, aproximadamente 0,7 UE, aproximadamente 0,6 UE, aproximadamente 0,5 UE, aproximadamente 0,4 UE, aproximadamente 0,3 UE, aproximadamente 0,2 UE, aproximadamente 0,1 UE, aproximadamente 0,05 UE, y aproximadamente 0,01 UE, respectivamente.

Una composición de la divulgación también puede contener al menos aproximadamente 108 minicélulas, *por ejemplo*, al menos aproximadamente 5×10^8 . Alternativamente, la composición puede contener del orden de 10^9 o 10^{10} minicélulas, *por ejemplo*, 5×10^9 , 1×10^{10} ó 5×10^{10} minicélulas. Por otra parte, entre cualquier número de minicélulas, una composición de la divulgación puede contener menos de aproximadamente 10 células bacterianas parentales contaminantes, *por ejemplo*, menos de aproximadamente 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, ó 1 células bacterianas parentales.

(F) Empaquetamiento de un agente anti-neoplásico en minicélulas

Los agentes anti-neoplásicos, tales como las proteínas y los ácidos nucleicos funcionales, que se pueden codificar por un ácido nucleico, se pueden introducir en minicélulas mediante transformación de la célula bacteriana parental en un vector, tal como un plásmido, que codifica el agente anti-neoplásico. Cuando se forma una minicélula a partir de la célula bacteriana parental, la minicélula retiene determinadas copias del plásmido y/o del producto de expresión, el agente anti-neoplásico. Se proporcionan más detalles sobre cómo empaquetar un producto de expresión en una minicélula en la Patente WO 03/033519.

Los datos presentados en la Patente WO 03/033519 demostraron, por ejemplo, que las minicélulas recombinantes que llevan plásmidos de expresión génica de mamíferos pueden administrarse a células fagocíticas y no fagocíticas. La solicitud también describe la transformación genética de cepas bacterianas parentales productoras de minicélulas con ácidos nucleicos heterólogos transportados en ADN plasmídicos de replicación episómica. Tras la separación de las bacterias parentales y las minicélulas, parte del ADN episomal se segrega en las minicélulas. Las minicélulas recombinantes resultantes se engulleron fácilmente por las células fagocíticas de mamíferos y se degradaron dentro de los fagolisosomas intracelulares. Por otra parte, parte del ADN recombinante escapó de la membrana fagolisosómica y se transportó al núcleo de la célula de mamífero, donde se expresaron los genes recombinantes.

Los ácidos nucleicos también se pueden empaquetar directamente en minicélulas. Por tanto, un ácido nucleico puede empaquetarse directamente en minicélulas intactas mediante la incubación conjunta de una pluralidad de minicélulas intactas con el ácido nucleico en un tampón. La composición del tampón puede variar, en función de las condiciones bien conocidas en este campo, con el fin de optimizar la carga del ácido nucleico en las minicélulas intactas. El tampón también se puede variar dependiendo de la secuencia de nucleótidos y de la longitud del ácido nucleico que se va a cargar en las minicélulas. Una vez empaquetado, el ácido nucleico permanece dentro de la minicélula y está protegido de la degradación. Los estudios de incubación prolongada con minicélulas empaquetadas en ARNip incubadas en disolución salina estéril no mostraron, por ejemplo, fugas de ARNip.

En otras realizaciones, se pueden empaquetar en la misma minicélula múltiples ácidos nucleicos dirigidos a diferentes dianas de ARNm. Este enfoque puede emplearse para combatir la resistencia farmacológica y la resistencia a la apoptosis. Por ejemplo, los pacientes con cáncer muestran habitualmente resistencia farmacológica a quimioterapéuticos. Dicha resistencia puede estar mediada por la sobre-expresión de genes, tal como bombas de resistencia a múltiples fármacos (MDR, de sus siglas en inglés) y genes anti-apoptóticos, entre otros. Para combatir esta resistencia, las minicélulas pueden empaquetarse con concentraciones de ácido nucleico funcional significativas terapéuticamente para genes asociados a MDR, y administrarse a un paciente antes de la quimioterapia. Además, el empaquetamiento en la misma minicélula de múltiples ácidos nucleicos funcionales dirigidos a diferentes dianas de ARNm puede mejorar el éxito terapéutico ya que la mayoría de las dianas moleculares están sujetas a mutaciones y tienen múltiples alelos. Se proporcionan más detalles sobre el empaquetamiento directo de un ácido nucleico en una minicélula en la Patente WO 2009/027830.

Los fármacos de molécula pequeña, ya sean hidrófilos o hidrófobos, pueden empaquetarse en minicélulas creando un gradiente de concentración del fármaco entre un medio extracelular que contiene minicélulas y el citoplasma de

éstas. Cuando el medio extracelular contiene una mayor concentración de fármaco que el citoplasma de la minicélula, el fármaco desciende de forma natural en sentido descendente por este gradiente de concentración, hacia el citoplasma de la minicélula. Sin embargo, cuando se invierte el gradiente de concentración, el fármaco no se desplaza fuera de las minicélulas.

Para cargar minicélulas con fármacos que normalmente no son solubles en agua, los fármacos se pueden disolver inicialmente en un disolvente apropiado. Por ejemplo, el Paclitaxel se puede disolver en una mezcla 1:1 de etanol y cremophore EL (aceite de ricino polietoxilado), seguido de una dilución en PBS para lograr una disolución de Paclitaxel que se diluye parcialmente en medio acuoso y contiene cantidades mínimas del disolvente orgánico para asegurar que el fármaco permanece en disolución. Las minicélulas se pueden incubar en este medio final para la carga del fármaco. Por tanto, los inventores descubrieron que incluso los fármacos hidrófobos pueden difundir en el citoplasma o la membrana de las minicélulas para conseguir una carga de fármaco citoplásmica alta y significativa terapéuticamente. Esto es inesperado porque la membrana de la minicélula está compuesta por una bicapa fosfolípida hidrófoba, que se esperaría que impidiera la difusión de moléculas hidrófobas al citoplasma.

El ejemplo 10 a continuación demuestra la carga en minicélulas de una diversidad de fármacos de molécula pequeña representativos, que ilustra diferentes tamaños y propiedades químicas: Doxorrubicina, Paclitaxel, Fluoropaclitaxel, Cisplatino, Vinblastina, Monsatrol, inhibidor de timidilato sintasa (TS) OSI-7904, Irinotecán, 5-Fluorouracilo, Gemcitabina, y Carboplatino. En general, por otra parte, las minicélulas empaquetadas con fármacos de molécula pequeña resultantes muestran una eficacia antitumoral significativa, *in vitro* e *in vivo*. Estos datos presentados en la presente memoria, por lo tanto, muestran claramente la eficacia y versatilidad de los métodos de carga de minicélulas.

(G) Administración de minicélulas a células de mamífero específicas

De acuerdo con otro aspecto de esta divulgación, las minicélulas de una composición, como se describe anteriormente, se dirigen a una célula tumoral de mamífero diana mediante un ligando. En algunas realizaciones el ligando es "biespecífico". Es decir, el ligando muestra especificidad por ambos componentes, la minicélula y la célula de mamífero (tumor), de manera que causa que una minicélula determinada se una a la célula diana, de modo que la minicélula es engullida por la célula de mamífero. El empleo de ligandos biespecíficos para dirigir una minicélula a una célula tumoral se describe además en las Patentes WO 05/056749 y WO 05/079854. Una vez que dicho ligando se une a una minicélula, la especificidad no ocupada ("monoespecificidad") se refiere al ligando hasta que interacciona con la célula de mamífero diana (tumor).

El ligando se puede expresar desde el interior de las minicélulas o a partir de sus padres y luego se muestra en la superficie de las minicélulas. Alternativamente, el ligando se puede unir ("recubrir") a la membrana celular de las minicélulas, *por ejemplo*., en virtud de la interacción ligando-receptor. En cualquier caso, el ligando no requiere una especificidad para la minicélula y sólo muestra una especificidad para un componente que es característico de las células de mamífero. Es decir, dicho componente no tiene por qué ser exclusivo de las células tumorales, *per se*, o incluso al tipo particular de células tumorales bajo tratamiento, siempre que las células tumorales presenten el componente en su superficie celular. Tras la administración intravenosa, las minicélulas se acumulan rápidamente en el microambiente del tumor, como descubrieron los presentes inventores (véanse también los ejemplos de a continuación). Esta acumulación, que se produce en función de la vasculatura tumoral con fugas descrita anteriormente, efectúa la administración dirigida de la carga útil terapéutica empaquetada en minicélulas a las células del tumor. Aun así, puede ser útil y en ocasiones se prefiere, de acuerdo con la divulgación, que el ligando se dirija a un componente de un tumor a tratar.

En cualquier caso, las minicélulas contenidas en una composición administrada de la divulgación, tras la acumulación en el microambiente del tumor cerebral como se describe anteriormente, entran en contacto y se unen a las células tumorales diana, provocando su absorción en las células, que luego se ven afectadas por la carga útil terapéutica. Esa carga útil puede ser un fármaco citotóxico, *por ejemplo*., doxorrubicina o cualquier otro fármaco anti-neoplásico, como se describe anteriormente. La carga útil también puede ser siRNA o miRNA, *por ejemplo*., una secuencia de ARNi anti-apoptosis, tal como anti-Bcl2.

Los inventores encontraron que esta estrategia de administración dirigida es ampliamente aplicable a una variedad de células tumorales de mamíferos, incluidas las células que normalmente son refractarias a la adhesión y endocitosis específicas de minicélulas. Por ejemplo, los ligandos que comprenden un anticuerpo dirigido a un receptor anti-HER2 o anti-receptor EGF unen eficazmente las minicélulas a los receptores respectivos en una variedad de células diana no fagocíticas. Estas células incluyen células cancerosas de pulmón, ovario, cerebro, mama, próstata y piel.

La unión así lograda precede a la endocitosis rápida de las minicélulas por cada tipo de células no fagocíticas. Más generalmente, una célula diana adecuada para la presente divulgación se caracteriza por la expresión de un receptor de la superficie celular que, tras unirse a un ligando, facilita la endocitosis. Las células huésped normalmente son resistentes a la adhesión. Por lo tanto, cuando se adhiere a un ligando, la célula huésped activa su mecanismo de endocitosis para eliminar el ligando.

El término "endocitosis" abarca (1) fagocitosis y (2) pinocitosis, en sí misma una categoría que incluye (2a) macropinocitosis, que no requiere unión al receptor, así como (2b) endocitosis mediada por clatrina, (2c) endocitosis mediada por caveolina y (2d) endocitosis independiente de clatrina/caveolina, todas las cuales tienden a acceder a la ruta del endosoma/lisosoma. Los presentes inventores descubrieron que la interacción entre el ligando en una minicélula y un receptor de superficie celular de mamífero, activa una ruta de endocitosis particular, que implica endocitosis mediada por receptor (rME) en el compartimento endosómico /lisosómico. En virtud de dicha ruta de endocitosis, los presentes inventores descubrieron además que las minicélulas eran capaces de liberar su carga útil en el citoplasma de la célula de mamífero diana. En el caso de que la carga útil sea un ácido nucleico codificante, el ácido nucleico no sólo no se degrada completamente en el compartimento lisosómico/endosómico, sino que también se expresa en la célula de mamífero diana.

Los ligandos útiles en la técnica de administración dirigida descrita anteriormente, de acuerdo con esta descripción, incluyen cualquier agente que se una a un componente de superficie en una célula diana y a un componente superficial en una minicélula. Preferiblemente, el componente superficial de una célula diana es un receptor. Los ligandos pueden comprender un componente polipéptido y/o carbohidrato. Los anticuerpos son ligandos preferidos.

Por ejemplo, un anticuerpo que tiene especificidad por un componente superficial, tal como un antígeno tumoral, en las células de tumor cerebral de mamífero diana se puede emplear eficazmente para dirigir las minicélulas a las células diana en el tumor cerebral que se va a tratar. Ejemplos de receptores de superficie celular incluyen el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), el receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR), el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR) y el receptor del factor de crecimiento similar a la insulina (IGFR), todos altamente expresados en una variedad de tumores sólidos, incluidos los tumores cerebrales y el receptor de folato que se expresa en exceso en algunos adenomas hipofisarios. El ligando biespecífico también puede dirigirse a receptores mutantes o variantes, *por ejemplo*, el receptor IL-13Rα2 que se expresa en el 50% al 80% de los GBM humanos (Debinski et al., 2000; Jarboe et al., 2007; Okada et al., 2008; Wykosky et al., 2008) pero difiere de su IL4R/IL13R equivalente fisiológico que se expresa en tejidos normales (Hershey 2003). IL13Rα2 está prácticamente ausente en las células cerebrales normales (Debinski y Gibo 2000). Además, los tumores que producen metástasis en el cerebro pueden sobreexpresar ciertos receptores y estos receptores también pueden ser dianas adecuadas. Por ejemplo, un estudio muestra (Da Silva et al., 2010) que las metástasis cerebrales del cáncer de mama expresan todos los miembros de la familia HER de receptores de tirosina quinasa. HER2 se amplificó y se sobreexpresó en el 20% de las metástasis cerebrales, EGFR se sobreexpresó en el 21% de las metástasis cerebrales, HER3 se sobreexpresó en el 60% de las metástasis cerebrales, y HER4 se sobreexpresó en el 22% de las metástasis cerebrales. Curiosamente, la expresión de HER3 aumentó en las células de cáncer de mama que residen en el cerebro.

Los ligandos preferidos comprenden anticuerpos y/o derivados de anticuerpos. En su uso actual, el término "anticuerpo" abarca una molécula de inmunoglobulina obtenida por generación *in vitro* o *in vivo* de una respuesta inmunogénica. Por consiguiente, la categoría "anticuerpo" incluye anticuerpos monoclonales y anticuerpos humanizados, así como derivados de anticuerpos, tales como fragmentos de anticuerpos de cadena simple (scFv), anticuerpos biespecíficos, etc. Se conocen un gran número de ligandos basados en anticuerpos y proteínas biespecíficas diferentes, como lo demuestra el artículo de revisión de Caravella y Lugovskoy (2010). Los anticuerpos y derivados de anticuerpos útiles en la presente divulgación también pueden obtenerse mediante técnicas de ADN recombinante.

(H) Formulaciones y vías y programas de administración

Las formulaciones de una composición de la divulgación se pueden presentar en forma de dosis única, *por ejemplo*, en ampollas o viales, o en envases multidosis, con o sin conservante añadido. La formulación puede ser una disolución, 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 disolución adecuada es isotónica con la sangre del receptor y se ejemplifican con disolución salina, disolución de Ringer, y disolución de dextrosa. Alternativamente, las formulaciones pueden estar en forma de polvo liofilizado, para reconstituir con un vehículo adecuado, *por ejemplo*, agua estéril, apirógena o disolución salina fisiológica. Las formulaciones también pueden estar en forma de preparación depot. Tales formulaciones de acción prolongada se pueden administrar mediante implantación (por ejemplo, por vía subcutánea o intramuscular) o por inyección intramuscular.

En algún aspecto, se proporciona una composición que contiene minicélulas que incluye una cantidad eficaz terapéuticamente de un agente anti-neoplásico. Una cantidad "eficaz terapéuticamente" de un agente anti-neoplásico es una dosis del agente en cuestión, *por ejemplo*, un ARNip o un fármaco quimioterapéutico que produce una respuesta farmacológica cuando se administra a un sujeto, de acuerdo con la presente divulgación.

En el contexto de la presente divulgación, por lo tanto, se puede medir una cantidad eficaz terapéuticamente en referencia a la prevención o mejora del tumor cerebral o un síntoma de tumor cerebral, ya sea en un modelo animal o en un sujeto humano, cuando se administran las minicélulas que llevan una carga útil terapéutica, como se describe más adelante. Una cantidad que resulte ser una "cantidad eficaz terapéuticamente" en un caso dado, para un sujeto en particular, puede no ser eficaz para el 100% de los sujetos tratados de forma similar para el tumor cerebral, incluso aunque los médicos expertos consideren dicha dosis como una "cantidad eficaz terapéuticamente". La dosis apropiada a este respecto también variará en función, por ejemplo, del tipo, etapa, y gravedad del tumor

cerebral. En cualquier caso, las presentes ilustraciones de ensayos *in vitro* (Ejemplos 3 y 4) y ensayos *in vivo* (Ejemplos 5, 7 y 8) según la presente divulgación, así como de la metodología para cuantificar la distribución del fármaco *in vivo* (Ejemplo 9), cuando se considera a la luz de la descripción completa, faculta a una persona con conocimientos en ensayos preclínicos y clínicos de candidatos a fármacos para determinar, mediante experimentación rutinaria, la cantidad de agente activo eficaz terapéuticamente para una indicación particular. Asimismo, cuando "eficaz terapéuticamente" se emplea para referirse al número de minicélulas en una composición farmacéutica, el número se puede determinar basándose en qué agente anti-neoplásico se empaqueta en las minicélulas y en la eficacia de ese agente para tratar un tumor cerebral. El efecto terapéutico, en este sentido, se puede medir con un parámetro clínico o patológico, tal como la masa tumoral. Por consiguiente, se puede usar una reducción o un aumento reducido de la masa tumoral para medir los efectos terapéuticos.

Las formulaciones incluidas en la divulgación se pueden administrar a través de varias vías y en varios sitios en el cuerpo de un mamífero, para lograr el efecto o efectos terapéuticos deseados, ya sea local o sistémicamente. En un aspecto particular, la vía de administración es la inyección intravenosa.

En general, las formulaciones de la divulgación se pueden emplear en dosis apropiadas definidas mediante ensayos rutinarios, para obtener un efecto fisiológico óptimo, mientras se minimiza cualquier toxicidad potencial. El régimen de dosificación se puede seleccionar de acuerdo con una variedad de factores que incluyen edad, peso, sexo, estado médico del paciente; la gravedad o la etapa del tumor cerebral, la vía de administración, y la función renal y hepática del paciente.

La precisión óptima para lograr concentraciones de la minicélula y del agente terapéutico dentro del intervalo que produce la máxima eficacia con mínimos efectos secundarios puede requerir, y normalmente requiere, de un régimen basado en la cinética de la disponibilidad del agente por los sitios diana y por las células diana. La distribución, el equilibrio y la eliminación de las minicélulas o del agente se pueden considerar al determinar la concentración óptima para un régimen de tratamiento. La dosis de las minicélulas y del agente terapéutico, respectivamente, se puede ajustar para lograr los efectos deseados.

Por otra parte, la administración de dosis de las formulaciones se puede optimizar empleando un sistema de modelado farmacocinético/farmacodinámico. Por tanto, se pueden elegir uno o más regímenes de dosificación y se puede utilizar un modelo farmacocinético/farmacodinámico para determinar el perfil farmacocinético/farmacodinámico de uno o más regímenes de dosificación. En base a dicho perfil particular, se puede seleccionar uno de los regímenes de dosificación para la administración que logre la respuesta farmacocinética/farmacodinámica deseada. Por ejemplo, véase la Patente WO 00/67776.

Se puede administrar una formulación de la divulgación al menos una vez a la semana a un paciente con tumor cerebral, durante el transcurso de varias semanas. Por tanto, la formulación se puede administrar al menos una vez a la semana, durante un período de varias semanas a varios meses.

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

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

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

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

Los siguientes ejemplos son sólo ilustrativos, en lugar de limitativos, y proporcionan una comprensión más completa de la divulgación.

Ejemplo 1. Preparación de minicélulas caninas dirigidas a EGFR empaquetadas con doxorrubicina

Las minicélulas se derivaron de un mutante por delección cromosómica de *minCDE* de *Salmonella enterica* serotipo typhimurium, *S. typhimurium*, purificado, empaquetado con doxorrubicina (dox) y dirigido a través de la unión de un anticuerpo monoclonal biespecífico (MAb) que comprende O-polisacárido de superficie anti-minicélula y especificidades EGFR anti-canino, (designado, ^{EGFR}minicélulas_{DOX}), como lo describió anteriormente MacDiarmid *et al.* (2007).

Las ^{EGFR}minicélulas_{DOX} se caracterizaron inicialmente por su idoneidad para administración i.v. en siete perros con cáncer cerebral en etapa tardía (perros designados como BCD-1 a BCD-7). Dos perros adicionales, BCD-8 y BCD-9,

se presentaron en el Centro Especialista en Veterinaria pero no entraron en el estudio debido a la etapa muy tardía de sus tumores cerebrales y fueron sacrificados. Las muestras de biopsia cerebral proporcionaron las respectivas células tumorales cerebrales para estudios *in vitro*.

Ejemplo 2. *Caracterización del anticuerpo monoclonal EGFR anti-humano para la unión a células de tumores cerebrales caninos*

La regulación al alza y la sobreexpresión de EGFR es bien conocida en ~60% de los casos de GBM tanto en seres humanos (Smith *et al.*, 2001) como en perros (Higgins *et al.*, 2010). Dada la indisponibilidad de un MAb EGFR canino específico, el MAb EGFR anti-humano disponible comercialmente se ensayó en líneas celulares de tumores cerebrales caninos y humanos para determinar la reactividad cruzada del MAb con EGFR en células tumorales cerebrales caninas.

Cuando fue posible, se obtuvieron muestras de biopsia de tumores cerebrales de los perros del estudio de caso. Las muestras de tejido de BCD-1, -8 y -9 se trataron durante 10 min con 1 mg/ml de colagenasa en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) que contiene suero bovino fetal (FCS) al 10% y Penstrep. El tejido no digerido se eliminó mediante filtración a través de una doble capa de gasa estéril. La digestión de colagenasa se detuvo diluyendo las células con 5 ml de medio y centrifugando a 1.200g durante 5 minutos. Las células se lavaron con 5 ml adicionales de medio seguido de centrifugación repetida y resuspensión. A continuación, las células se sembraron en matraces de cultivo de tejidos.

La línea celular GBM de perro, J3T (Rainov *et al.*, 2000), se obtuvo del Dr. Michael Berens del Translation Genomics Research Institute (Phoenix, AZ, EE.UU.). Todos los cultivos de células de tumores cerebrales caninos se mantuvieron en DMEM enriquecido con FCS al 10% (vol/vol), penicilina 100 U/ml, estreptomycin 100 U/ml, 1-glutamina 2 mM, y aminoácidos no esenciales 2 mM.

La línea celular epitelial de astrocitoma de GBM humano (U87-MG) se obtuvo de la colección americana de cultivos tipo (ATCC) y se cultivó en medio OPTI-MEM (Invitrogen, EE.UU.) con suero bovino fetal (FBS) al 5%.

Las células se recogieron separándolas del matraz con EDTA/PBS 2 mM y se dividieron en 1×10^6 células/tubo. Las células se lavaron dos veces en disolución de bloqueo (PBS con 2% de BSA y azida de sodio al 0,1%), y se incubaron en disolución de bloqueo durante 10 minutos en hielo, seguido de incubación con 1 µg/µl de anticuerpo monoclonal EGFR anti-humano (IgG2a; Calbiochem) durante 45 minutos en hielo. Después de dos lavados con disolución de bloqueo, las células se incubaron con IgG de cabra anti-ratón conjugada con R-ficoeritrina (Molecular Probes/Invitrogen) durante 45 minutos en hielo y con agitación suave. Después de dos lavados en disolución de bloqueo, las células se resuspendieron en PBS y se emplearon para análisis de citometría de flujo. Como controles, se usó PBS en lugar del anticuerpo primario para determinar la autofluorescencia.

Las suspensiones de células teñidas se midieron con el citómetro de flujo FC 500 empleando el programa informático CXP Cytometer (Beckman Coulter). El número de receptores de EGF se determinó mediante citometría de flujo analítica en comparación con patrones de micropelotas de R-ficoeritrina fluorescentes (perlas Quantum R-PE MESF; Bang Laboratories Inc, Fishers, IN, EE.UU.). La curva de calibración se generó trazando el número dado de moléculas de R-ficoeritrina equivalentes por perla frente al logaritmo de su intensidad de fluorescencia media. La intensidad de la fluorescencia celular se extrapoló a una curva de calibración de fluorescencia estándar. Los valores de fluorescencia media se convirtieron en el número de anticuerpos unidos por célula después de restarlos del control negativo.

Los resultados mostraron (Fig. 1) que el MAb se une fuertemente a EGFR en células de cáncer cerebral tanto caninas (J3T, BCD-1, -8 y -9) como humanas (U87-MG).

Los estudios de cuantificación de receptores mediante análisis FACS muestran (Fig. 1) la concentración de EGFR por célula (en orden decreciente) para las células BCD-1, U87-MG, BCD-9, BCD-8 y J3T que fue 2.866.854, 1.465.755, 930.440, 774.352 y 287.622 respectivamente. Esto sugiere que cada uno de los tipos de células sobreexpresa EGFR.

Por lo tanto, se confirmó la reactividad cruzada de unión del MAb EGFR anti-humano al EGFR canino después del ensayo *in vitro* de unión a células cancerosas de cerebro canino y humano.

Por lo tanto, para lograr el direccionamiento activo de las células tumorales cerebrales, se seleccionó MAb EGFR anti-humano para recubrir las minicélulas empaquetadas con Dox.

Ejemplo 3. *Determinación de la sensibilidad de las células cancerosas de cerebro canino al fármaco quimioterapéutico doxorubicina*

Antes de usar minicélulas dirigidas a EGFR empaquetadas con dox para tratar a los perros con cánceres cerebrales en etapa tardía, era importante determinar si las células del tumor cerebral canino eran sensibles o resistentes al fármaco quimioterapéutico doxorubicina.

Se sembraron células de tumores cerebrales caninos BCD-1, -8, -9 y J3T y la línea celular de tumores cerebrales humanos U87-MG en placas de 96 pocillos a 5×10^3 células por pocillo. Las células se incubaron durante la noche a 37°C, 5% CO₂.

5 Se añadió doxorubicina a las células en 100 µl de medio relevante que contiene suero a concentraciones que varían de 1,7 nM a 8.600 nM y se incubó durante 72 horas.

10 Para medir el efecto citotóxico de la Doxorubicina se realizó un ensayo de proliferación de células MTS. A cada pocillo se añadieron 20 µl de disolución de MTS (reactivo CellTite 96® Aqueous One MTS - Promega) y se incubó en la oscuridad durante 30 minutos. La absorbancia se leyó a una longitud de onda de 490 nm. Los datos se analizaron en Prism GraphPad (La Jolla, CA, EE.UU.) empleando regresión no lineal y un ajuste de curva de 4 parámetros.

El ensayo de proliferación celular muestra que todas las líneas celulares anteriores eran igual de sensibles a doxorubicina (Fig. 2).

Ejemplo 4. Eficacia de unión de ^{EGFR}minicélulas_{Dox} a las células del tumor cerebral canino

15 Las células tumorales caninas y humanas se transfectaron durante 2 horas con minicélulas dirigidas específicamente y no específicamente, ^{EGFR}minicélulas_{Dox} y gp120^{minicélulas}_{Dox} respectivamente, y después del lavado de las minicélulas no adherentes, las células se trataron con MAb IgG2a anti-ratón marcado con tinte fluorescente Alexa-Fluor 488 (AF-488). El MAb gp120 está dirigido a la glicoproteína gp120 de la envoltura del virus de inmunodeficiencia humana 1 y no se encuentra en la superficie de ninguna de las líneas celulares de tumores cerebrales ensayadas en este estudio. Después, las células se analizaron empleando FACS. Los resultados

20 muestran (Fig.3) que, en cada caso, > 95% de las células presentan una fuerte fluorescencia cuando se trataron con ^{EGFR}minicélulas_{Dox} y las células no mostraron fluorescencia cuando se trataron con el control gp120^{minicélulas}_{Dox}.

La eficacia de unión observada se confirmó aún más utilizando microscopía de fluorescencia para visualizar directamente la unión de ^{EGFR}minicélulas_{Dox} a las células tumorales cerebrales y también al suministro de doxorubicina intracelular en las células cancerosas.

25 Las ^{EGFR}minicélulas_{Dox} se utilizaron para transfectar el tumor cerebral canino y las líneas celulares de control humano. Tres horas después de la transfección y lavado del exceso de minicélulas no unidas, las minicélulas todavía adherentes a las líneas celulares se revelaron marcando el MAb dirigido a EGFR con anti-IgG2a-AF488. Los resultados muestran (Fig.4) que las minicélulas específicamente dirigidas (^{EGFR}minicélulas_{Dox}) se unieron en gran número a las células de cáncer de cerebro humano y canino, mientras que las minicélulas de control no lo hicieron.

30 Además, la mayoría de las células tratadas con ^{EGFR}minicélulas_{Dox} mostró autofluorescencia de dox en el núcleo celular, lo que sugiere que un número significativo de minicélulas se había sometido a la endocitosis y el, lisado en lisosomas intracelulares y que el dox se había liberado intracelularmente. Este mecanismo de administración intracelular de fármacos a través de minicélulas empaquetadas con fármacos dirigidas a anticuerpos biespecíficos a diferentes líneas de células tumorales se ha definido anteriormente por los autores de la presente solicitud y

35 publicado (MacDiarmid *et al.*, 2007).

Los resultados anteriores proporcionan la justificación para empaquetar las minicélulas con dox y dirigirlas a EGFR.

Ejemplo 5. Tratamiento de siete perros con cáncer cerebral en etapa tardía con ^{EGFR}minicélulas_{Dox} y eficacia antitumoral

40 Los perros de este estudio eran perros de compañía que se presentaron como pacientes en el Centro de Especialistas en Veterinaria (VSC, de sus siglas en inglés) o en el Hospital de Especialistas en pequeños animales (SASH, de sus siglas en inglés), en Sydney, Australia. La participación en el estudio se ofreció a pacientes en los que el dueño del perro había rechazado la terapia estándar, o en casos de enfermedad avanzada en los que no existía una terapia estándar significativa. Los perros se trataron de acuerdo con las directrices del National Health and Medical Research Council, Australia para el cuidado y uso de animales de laboratorio y con la aprobación del

45 Comité de Ética Animal EnGeneIC. Se obtuvo el consentimiento informado firmado de todos los propietarios. Todos los pacientes se sometieron a un examen de necropsia en el momento o en la muerte por cualquier causa.

50 Todos los tumores cerebrales se diagnosticaron mediante histología o citología cuando fue posible. Los diagnósticos antes de la muerte se basaron en una combinación de apariencia característica en la imagen de resonancia magnética (IRM) y signos clínicos. El diagnóstico histológico se consideró demasiado invasivo en estos casos de tumores cerebrales y el diagnóstico se confirmó mediante necropsia.

Los métodos de estadificación empleados variaron según el tipo histológico y el sitio anatómico del tumor, y el estado clínico. Estos incluyen, pero no se limitan a, examen físico, hemograma completo, perfil bioquímico sérico, análisis de orina, perfil de coagulación, radiografías torácicas, ecografía abdominal e imágenes por resonancia magnética (IRM). Las imágenes por resonancia magnética se realizaron con un dispositivo Phillips Achieva de 1,5T.

55 Los perros se eligieron para el estudio siempre que tuvieran un estado funcional adecuado, y parámetros

hematológicos y bioquímicos séricos para someterse a la terapia. Todos los perros tenían una enfermedad mensurable al ingresar al estudio, pero no hubo restricciones en cuanto al estado de la enfermedad o la carga de la enfermedad. A los pacientes se les permitió continuar con los medicamentos para ayudar en la prevención de convulsiones y edema del SNC. También se permitió continuar con los medicamentos prescritos previamente para afecciones concomitantes. No se permitieron terapias alternativas durante el período de prueba.

Se realizó un tratamiento con 1×10^{10} EGFRminicélulas_{Dox} por dosis semanalmente. El tratamiento se administró a través de un catéter venoso periférico colocado asépticamente (cefálico izquierdo) en 2 ml durante una infusión de 2 minutos.

Los pacientes ingresaron en el hospital y se extrajeron 3 ml de sangre por punción venosa yugular. Esto se colocó en EDTA de potasio para hematología y tubos activadores de coagulación de suero para bioquímica. Se recogieron 5 ml adicionales antes de la administración de EGFRminicélulas_{Dox} y a las 4 horas después de la administración de las minicélulas. Los perros se monitorearon durante todo el período de tratamiento clínico y en ausencia de efectos secundarios tóxicos a las 4 horas posteriores al tratamiento con EGFRminicélulas_{Dox}, los perros se enviaron a casa.

La sangre se colocó en un tubo estéril, se centrifugó a $1.580 \times g$ durante 15 minutos a temperatura ambiente (de 20 a 22°C) y el suero se recogió asépticamente. Los sueros se almacenaron a -80°C hasta que se requirieron para el perfil de respuesta de anticuerpos o de citoquinas. Los pacientes se pre-medicaron con maleato de clorfeniramina a 0,5 mg/kg y fosfato sódico de dexametasona a 0,2 mg/kg 15 minutos antes del tratamiento.

Se llevaron a cabo estudios de casos en siete perros con cáncer cerebral en etapa tardía que se sometieron a una estadificación clínica inicial con observaciones clínicas y resonancia magnética cerebral.

Los pacientes caninos designados BCD-1 a BCD-7 mostraron signos clínicos típicos de tumores cerebrales en etapa tardía que incluyen convulsiones, ataxia, parálisis parcial de las extremidades, pérdida parcial de la visión periférica y comportamiento agresivo (véase la Tabla 2, *más abajo*).

A los perros se les administraron inyecciones en bolo intravenoso (i.v.) de 1×10^{10} EGFRminicélulas_{Dox} (2ml) una vez por semana y cada semana se llevaron a cabo estudios de evaluación clínica, hematología sérica, bioquímica, respuesta inmune (títulos de anticuerpos para el antígeno dominante de minicélulas, LPS) y respuesta a citoquinas. Se llevaron a cabo imágenes de resonancia magnética del cerebro aproximadamente cada 8 semanas para determinar la respuesta antitumoral. La dosis de minicélulas para administrar en los perros se determinó previamente a partir de estudios en 20 perros con hemangiosarcoma en etapa tardía y ensayos de toxicología en monos rhesus (datos no mostrados).

Los resultados muestran que los síntomas clínicos anormales del tumor cerebral determinados en el momento de la estadificación clínica (Tabla 2) volvieron a la normalidad después de aproximadamente cinco a quince dosis de EGFRminicélulas_{Dox}.

La respuesta se evaluó mediante imágenes de resonancia magnética. La respuesta se clasificó según los criterios de respuesta en tumores sólidos (RECIST v 1.1) para tumores sólidos. Además, el volumen del tumor cerebral se evaluó mediante la fórmula: largo x ancho x alto x ($\pi/6$). Una respuesta completa (RC) se definió como la desaparición de todas las enfermedades macroscópicas conocidas, una respuesta parcial (RP) se definió como una disminución $\geq 50\%$ en el tamaño del tumor desde el inicio, pero no una RC, la enfermedad estable se designó para los tumores que no cumplieran con los criterios o RC, RP o enfermedad progresiva y enfermedad progresiva (EP) se definió como un aumento $\geq 25\%$ en el tamaño del tumor o la aparición de nuevas lesiones.

Las imágenes de resonancia magnética mostraron que en todos los perros, el crecimiento del tumor se había detenido y en un caso, BCD-2, no había evidencia de la gran masa tumoral (Fig.5) después de solo cinco dosis de EGFRminicélulas_{Dox}.

Ejemplo 6. Ausencia de toxicidad en perros con cáncer cerebral a pesar de la administración repetida con EGFRminicélulas_{Dox}

La toxicidad se evaluó mediante un cuestionario del cliente en busca de signos de disfunción del tracto gastrointestinal (anorexia, diarrea, vómitos, y enteritis) y signos constitucionales (letargo/fatiga). La toxicidad hematológica y bioquímica se determinó semanalmente antes de cada tratamiento. La toxicidad se calificó según los criterios de terminología común del Grupo de Oncología Cooperativa Veterinaria para eventos adversos (VCOG-CTCAE) después de la quimioterapia o la terapia biológica antineoplásica en perros y gatos v1.0.

El peso corporal se mantuvo sin cambios durante el transcurso del tratamiento. La temperatura corporal aumentó de 38,5°C a 39°C en la primera hora después de la administración y volvió a la normalidad a las 4 horas.

Se recogió suero de perros (5 ml) antes de la dosis con EGFRminicélulas_{Dox} y 4 h después de la dosis. La evaluación de los perfiles bioquímicos y hematológicos del suero (Figs. 6 y 7) se llevo a cabo por IDEXX Laboratories (Sydney, Australia). Los laboratorios IDEXX proporcionaron rangos de referencia para perros.

Los parámetros de bioquímica sérica se mantuvieron dentro del intervalo de referencia normal (Fig. 6). En el

momento de la estadificación clínica inicial, todos los perros mostraron una marcada elevación de las enzimas hepáticas alanina aminotransferasa (ALT) y fosfatasa alcalina (ALP), probablemente porque todos los perros recibieron tratamiento convencional con glucocorticoides (prednisolona) en dosis que varían de 0,5 a 2 mg/kg. una vez al día y fenobarbital (1 mg dos veces al día) para las convulsiones difíciles de controlar. La ecografía hepática se realizó de forma rutinaria para todos los perros y no mostró ningún signo de tumores hepáticos. A lo largo del estudio, los hígados se mantuvieron normales, lo que indica que no hubo eventos adversos en el hígado a pesar de las dosis repetidas de $EGFR^{minicélulasDox}$.

Los índices hematológicos para todos los perros también se mantuvieron dentro del intervalo normal durante todo el estudio (Fig. 7).

10 Ejemplo 7. Respuestas de citoquinas y anticuerpos en perros con cáncer cerebral después de dosis repetidas con $EGFR^{minicélulasDox}$

Se analizó el suero canino en busca de citoquinas inflamatorias caninas $TNF\alpha$, IL-6 y citoquinas anti-inflamatorias IL-10 utilizando kits ELISA duoset suministrados por R&D Systems (EE.UU.) después de la validación de cada ELISA según las instrucciones del fabricante. Se desarrollaron placas de micropocillos de alta unión (Greiner) empleando sustrato TMB (Sigma) y se leyeron en un lector de placas Biotek uQuant a 450 nm.

Las respuestas de citoquinas inflamatorias, $TNF\alpha$, variaron con cada perro y no mostraron un patrón consistente. Tres perros (BCD-2, -4 y -6) no mostraron elevación de $TNF\alpha$ a pesar de la administración repetida (Fig. 8). BCD-5 y BCD-7 tampoco mostraron elevación de $TNF\alpha$ hasta las dosis 9 y 10 respectivamente, mientras que las 3 y 7 dosis posteriores mostraron respectivamente un aumento significativo pero sin signos clínicos adversos. BCD-1 tenía $TNF\alpha$ elevado en el momento de la estadificación clínica y las 97 dosis posteriores de $EGFR^{minicélulasDox}$ no mostraron mayor elevación en $TNF\alpha$.

La citoquina inflamatoria IL-6 mostró una tendencia donde a las 4 h después de la dosis (Fig. 8), hubo un pequeño pico en IL-6 que volvió a la normalidad a las 24 h. Las dosis posteriores no dieron como resultado un aumento del pico de IL-6 y la tendencia se mantuvo igual después de cada dosis. Una excepción fue BCD-4, cuya IL-6 permaneció normal durante todo el estudio (39 dosis durante 288 días).

Curiosamente, la citoquina antiinflamatoria IL-10 se elevó cuando hubo picos en $TNF\alpha$ e IL-6 (Fig. 8). Está bien establecido que los monocitos y macrófagos secretan IL-10 después de la activación con varios mediadores, tales como el LPS bacteriano (Sabat *et al.*, 2010).

Se sembró en placas LPS purificado de *S. typhimurium* (Sigma) en los pocillos (250 ng/pocillo) en tampón de revestimiento (carbonato de sodio 10 mM pH 9,6) y se incubó durante la noche a 4°C. Las placas se bloquearon con tampón de bloqueo que contenía BSA al 1% en PBS durante 1 hora a 37°C. Se agregaron diluciones en serie de muestras de suero a cada placa y se incubaron a 4°C durante la noche. Después del lavado, los anticuerpos unidos se detectaron con IgG de cabra anti-canina (RDI) conjugada con peroxidasa de rábano picante (HRP)

El título de anticuerpos se definió como la dilución de suero recíproca que proporciona una lectura de densidad óptica media máxima (450 nm). Se utilizó el programa informático KC Junior para ajustar una curva de 2 parámetros a cada muestra de suero. Todas las muestras se analizaron por duplicado y los datos representan los errores estándar de la media.

Los títulos de anticuerpos séricos de O-polisacárido (Fig.9) mostraron una respuesta típica que mostraba un aumento de 20 veces en el título de IgG por dosis triple (durante tres semanas) y alcanzaron una meseta sin mayor elevación durante el transcurso del estudio para cada perro. Esto no sorprende ya que se sabe que el componente O-polisacárido del LPS es un antígeno de tipo 1 independiente de las células T y que estos antígenos activan las células B principalmente estimulando los receptores mitogénicos, por ejemplo, los receptores tipo Toll (TLRs).

Ejemplo 8. Número de dosis repetidas de $EGFR^{minicélulasDox}$ administrado y supervivencia de perros con cánceres cerebrales en etapa tardía

Curiosamente, los perros BCD-1 a BCD-7 sobrevivieron 822, 709, 471, 288, 408, 140 y 101 días respectivamente y recibieron 97, 43, 44, 39, 32, 20 y 13 dosis de $EGFR^{minicélulasDox}$ respectivamente (Fig. 10). BCD-2, -3 y -5 están en curso y BCD-2 no recibió una dosis durante más de 300 días sin recurrencia del tumor. BCD-4 sobrevivió 288 días y permaneció con la enfermedad estable, pero sucumbió a una infección renal. El análisis post-mortem reveló que la muerte no estaba relacionada con el tumor cerebral. Sorprendentemente, a pesar del gran número de dosis de $EGFR^{minicélulasDox}$ administrado sistémicamente, no hubo signos clínicos de eventos adversos.

Ejemplo 9. Imágenes in vivo de $EGFR^{minicélulas}$ en el cerebro de dos perros con cáncer cerebral en etapa tardía

La biodistribución de nanopartículas in vivo, particularmente en una especie animal grande, se ha visto obstaculizada debido al tamaño muy pequeño de las partículas, la capacidad de transportar suficientes moléculas fluorescentes por partícula para permitir la visualización y alcanzar una concentración in vivo en cualquier órgano en particular. Además, el conocimiento actual de que las nanopartículas de más de 12 nm no entrarían en los tumores

cerebrales debido a la presencia de la BHE. Sin embargo, la sorprendente eficacia antitumoral observada en los 7 perros nos llevó a determinar si el EGFR minicélulas_{Dox} de alguna manera logra entrar en los tumores cerebrales a pesar de su enorme tamaño de ~ 400 nm.

Las EGFR minicélulas se radio-marcaron con ^{123}I y se administraron i.v. 1×10^{10} minicélulas en BCD-3 y BCD-5. A los perros se les sedó y se les tomaron imágenes empleando tomografía computarizada por emisión de fotón único (SPECT). Ambos perros también tuvieron exploraciones de resonancia magnética previas para mostrar claramente el tamaño y la ubicación del tumor.

A los animales se les inyectó con aproximadamente 40 MBq de EGFR minicélulas radiomarcadas con [^{123}I] y se les tomó imágenes en diferentes puntos de tiempo durante las siguientes 4 h. Todas las imágenes se realizaron en una cámara gamma Picker 3000XP de triple detector SPECT (tomografía computarizada por emisión de fotón único) equipada con colimadores de orificios paralelos multiuso de baja energía. Todas las adquisiciones utilizaron una configuración de ventana de fotopico de $159 \text{ keV} \pm 10\%$. Los animales recibieron un poco de anestesia ligera antes de la obtención de las imágenes. Para estudiar la biodistribución se obtuvieron imágenes no tomográficas de un perro (BCD-3) a los 30 minutos y a las 3 horas después de la inyección en una posición supina. Se recolectaron múltiples imágenes planas que cubren la cabeza y el torso en matrices de 256×256 durante 2 minutos en posición de cama en ambos puntos de tiempo y se unieron después de la adquisición para obtener imágenes 2D de cuerpo completo. Todas las imágenes tomográficas (SPECT) se adquirieron en matrices de 128×128 , utilizando 120 proyecciones de incrementos radiales de 3° (360° en total) durante 20 segundos por proyección. Todos los datos se transfirieron a una estación de trabajo de medicina nuclear fuera de línea (HERMES, Nuclear Diagnostic, Estocolmo, Suecia) y se reconstruyeron empleando un algoritmo de reconstrucción iterativo (OSEM, 8 subconjuntos, 4 iteraciones). Las imágenes se reconstruyeron con un zoom de programa informático de 2,0 para dar vóxeles que miden $1,78 \times 1,78 \times 2,56 \text{ mm}$ (X×Y×Z). Las imágenes se filtraron después de la reconstrucción con un filtro Butterworth de orden 10 y un corte de $1,25 \text{ ciclos.píxel}^{-1}$. Las imágenes por resonancia magnética adquiridas previamente en los perros se importaron a la estación de trabajo y las imágenes anatómicas (MRI) y funcionales (SPECT) se registraron en el programa informático.

Las imágenes de todo el cuerpo (Fig. 11ci y ii) muestran una captación intensa de las EGFR minicélulas marcadas con [^{123}I]-en el hígado desde el momento más temprano (30 minutos después de la inyección). Este hecho, más la falta de visualización temprana de la tiroides, indica un buen marcaje de las minicélulas. La excreción en el intestino era visible en las imágenes posteriores, al igual que algo de captación glandular bilateral en el cuello y una pequeña cantidad de captación tiroidea de (presuntamente) yoduro- ^{123}I libre presente.

Las imágenes de SPECT cerebrales (Figs. 11ai-iii y 11biii; SPECT) muestran un foco de radiactividad en el área correspondiente al tumor cerebral visto en la resonancia magnética (Figs. 11ai-iii y 11bi; MRI). Las imágenes superpuestas de T1 posteriores al contraste y de SPECT co-registradas (Figs. 11ai-iii y 11bii; SPECT/MRI) muestran que la radioactividad enfocada se localizaba en el núcleo del tumor en cada perro.

Estos ejemplos demuestran la eficacia antitumoral en el 100% de los casos con tumores cerebrales en etapa tardía, un resultado sin precedentes logrado con la presente divulgación. También es un resultado muy sorprendente, dadas las siguientes consideraciones.

1. Los fármacos con un tamaño del orden de la doxorrubicina (579,98 Daltons), tales como el paclitaxel (853,9 Daltons) y la vinblastina (810,9 Daltons), nunca se habrían considerado hasta ahora para la administración y el tratamiento sistémicos (i.v.) de tumores cerebrales. Dado el límite de consenso de aproximadamente 400 Dalton, como se discutió anteriormente, no se esperaba que cruzaran la BHE en absoluto.

2. Décadas de investigación han dado como resultado que la temozolomida sea el único fármaco aprobado por la FDA para el tratamiento de cánceres cerebrales; esto se debe a que es el único fármaco que tiene un peso molecular, 194,15 daltons, que está por debajo del límite percibido de 400 daltons para cruzar la BHE.

3. Incluso si se hubiera considerado para el tratamiento de tumores cerebrales, la doxorrubicina en quimioterapia convencional se administra normalmente en una dosis de 100 mg a 125 mg en un paciente medio (60 kg). Esto equivale de 100.000 μg a 125.000 μg por dosis i.v., considerada mínima para lograr la eficacia terapéutica en el tratamiento de algunos cánceres. De acuerdo con la divulgación, por el contrario, la dosis de doxorrubicina transportada en 1×10^{10} EGFR minicélulas_{Dox} es de aproximadamente 4 μg , que es de 25.000 a 31.250 veces menor que la dosis administrada para la quimioterapia dox convencional. Esta divergencia de la práctica convencional, de acuerdo con la divulgación, se habría combinado con la comprensión actual del tratamiento del cáncer para disuadir al médico de considerar la posibilidad de una dosis de fármaco tan baja en cualquier contexto, y mucho menos en el contexto de los cánceres cerebrales.

4. El uso del vehículo de administración de minicélulas de acuerdo con la divulgación contradice los límites de tamaño de consenso, discutidos anteriormente, que a su vez están informados por un punto de vista convencional de la BHE alterada en tumores cerebrales. Sin embargo, los datos obtenidos con la divulgación muestran que las minicélulas intactas derivadas de bacterias entran rápidamente en los tumores cerebrales en concentraciones significativas, lo que permite, por ejemplo, la toma de imágenes de las minicélulas

radiomarcadas en el microambiente del tumor cerebral. Los resultados también demuestran una estabilización/regresión tumoral altamente significativa en cada uno de los sujetos tratados, un logro sin precedentes que subraya un paradigma terapéutico eficaz, de acuerdo con la divulgación, para un campo de la oncología clínica tipificado previamente sólo por pésimos resultados.

Tabla 2

| Perro con cáncer de cerebro (BCD) | Peso (kg) | Área de superficie corporal (m ²) | Especies | Años | Macho/Hembra | Signos clínicos en el momento de la estadificación | Diagnóstico |
|--|-----------|---|-----------------------------|------------------|--------------|---|--|
| BCD-1 | 23,18 | 0,81 | Cruce de Labrador-Retriever | 5 años | Macho | Hipermetría, caída hacia la izquierda, déficit de pares craneales en el lado izquierdo. atáxico, especialmente en la parte trasera. Tiende a caminar de forma lateral, de "medio pase", pero no se cae. Desgaste muscular severo. | Carcinoma de plexo coroideo |
| BCD-2 | 33,27 | 1,03 | Golden Retriever | 7 años y 6 meses | Hembra | Presentados después de la convulsión. El examen neurológico indicó déficits propioceptivos en la pata trasera derecha. | N/A |
| BCD-3 | 8,65 | 0,42 | Terrier mestizo | 12 años | Macho | Falta de reflejo papilar a la luz en el ojo derecho. | N/A |
| BCD-4 | 32,90 | 1,03 | Boxer | 10 años | Hembra | Presentado por convulsiones. Reflejos papilares a la luz bilateralmente ausentes. | Astrocitoma |
| Perro con cáncer de cerebro (BCD) | Peso (kg) | Área de superficie corporal (m ²) | Especies | Años | Macho/Hembra | Signos clínicos en el momento de la estadificación | Diagnóstico |
| BCD-5 | 6,50 | 0,35 | Jack Russell Terrier | 15 años | Macho | Presentado por convulsiones. Señales de la neurona motora superior en las extremidades delantera derecha y trasera derecha. | N/A |
| BCD-6 | 22,66 | 0,80 | Staffordshire Bull Terrier | 11 años | Macho | Presentado por convulsiones. Déficits propioceptivos en ambas patas traseras. Todos los demás hallazgos normales. | Meningioma maligno pobremente diferenciado |
| BCD-7 | 23,50 | | Boxer | 7 años | Macho | Girando hacia la izquierda, comportamiento agresivo, inapetencia, pérdida de peso. | Astrocitoma bien diferenciado |
| N/A: Perro vivo y tejido tumoral no disponible | | | | | | | |

Ejemplo 10. *Empaquetamiento en minicélulas de una variedad de fármacos de moléculas pequeñas*

Este ejemplo ilustra tanto la viabilidad de cargar un número diverso de fármacos de molécula pequeña en

minicélulas como la eficacia anti-tumoral significativa de las composiciones resultantes que contienen minicélulas empaquetadas con fármacos de molécula pequeña. Los fármacos de molécula pequeña implicados fueron:

- A. Doxorrubicina,
- B. Paclitaxel,
- C. Fluoro-paclitaxel,
- D. Cisplatino,
- E. Vinblastina,
- F. Monsatrol,
- G. Inhibidor de timidilato sintasa (TS) OSI-7904
- H. Irinotecán,
- I. 5-Fluorouracilo,
- J. Gemcitabina, y
- K. Carboplatino.

5 Empaquetamiento de doxorrubicina, vinblastina y paclitaxel. La eficacia del empaquetamiento de doxorrubicina, vinblastina fluorescente y fluoro-paclitaxel en minicélulas intactas se ha demostrado en la presente publicación de los inventores, MacDiarmid *et al.*, *Cancer Cell* 11: 431-45 (2007). Figura 1E de MacDiarmid *et al.* *Cancer Cell* (2007), con diferentes colores de fluorescencia para mostrar que las minicélulas se empaquetaron con grandes cantidades de doxorrubicina (DOX), vinblastina (VIN) y paclitaxel (PAC), respectivamente.

10 La doxorrubicina, el fluoro-paclitaxel y el cisplatino no se filtran fuera de las minicélulas una vez se empaquetan. MacDiarmid *et al.* *Cancer Cell* (2007) emplearon además la cinética para demostrar que, no sólo los fármacos (doxorrubicina, fluoro-paclitaxel y cisplatino) se cargan suficientemente en minicélulas intactas, sino que estos fármacos no escapaban de las minicélulas intactas una vez se empaquetaban (véase la Figura 2A en el artículo).

15 Las minicélulas empaquetadas con doxorrubicina y paclitaxel eran eficaces para tratar xenoinjertos de cáncer de mama. Por otra parte, los datos presentados en la Figura 4A de MacDiarmid *et al.* *Cancer Cell* (2007) muestran que los xenoinjertos de cáncer de mama humano se trataron eficazmente con minicélulas empaquetadas con doxorrubicina o paclitaxel.

20 Efecto antitumoral de las minicélulas empaquetadas con monastrol. Otro artículo publicado por los presentes inventores, MacDiarmid *et al.*, *Cell Cycle* 17: 1-7 (2007), presentó datos para demostrar la eficacia de las minicélulas empaquetadas con monastrol para inhibir el crecimiento tumoral en ratones que contienen xenoinjertos de cáncer de mama humano (véase la Figura 1A en el artículo).

Como se muestra en la Fig. 1A, el monastrol se empaquetó eficazmente en minicélulas intactas y el xenoinjerto de cáncer de mama humano se trató eficazmente con minicélulas empaquetadas con monastrol.

25 Efecto antitumoral de minicélulas empaquetadas con inhibidor de timidilato sintasa OSI-7904. Asimismo, los xenoinjertos de cáncer de colon humano, se trataron eficazmente con minicélulas cargadas con fármaco. La Figura 1B de MacDiarmid *et al.* (2007) muestra que las minicélulas cargadas con OSI-7904 eran más eficaces, a una dosis que era ~385 veces menor que la de la formulación liposomal de OSI-7904L, que la formulación liposomal OSI-7904L. El vector de administración de minicélulas aumentó así drásticamente el índice terapéutico de OSI-7904.

30 Tratamiento eficaz de xenoinjertos de cáncer de colon humano resistentes a irinotecán. El irinotecán también se empaquetó en minicélulas intactas. Además, el tratamiento eficaz de xenoinjertos de cáncer de colon humano resistentes a irinotecán después del tratamiento secuencial dual con minicélulas empaquetadas con ARNhc-MDR1 seguido de minicélulas dirigidas a irinotecán se demuestra en las Figuras 5A y 5A en MacDiarmid *et al.*, *Nature Biotechnology* 27: 643-51 (2009), otra publicación de los presentes inventores.

35 Tratamiento eficaz de xenoinjertos de cáncer de colon humano resistentes al 5-Fluorouracilo. Al igual que el irinotecán, el 5-Fluorouracilo también se empaquetó en minicélulas intactas y se logró un tratamiento eficaz de xenoinjertos de cáncer de colon humano resistentes al 5-Fluorouracilo después de un tratamiento secuencial dual con minicélulas empaquetadas con ARNhc-MDR1 seguido de minicélulas dirigidas a 5-Fluorouracilo. Véase las Figuras complementarias 4A y 4B de MacDiarmid *et al.*, (2009).

40 Tratamiento eficaz de xenoinjertos de cáncer pancreático humano con minicélulas empaquetadas con Gemcitabina (Gemzar®). La Fig. 12 demuestra que los xenoinjertos de cáncer pancreático humano se trataron eficazmente con minicélulas empaquetadas con Gemcitabina (Gemzar®).

A ratones Balb/c *nu/nu* con xenoinjertos de cáncer pancreático humano (MIA PaCa) se les administró i.v. bien con

Gemzar libre o bien con minicélulas empaquetadas con Gemzar dirigidas a EGFR (^{EGFR}MinicélulasGemzar). La Figura 12 muestra que aunque las dosis de minicélulas contenían sólo ~50 ng de Gemzar, la eficacia antitumoral de los tratamientos con ^{EGFR}MinicélulasGemzar eran tan eficaces en términos de eficacia antitumoral como el Gemzar libre que se administró a una dosis de 400.000 ng por dosis.

- 5 Carboplatino en el tratamiento de xenoinjertos de cáncer de mama humano. En la Fig. 13 se demuestra el efecto de las minicélulas empaquetadas con carboplatino para tratar xenoinjertos de cáncer de mama humano

A ratones Balb/c *nu/nu* con xenoinjertos de cáncer de mama humano (MDA-MB-468) se les administró i.v. bien con carboplatino libre o bien con minicélulas no dirigidas empaquetadas con carboplatino o minicélulas empaquetadas con carboplatino dirigidas a EGFR (^{EGFR}MinicélulasCarboplatino). Los resultados de la Fig.13 muestran que los tratamientos con ^{EGFR}MinicélulasCarboplatino eran muy eficaces para lograr la estabilización del tumor, incluso cuando la dosis de carboplatino era ~ 1.000 veces menor que la dosis de carboplatino libre.

10

Publicaciones citadas

- Allard, E., Passirani, C., Benoit, J.P. Convection-enhanced delivery of nanoparticles for the treatment for brain tumors. *Biomaterials* 30, 2302-2318 (2009).
- 15 Behin, A., Hoang-Xuan, K., Carpentier, A.F., Delattre, J.Y. Primary brain tumours in adults. *Lancet* 361, 323-331 (2003).
- Bickel, U. How to Measure Drug Transport across the Blood-Brain Barrier. *NeuroRx*. 2, 15-26 (2005).
- Black, K.L., Ningaraj, N.S. Modulation of brain tumor capillaries for enhanced drug delivery selectively to brain tumor. *Cancer Control* 11, 165-73 (2004).
- 20 Bobo, R.H., Laske, D.W., Akbasak, A., Morrison, P.F., Dedrick, R.L., Oldfield, E.H. Convection-enhanced delivery of macromolecules in the brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 91, 2076-2080 (1994).
- Borst, P. *et al.* A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *J. Natl. Cancer Inst.* 92, 1295-1302 (2000).
- 25 Caravella J., Lugovskoy, A. Design of next-generation protein therapeutics. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 14, 520-528 (2010).
- Britton, R.A., Lin, D.C., Grossman, A.D. Characterization of a prokaryotic SMC protein involved in chromosome partitioning. *Genes Dev.* 12, 1254-9 (1998).
- Caplen, N.J. RNAi as a gene therapy. *Expert Opin. Biol. Ther.* 3, 575-86 (2003).
- 30 Caplen, N.J., Mousses, S. Short interfering RNA (siRNA)-mediated RNA interference (RNAi) in human cells. *Ann. NY Acad. Sci.* 1002, 56-62 (2003).
- Cecchelli, R., Berezowski, V., Lundquist, S., Culot, M., Renftel, M., Dehouck, M.P., Fenart, L. Modelling of the blood-brain barrier in drug discovery and development. *Nat. Rev. Drug Discov.* 6, 650-661 (2007).
- Chu, C.Y., Rana, T.M. Translation repression in human cells by microRNA-induced gene silencing requires RCK/p54. *PLoS Biol.* 4, e210 (2006).
- 35 Clark-Curtiss, J.E., Curtiss, R. III Analysis of recombinant DNA using *Escherichia coli* minicells. *Methods Enzymol.* 101, 347-62 (1983).
- Da Silva L *et al.* HER3 and downstream pathways are involved in colonization of brain metastases from breast cancer. *Breast Cancer. Res.* 12, R46 (1-13) (2010).
- 40 Debinski, W., Gibo, D.M. (2000) Molecular expression analysis of restrictive receptor for interleukin 13, a brain tumor-associated cancer/testis antigen. *Mol. Med.* 6, 440-449 (2000).
- Debinski, W., Slagle, B., Gibo, D.M., Powers, S.K., Gillespie, G.Y. Expression of a restrictive receptor for interleukin 13 is associated with glial transformation. *J. Neurooncol.* 48, 103-111 (2000).
- de Boer, P.A., Crossley, R.E., Rothfield, L.I. Roles of MinC and MinD in the site-specific septation block mediated by the MinCDE system of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 174, 63-70 (1992).
- 45 Dehouck, B., Dehouck, M.P., Fruchart, J.C., Cecchelli, R. Upregulation of the low-density lipoprotein receptor at the blood-brain barrier: intercommunications between brain capillary endothelial cells and astrocytes. *J. Cell Biol.* 126, 465-473 (1994).
- Duan, Z. *et al.* Inhibition of ABCB1 (MDR1) and ABCB4 (MDR3) expression by small interfering RNA and reversal

- of paclitaxel resistance in human ovarian cancer cells. *Mol. Cancer Ther.* 3, 833-8 (2004).
- Duxbury, M.S., *et al.* Systemic siRNA-mediated gene silencing: A new approach to targeted therapy of cancer. *Ann. Surg.* 240, 667-74 (2004).
- Eichler, A.F., Loeffler, J.S. Multidisciplinary management of brain metastases. *Oncologist* 12, 884-98 (2007).
- 5 Fox, B.D., Cheung, V.J., Patel, A.J., Suki, D., Rao, G. Epidemiology of metastatic brain tumors. *Neurosurg. Clin. N. Am.* 22, 1-6 (2011).
- Fukuda, M. Radiolabeling oligosaccharides after mild periodate oxidation. *Curr. Protocols Molec. Biol.* (Suppl 26), 17.5.1-17.5.8 (1994).
- 10 Gregory, R.I., Chendrimada, T.P., Shiekhattar, R. MicroRNA biogenesis: isolation and characterization of the microprocessor complex. *Methods Mol. Biol.* 342, 33-47 (2006).
- Groothuis, D.R. The blood-brain and blood tumor barriers: a review of strategies for increasing drug delivery. *Neuro-oncol.* 2, 45-59 (2000).
- 15 Hadjipanayis, C.G., Fellows-Mayle, W., Deluca, N.A. Therapeutic efficacy of a herpes simplex virus in combination with radiation or temozolomide for intracranial glioblastoma after convection enhanced delivery. *Mol. Ther.* 16, 1783-1788 (2008).
- Hadjipanayis, C.G., Machaidze, R., Kaluzova, M., Wang, L., Schuette, A.J., Chen, H., *et al.* EGFRvIII antibody-conjugated iron oxide nanoparticles for magnetic resonance imaging-guided convection-enhanced delivery and targeted therapy of glioblastoma. *Cancer Res.* 70, 6303-6312 (2010).
- 20 Hassenbusch, S.J., Gunes, S., Wachsmann, S., Willis, K.D. Intrathecal clonidine in the treatment of intractable pain: a phase I/II study. *Pain Med.* 3, 85-91 (2002).
- Hau, V.S., Huber, J.D., Campos, C.R., Lipkowski, A.W., Misicka, A., Davis, T.P. Effect of guanidino modification and proline substitution on the in vitro stability and blood-brain barrier permeability of endomorphin II. *J. Pharm. Sci.* 91, 2140-9 (2002).
- 25 Hawkins, B.T., Davis, T.P. The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacological Reviews* 57, 173-185 (2005).
- Hershey, G.K. IL-13 receptors and signaling pathways: An envolving web. *J. Allergy Clin. Immunol.* 111, 677-690 (2003).
- Higgins, R.J. *et al.* Spontaneous canine gliomas: overexpression of EGFR, PDGFR alpha and IGFBP2 demonstrated by tissue microarray immunophenotyping. *J. Neurooncol.* 98, 49-55 (2010).
- 30 Hiraga, S., Niki, H., Ogura, T., Ichinose, C., Mori, H., Ezaki, B., Jaffe, A. Chromosome partitioning in *Escherichia coli*: novel mutants producing anucleate cells. *J. Bacteriol.* 171, 1496-1505 (1989).
- Hu, Z., Lutkenhaus, J. Topical 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, 82-90 (1999).
- 35 Ireton, K., Gunther, N.W. 4th, Grossman, A.D. spo0J is required for normal chromosome segregation as well as the initiation of sporulation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 176, 5320-9 (1994).
- Jarboe, J.S., Johnson, K.R., Choi, Y., Lonser, R.R., Park, J.K. Expression of interleukin-13 receptor $\alpha 2$ in glioblastoma multiforme: Implications for targeted therapies. *Cancer Res.* 67, 7983-7986 (2007).
- Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Hao, Y., Xu, J., Thun, M.J. Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J. Clin.* 59, 225-49 (2009).
- 40 Juillerat-Jeanneret, L. The targeted delivery of cancer drugs across the blood-brain barrier: chemical modifications of drugs or drug-nanoparticles? *Drug Discov. Today* 13, 1099-1106 (2008).
- Khalil, A.M. *et al.* Many human large intergenic noncoding RNAs associate with chromatin-modifying complexes and affect gene expression.. *Proc. Natl. Acad. Sci.* EE.UU. 106, 11667-72 (2009).
- 45 Kota, J. *et al.* Therapeutic microRNA delivery suppresses tumorigenesis in a murine liver cancer model. *Cell* 137, 1005-17 (2009).
- Kreuter, J., Alyautdin, R.N., Kharkevich, D.A., Ivanov, A.A. Passage of peptides through the blood-brain barrier with colloidal polymer particles (nanoparticles), *Brain Res.* 674, 171-174 (1995).

- Kreuter, J., Petrov, V.E., Kharkevich, D.A., Alyautdin, R.N. Influence of the type of surfactant on the analgesic effects induced by peptide dalargin after its delivery across the brain-brain barrier using surfactant-coated nanoparticles, *J. Control Release* 49, 81-87 (1997).
- Kreuter, J. Nanoparticulate systems for brain delivery of drugs. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 47, 65-81 (2001).
- 5 Kreuter, J., Shamenkov, D., Petrov, V., Ramge, P., Cychutek, K., Koch-Brandt, C., Alyautdin, R. Apolipoprotein-mediated transport of nanoparticle-bound drugs across the blood-brain barrier *J. Drug Target.* 10, 317-325 (2002).
- 10 Kreuter, J., Ramge, P., Petrov, V., Hamm, S., Gelperina, S.E., Engelhardt, B., Alyautdin, R., von Briesen, H., Begley, D.J. Direct evidence that polysorbate-80-coated poly(butylcyanoacrylate) nanoparticles deliver drugs to the CNS via specific mechanisms requiring prior binding of drug to the nanoparticles, *Pharm. Res.* 20, 409-416 (2003).
- Kreuter, J., Gelperina, S. Use of nanoparticles for cerebral cancer. *Tumori* 94, 271-277 (2008).
- Kroll, R.A., Neuwelt, E.A. Outwitting the blood-brain barrier for therapeutic purposes: osmotic opening and other means. *Neurosurgery* 42, 1083-99 (1998).
- 15 Kusuvara, H., Sugiyama, Y. (2005) Active efflux across the blood-brain barrier: role of the solute carrier family. *NeuroRx* 2, 73-85 (2005).
- Lamborn, K.R. *et al.* Progression-free survival: an important end point in evaluating therapy for recurrent high-grade gliomas. *Neuro Oncol.* 10, 162-70 (2008).
- 20 Laquintana, V., Trapani, A., Denora, N., Wang, F., Gallo, J.M., Trapani, G. New strategies to deliver anticancer drugs to brain tumors. *Expert Opin. Drug Deliv.* 6, 1017-1032 (2009).
- Loscher, W. y Potschka, H. Role of drug efflux transporters in the brain for drug disposition and treatment of brain diseases. *Prog. Neurobiol.* 76, 22-76 (2005).
- Louis, D. N. *et al.* The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol.* 114, 97-109 (2007).
- 25 MacDiarmid, J.A. *et al.* Bacterially derived 400 nm particles for encapsulation and cancer cell targeting of chemotherapeuticsquimioterapéutic. *Cancer Cell* 11, 431-445 (2007)).
- MacDiarmid, J.A., Madrid-Weiss, J., Amaro-Mugridge, N.B., Phillips, L. y Brahmabhatt, H. Bacterially-derived nanocells for tumor-targeted delivery of chemotherapeutics and cell cycle inhibitorsquimioterapéutic *Cell cycle* 6, 2099-2105 (2007).
- 30 MacDiarmid, J.A. *et al.* Sequential treatment of drug-resistant tumors with targeted minicells containing siRNA or a cytotoxic drug. *Nat. Biotechnol.* 27, 643-651 (2009).
- Moghimi, S.M., Hunter, A.C., Murray, J.C. Nanomedicine: current status and future prospects. *FASEB J.* 19, 311-330 (2005).
- 35 Morrison, P.F., Laske, D.W., Bobo, H., Oldfield, E.H., Dedrick, R.L. High-flow microinfusion: tissue penetration and pharmacodynamics. *Am. J. Physiol.* 266, R292-305 (1994).
- Nicolazzo, J.A., Katneni, K. Drug transport across the blood-brain barrier and the impact of breast cancer resistance protein (ABCG2). *Curr. Top. in Med. Chem.* 9, 130-147 (2009).
- Nieth, C. *et al.* Modulation of the classical multidrug resistance (MDR) phenotype by RNA interference (RNAi). *FEBS Lett.* 545, 144-50 (2003).
- 40 Oh, Y.K., Park, T.G. siRNA delivery systems for cancer treatment. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61, 850-62 (2009).
- Okada, Y., Wachi, M., Hirata, A., Suzuki, K., Nagai, K., Matsushashi, M. Cytoplasmic axial filaments in Escherichia coli cells: possible function in the mechanism of chromosome segregation and cell division. *J. Bacteriol.* 176, 917-22 (1994).
- 45 Okada, H. *et al.* Expression of glioma-associated antigens in pediatric brain stem and non-brain stem gliomas.. *J. Neurooncol.* 88, 245-250 (2008).
- Oritz-Zapater *et al.* Key contribution of CPEB4-mediated translational control to cancer progression. *Nature Medicine*, doi: 10.1038/nm.2540 (publicado on-line el 4 de Diciembre de 2011).
- Palmieri, D., Bronder, J.L., Herring, J.M., Yoneda, T., Weil, R.J., Stark, A.M., *et al.* Her-2 overexpression

- increases the metastatic outgrowth of breast cancer cells in the brain.. *Cancer Res.* 67, 4190-98 (2007).
- Pardridge, W.M. Molecular biology of the blood-brain barrier. *Mol. Biotechnol.* 30, 57-70 (2005).
- Pardridge, W.M. Drug targeting to the brain.. *Pharm. Res.* 9, 1733-1744 (2007).
- Pardridge, W.M. Blood-brain barrier delivery. *Drug Discov. Today* 12, 54-61 (2007).
- 5 Pardridge, W.M. Biopharmaceutical drug targeting to the brain. *J. Drug Target.* 18, 157-167 (2010).
- Pardridge, W.M. Drug transport in brain via the cerebrospinal fluid. *Fluids barriers CNS* 8, 1-4 (2011).
- Petri, B., Bootz, A., Khalansky, A., Hekmatara, T., Muller, R., Uhl, R., *et al.* Chemotherapy of brain tumour using doxorubicin bound to surfactant-coated poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles: revisiting the role of surfactants.. *J. Control. Release* 117, 51-58 (2007).
- 10 Rainov, N.G., Koch, S., Sena-Esteves, M. y Berens, M.E. Characterization of a canine glioma cell line as related to established experimental brain tumor models. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 59, 607-613 (2000).
- Raskin, D.M. de Boer, P.A. MinDE-dependent pole-to-pole oscillation of division inhibitor MinC in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 181, 6419-6424 (1999).
- 15 Reardon, D.A. *et al.* Phase II trial of murine (131)I-labeled antitenascin monoclonal antibody 81C6 administered into surgically created resection cavities of patients with newly diagnosed malignant gliomas. *J. Clin. Oncol.* 20, 1389-97 (2002).
- Re, F., Cambianica, I., Zona, C., Sesana, S., Gregori, M., Rigolio, R., La Ferla, B., Nicotra, F., Forloni, G., Cagnotto, A., Salmons, M., Masserini, M., Sancini, G. Functionalization of liposomes with ApoE-derived peptides at different density affects cellular uptake and drug transport across a blood-brain barrier model.. *Nanomedicine* 7, 551-559 (2011).
- 20 Reeve, J.N., Cornett, J.B. Bacteriophage SPO1-induced macromolecular synthesis in minicells of *Bacillus subtilis*. *J. Virol.* 15, 1308-16 (1975).
- Rice, S.L., Roney, C.A., Daumar, P., Lewis, J.S. The next generation of positron emission tomography radiopharmaceuticals in oncology. *Semin. Nucl. Med.* 41, 265-282 (2011).
- 25 Sabat, R. *et al.* Biology of interleukin-10. *Cytokine Growth Factor. Rev.* 21, 331-344 (2010).
- Sarin, H., Kanevsky, A.S., Wu, H. *et al.* Effective transvascular delivery of nanoparticles across the blood-brain barrier into malignant glioma cells. *J. Transl. Med.* 6, 80 (2008).
- Schinkel, A.H..P-glicoprotein, a gatekeeper in the blood-brain barrier.,*Adv. Drug Del. Rev.* 36, 179-194 (1999).
- 30 Schinkel, A.H., Jonker, J.W. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Adv. Drug Del. Rev.* 55, 3-29 (2003).
- Sioud, M. Therapeutic siRNAs. *Trends Pharmacol. Sci.* 25, 22-8 (2004).
- Smith, J.S. *et al.* PTEN mutation, EGFR amplification, and outcome in patients with anaplastic astrocytoma and glioblastoma multiforme., *J. Natl. Cancer Inst.* 93, 1246-1256 (2001).
- 35 Steiniger, S.C., Kreuter, J., Khalansky, A.S., Skidan, I.N., Bobruskin, A.I., *et al.* Chemotherapy of glioblastoma in rats using doxorubicin-loaded nanoparticles. *Int. J. Cancer* 109, 759-767 (2004).
- Stemmler, H.J., Schmitt, M., Willems, A., Bernhard, H., Harbeck, N., Heinemann, V. Ratio of trastuzumab levels in serum and cerebrospinal fluid is altered in HER2-positive breast cancer patients with brain metastases and impairment of blood-brain barrier. *Anticancer Drugs* 18, 23-28 (2007).
- 40 Stewart, L.A. Chemotherapy in adult high-grade glioma: a systematic review and meta-analysis of individual patient data from 12 randomised trials. *Lancet* 359, 1011-18 (2002).
- Stewart, P.S. y D'Ari, R. Genetic and morphological characterization of a *Escherichia coli* chromosome segregation mutant. *J. Bacteriol.* 174, 4513-6 (1992).
- Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, *et al.* Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* 352, 987-996 (2005).
- 45 Sun, H. *et al.* (2003) Drug efflux transporters in the CNS.. *Adv. Drug Del. Rev.* 55, 83-105 (2003).

- Takeshita, F. *et al.* Systemic delivery of synthetic microRNA-16 inhibits the growth of metastatic prostate tumors via downregulation of multiple cell-cycle genes. *Mol. Ther.* 18, 181-7 (2010).
- Weber, F.W. Local convection enhanced delivery of IL4-Pseudomonas exotoxin (NBI-3001) for treatment of patients with recurrent malignant glioma. *Acta Neurochir. Suppl.* 88, 93-103 (2003).
- 5 Wisse, E., Jacobs, F., Topal, B., Frederik, P., De Geest, B. The size of endothelial fenestrae in human liver sinusoids: implications for hepatocyte-directed gene transfer. *Gene Ther.* 15, 1193-1199 (2008).
- Wong, E.T. *et al.* Outcomes and prognostic factors in recurrent glioma patients enrolled onto phase II clinical trials. *J. Clin. Oncol.* 17, 2572-2578 (1999).
- 10 Wrensch, M., Minn, Y., Chew, T., Bondy, M., Berger, M.S. Epidemiology of primary brain tumors: current concepts and review of the literature. *Neuro. Oncol.* 4, 278-299 (2002).
- Wykosky, J., Gibo, D.M., Stanton, C., Debinski, W. Interleukin-13 receptor $\alpha 2$, EphA2, and Fos-related antigen 1 as molecular denominators of high-grade astrocytomas and specific targets for combinatorial therapy. *Clin Cancer Res.* 14, 199-208 (2008).
- 15 Xin, H., Jiang, X., Gu, J., Sha, X., Chen, L., Law, K., *et al.* Angiopep-conjugated poly(ethylene glycol)-co-poly(epsilon-caprolactone) nanoparticles as dual targeting drug delivery system for brain glioma. *Biomaterials* 32, 4293-305 (2011).
- Yagüe, E., *et al.* Complete reversal of multidrug resistance by stable expression of small interfering RNAs targeting MDR1. *Gene Ther.* 11, 1170-4 (2004).
- 20 Yoshimasu, T., Sakurai, T., Oura, S., Hirai, I., Tanino, H., Kokawa, Y., *et al.* Increased expression of integrin $\alpha 3 \beta 1$ in highly brain metastatic subclone of a human non-small cell lung cancer cell line.. *Cancer Sci.* 95, 142-48 (2004).
- Zensi, A., Begley, D., Pontikis, C., Legros, C., Mihoreanu, L. *et al.* Albumin nanoparticles targeted with ApoE enter the CNS by transcytosis and are delivered to neurones.. *J. Control. Release* 137, 78-86 (2009).
- 25 Zhang, Y., Pardridge, W.M. Conjugation of brain-derived neurotrophic factor to a blood-brain barrier drug targeting system enables neuroprotection in regional brain ischemia following intravenous injection of the neurotrophin. *Brain Res.* 889, 49-56 (2001).

REIVINDICACIONES

1. Una composición para su uso en el tratamiento de un tumor cerebral mediante administración sistémica, en donde la composición comprende una pluralidad de minicélulas intactas derivadas de bacterias, y en donde:
 - (A) cada minicélula de dicha pluralidad (i) comprende un anticuerpo que reconoce específicamente un antígeno de una célula tumoral y (ii) abarca un agente anti-neoplásico; y
 - (B) el tumor cerebral tiene vasos sanguíneos con fenestraciones en sus paredes a través de las cuales las minicélulas se pueden extravasar pasivamente.
2. La composición para el uso de la reivindicación 1, en donde dicho agente anti-neoplásico es un radionúclido.
3. La composición para el uso de la reivindicación 2, en donde dicha composición contiene de aproximadamente 30 Gy a aproximadamente 100 Gy de radiactividad.
4. La composición para el uso de la reivindicación 1, en donde dicho agente anti-neoplásico es un fármaco quimioterapéutico.
5. La composición para el uso de la reivindicación 4, en donde dicho fármaco quimioterapéutico tiene un peso molecular de más de aproximadamente 400 Daltons.
6. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 4 y 5, en donde dicha composición contiene como máximo aproximadamente 1 mg de dicho fármaco quimioterapéutico.
7. La composición para el uso de la reivindicación 1, en donde dicho agente anti-neoplásico es un ácido nucleico funcional o un polinucleótido que codifica un ácido nucleico funcional.
8. La composición para el uso de la reivindicación 7, en donde dicho ácido nucleico funcional inhibe un gen que promueve la proliferación de células tumorales, la angiogénesis o la resistencia a la quimioterapia y/o que inhibe la apoptosis o la detención del ciclo celular.
9. La composición para el uso de la reivindicación 7, en donde dicho ácido nucleico funcional se selecciona de ARNip, miARN, ARNhc, ARNlinc, ARN antisentido, o ribozima.
10. La composición para el uso de la reivindicación 1, en donde dicho agente anti-neoplásico es un polinucleótido que codifica un gen que promueve la apoptosis.
11. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde cada minicélula de dicha pluralidad comprende un ligando que tiene una especificidad por un receptor de superficie celular de mamífero no fagocítico.
12. La composición para el uso de la reivindicación 11, en donde dicho receptor es un antígeno de una célula tumoral.
13. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde dicha composición contiene menos de aproximadamente 10 EU de endotoxina libre.
14. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en donde dicha composición contiene como máximo 1 célula bacteriana parental por 10^8 minicélulas.
15. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en donde dicho tumor cerebral se selecciona del grupo que consiste en glioblastoma, tumor astrocítico, tumor oligodendroglioma, ependimoma, craneofaringioma, tumor pituitario, linfoma cerebral primario, tumor de la glándula pineal, tumor primario cerebral de células germinales, y combinaciones de los mismos.
16. La composición para el uso de la reivindicación 15, en donde dicho tumor cerebral es un tumor cerebral metastásico.

Figura 1

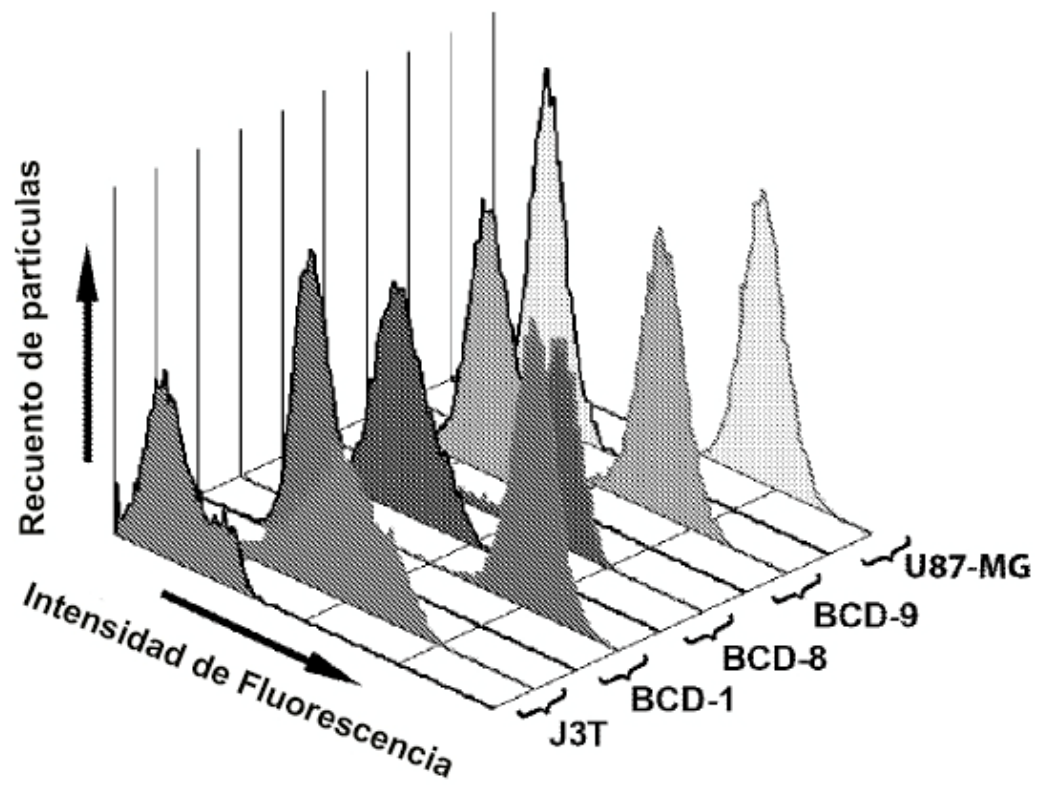


Figura 2

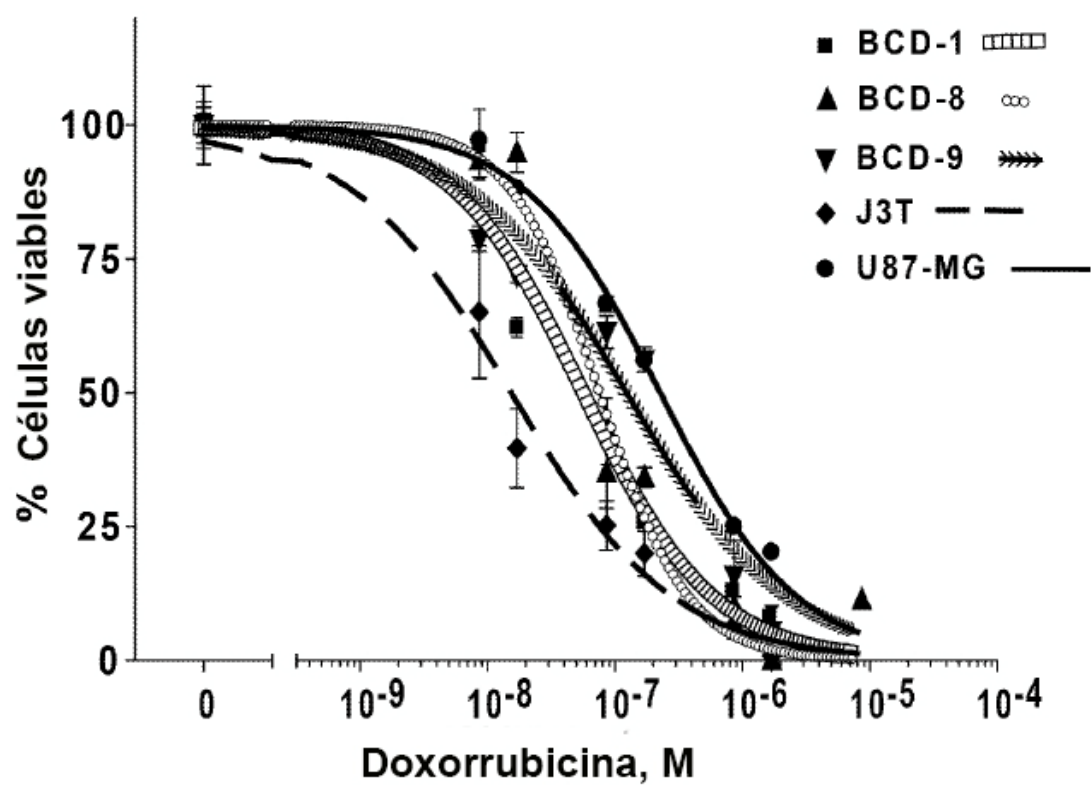


Figura 3

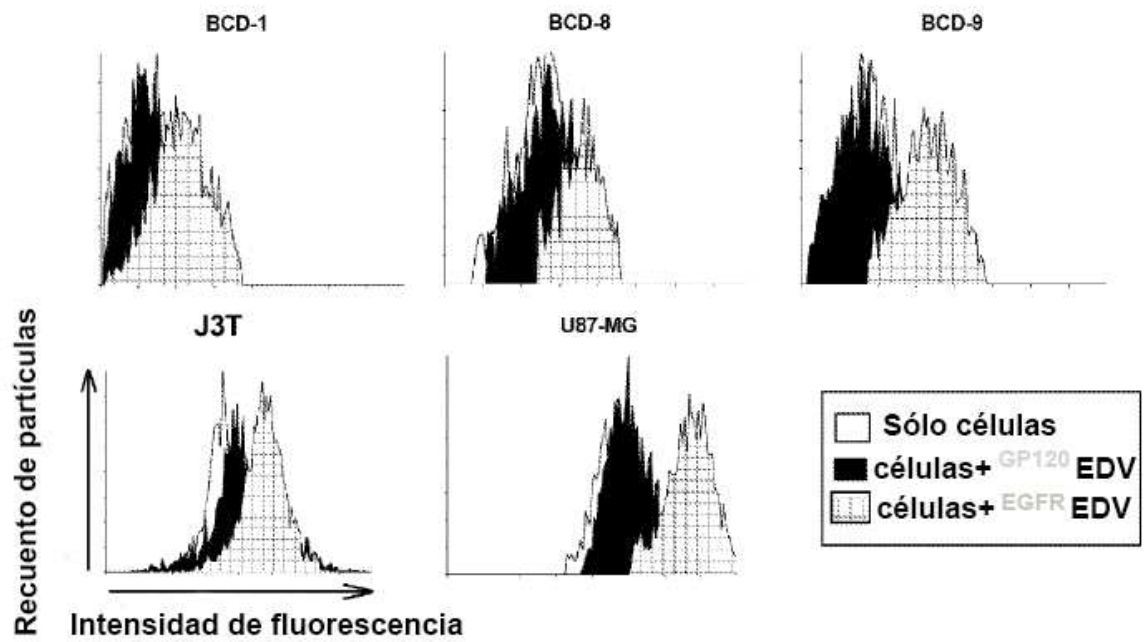


Figura 4

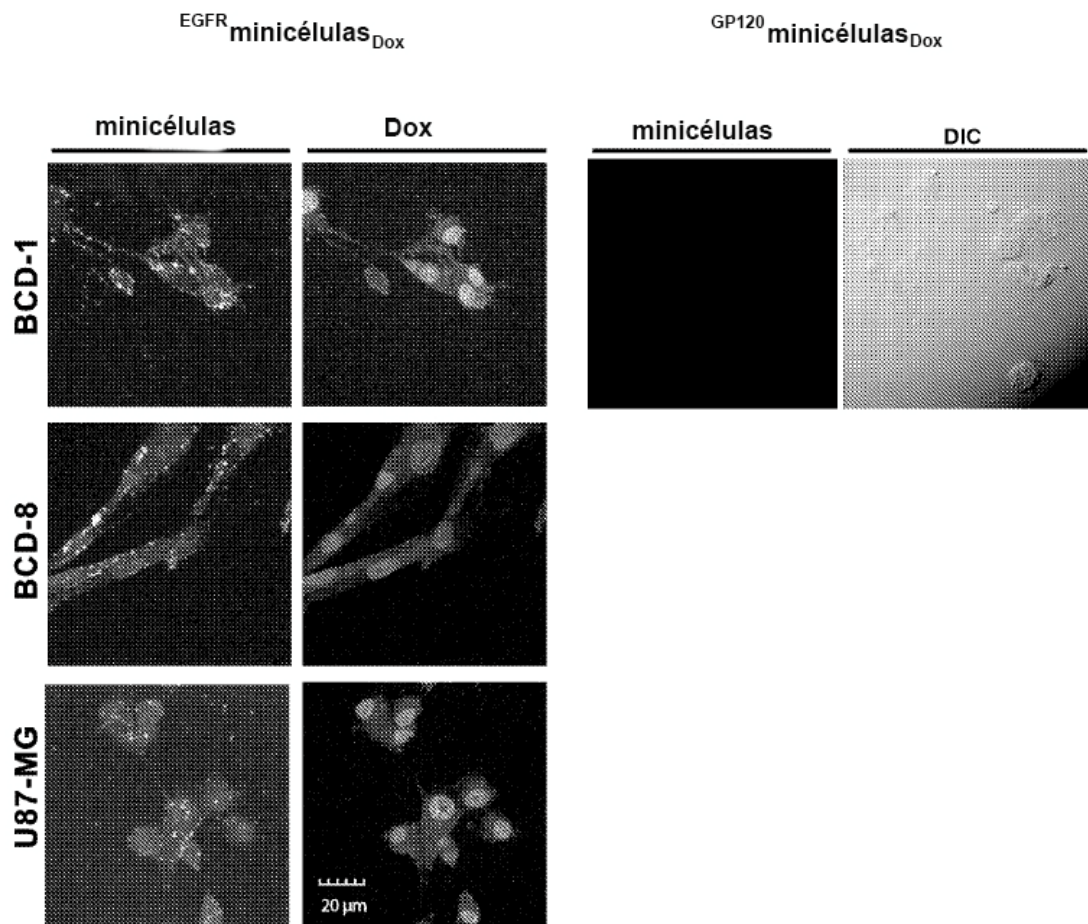


Figura 5

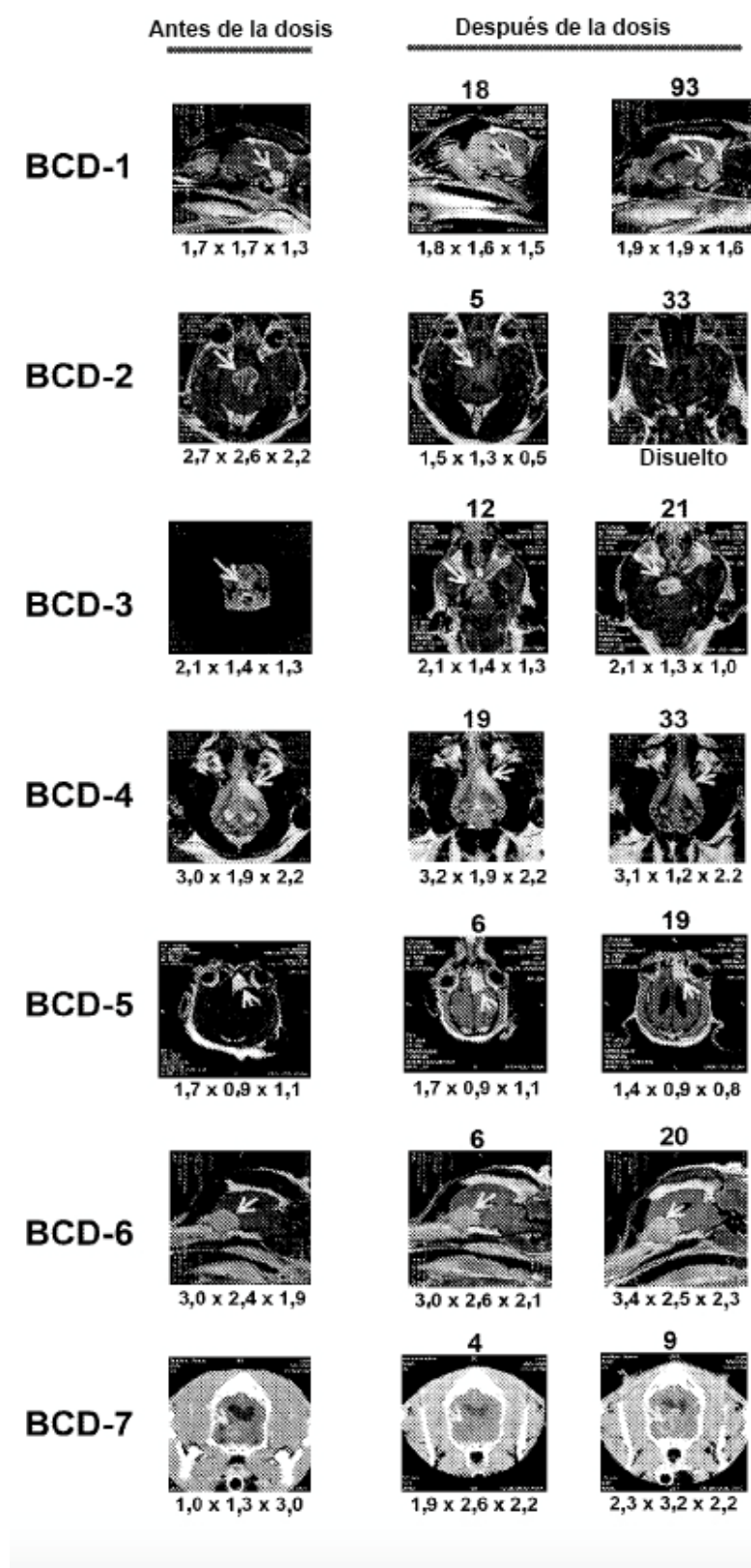


Figura 6

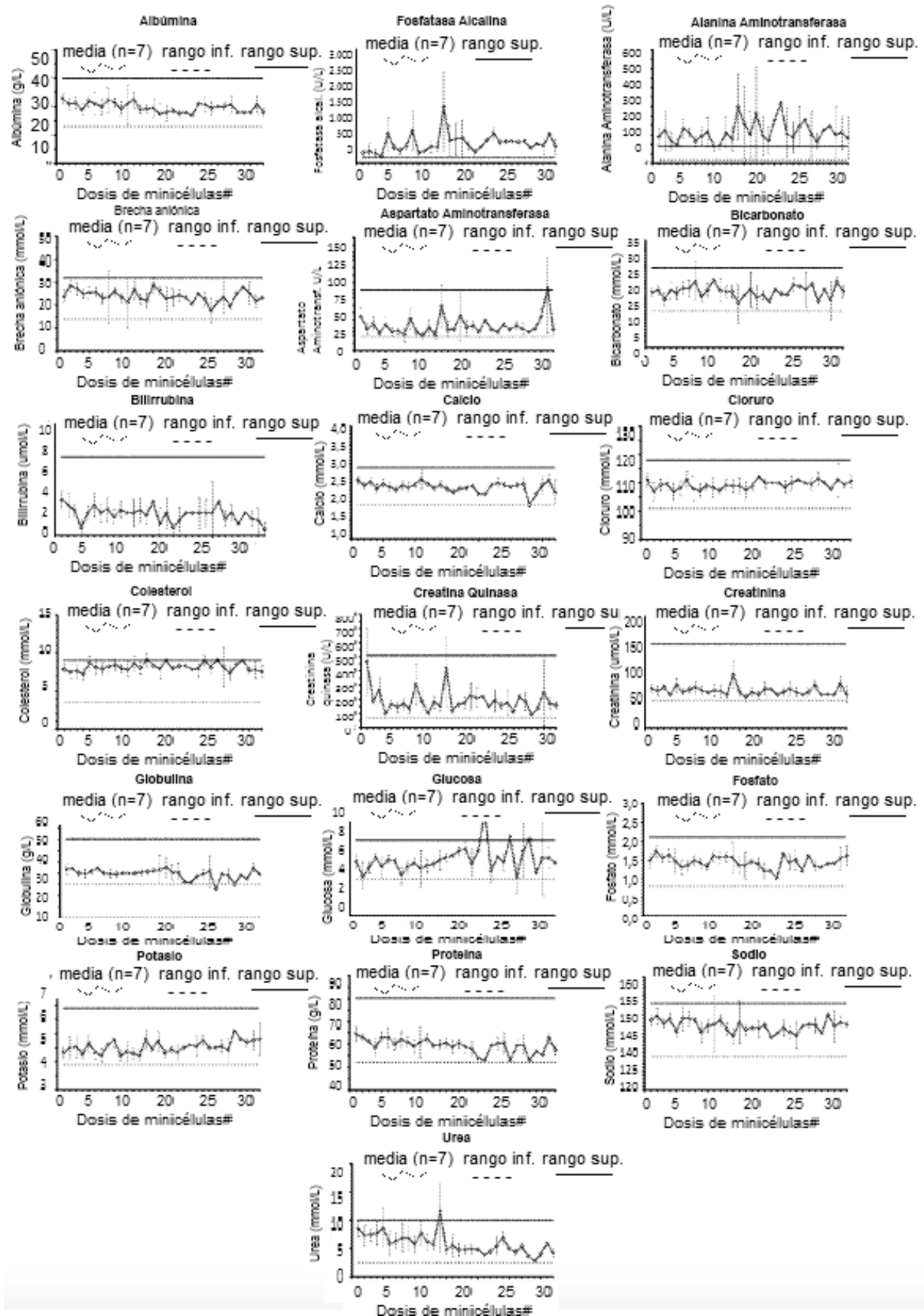


Figura 7

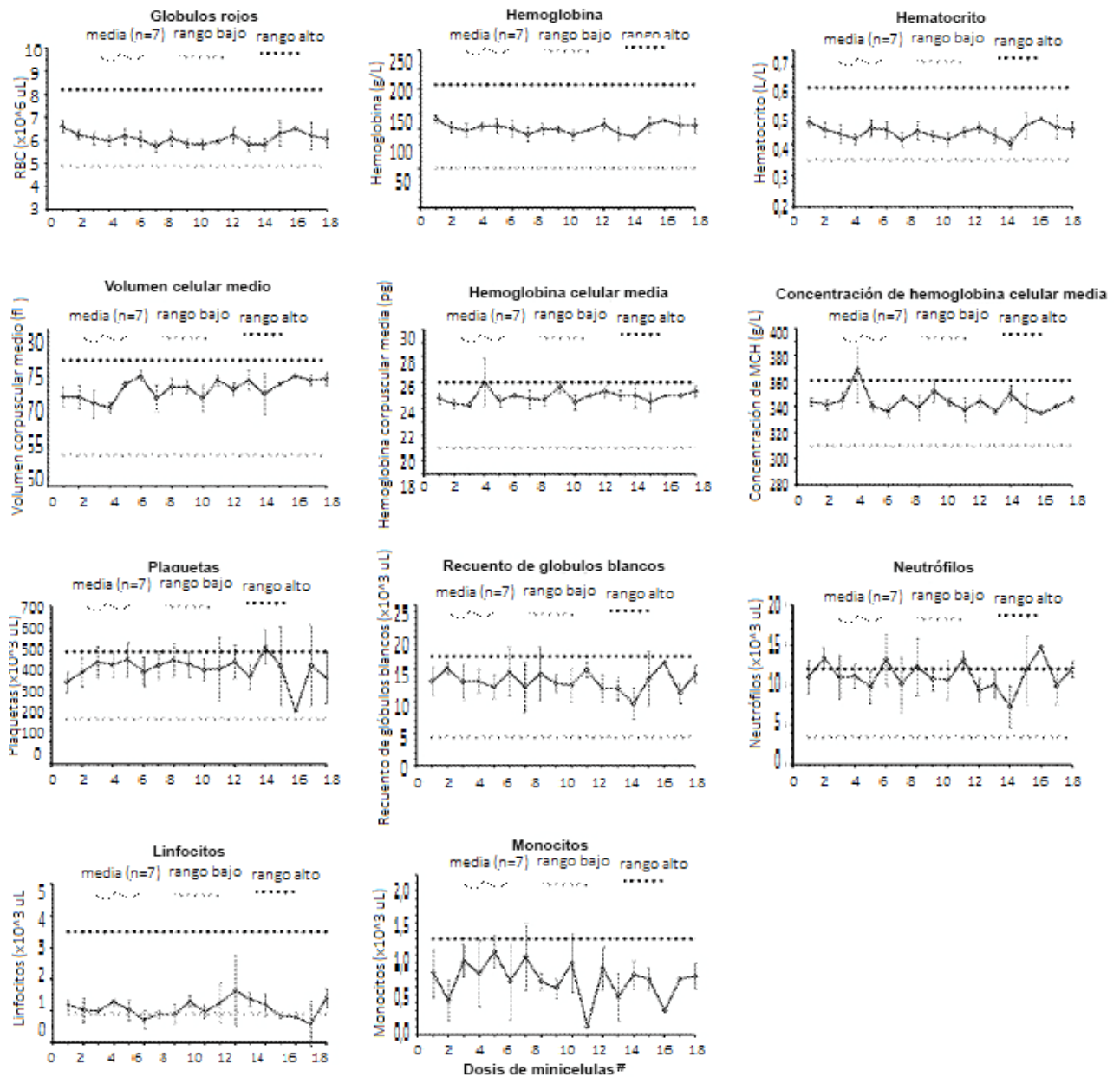


Figura 8

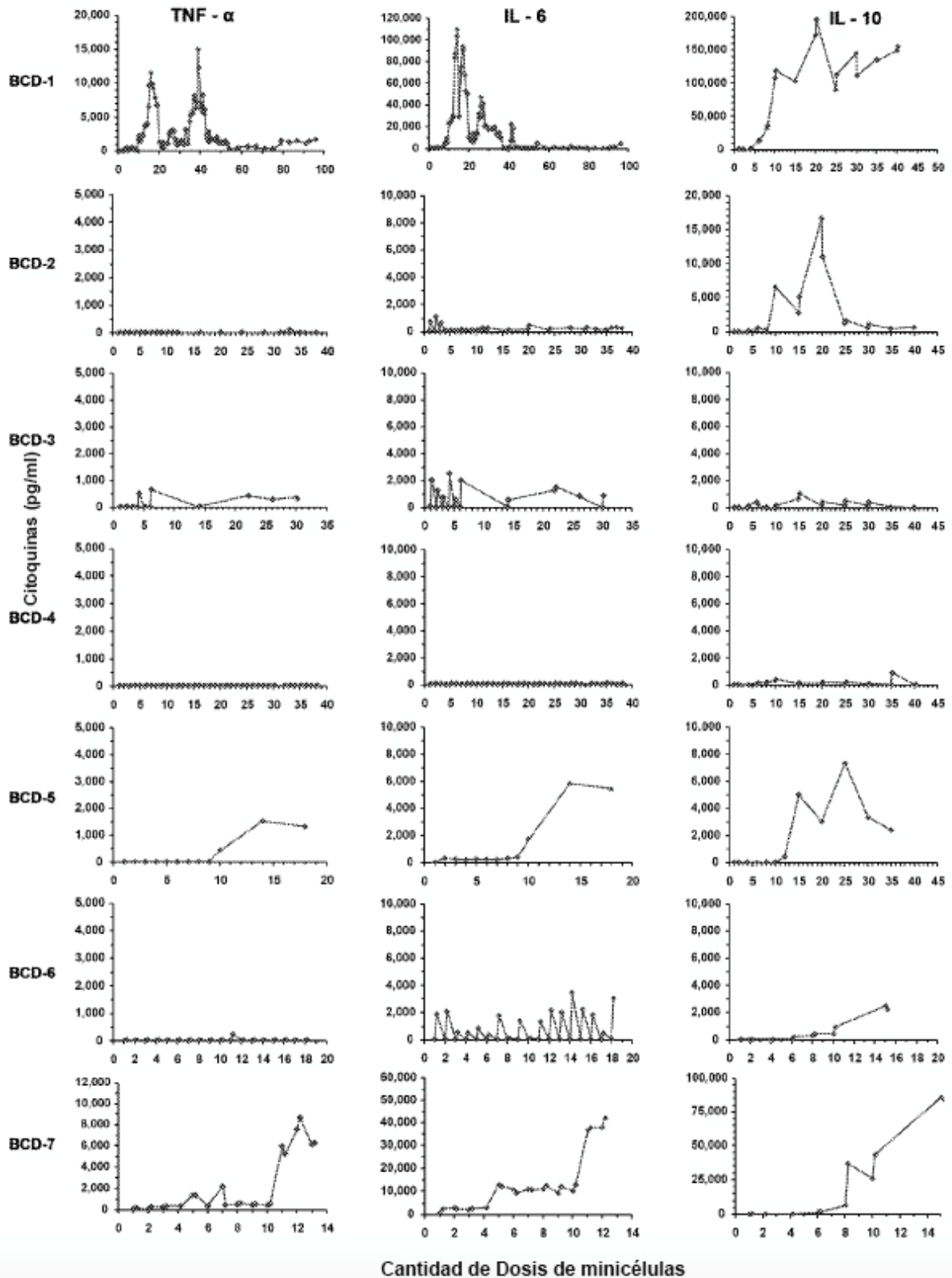


Figura 9

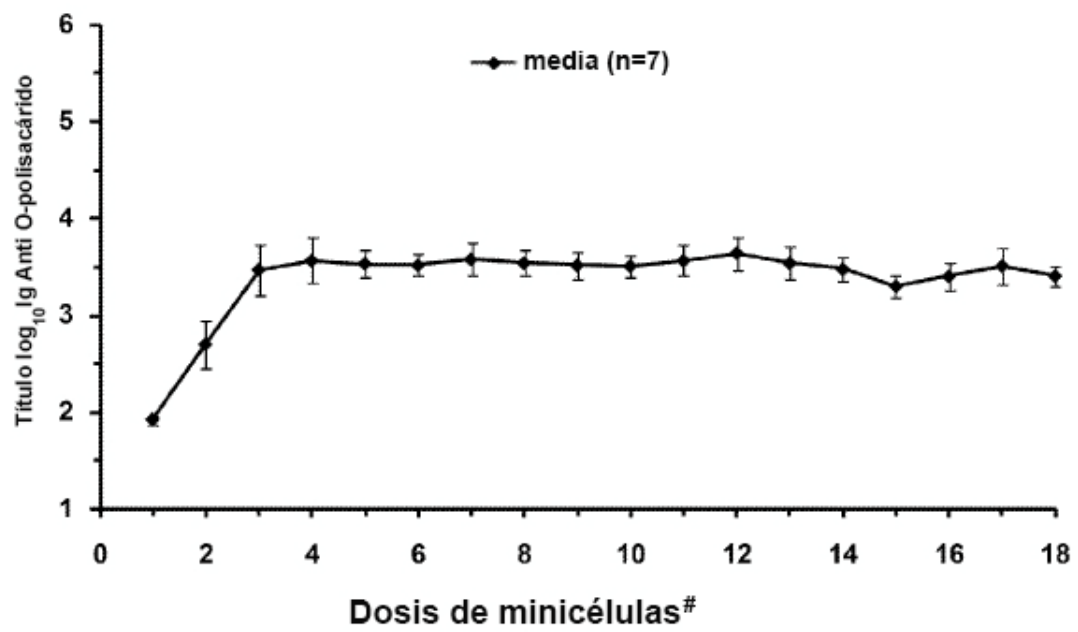


Figura 10

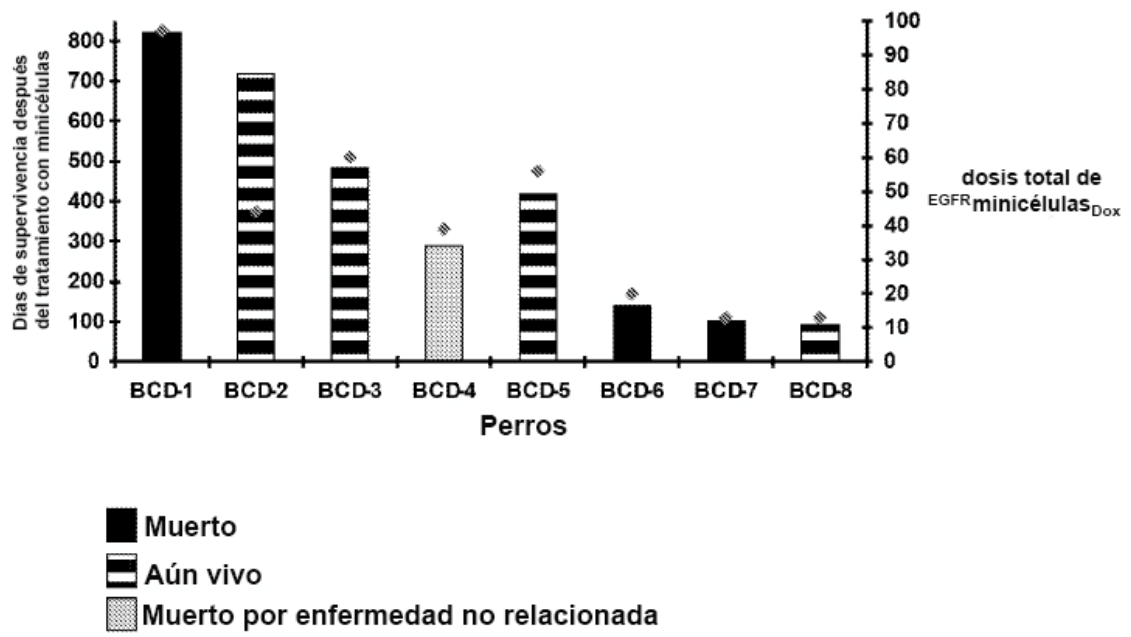


Figura 11

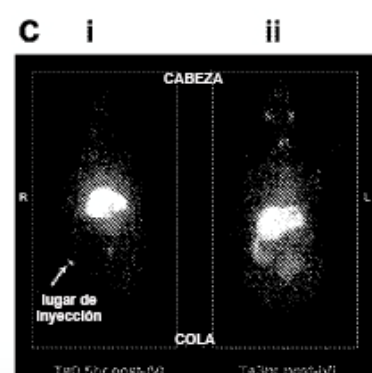
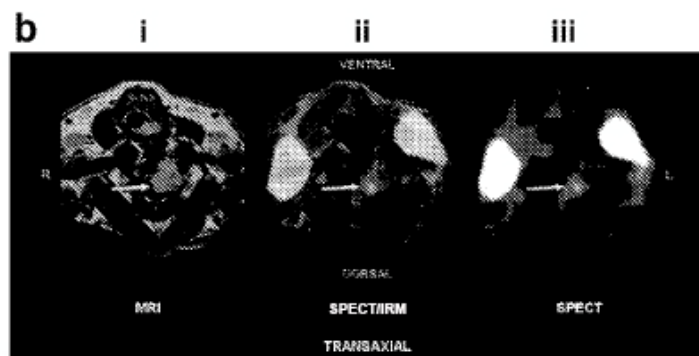
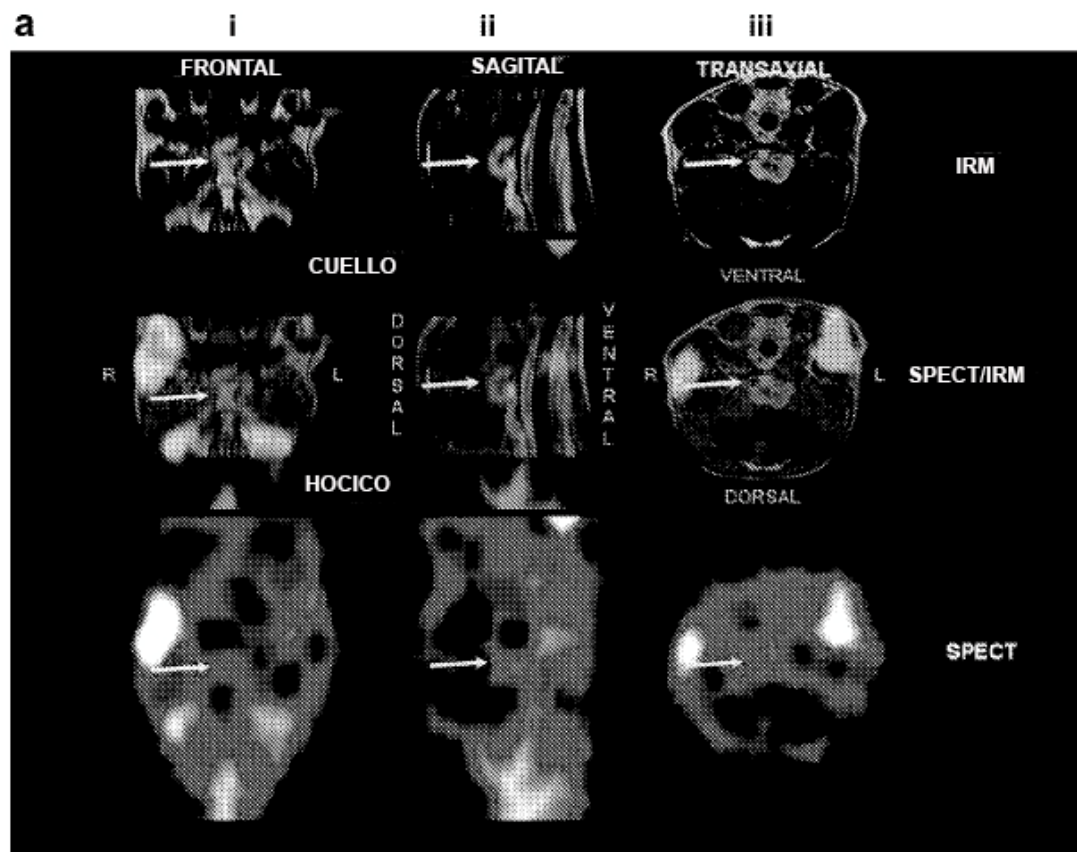


Figura 12

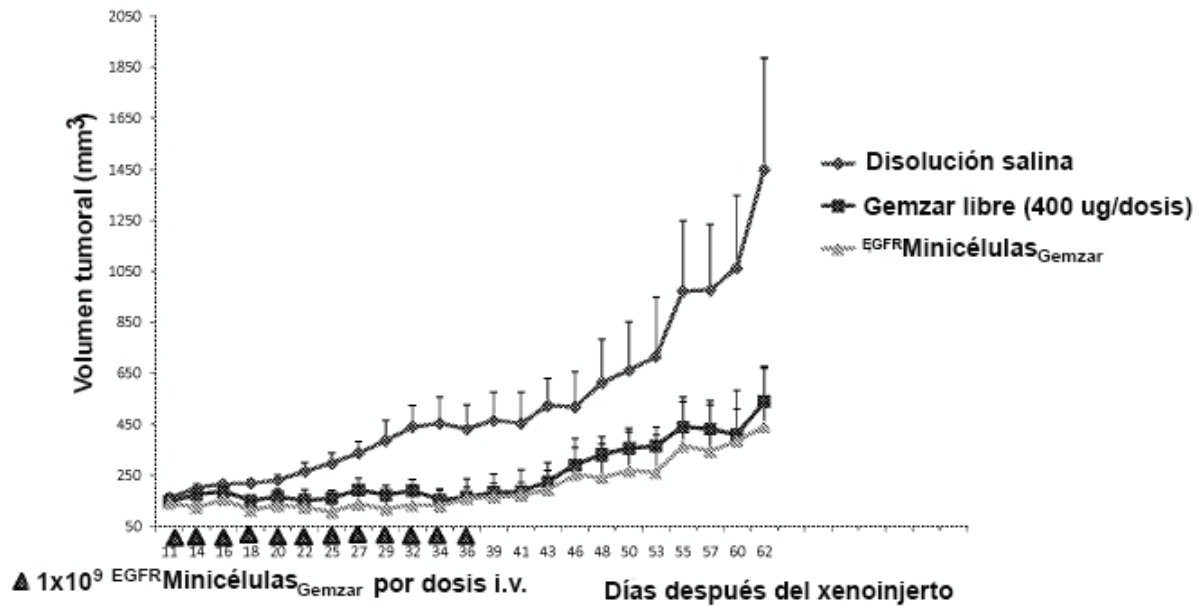


Figura 13

