



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej
Polskiej

(96) Data i numer zgłoszenia patentu europejskiego:
25.08.2005 11171410.1

(97) O udzieleniu patentu europejskiego ogłoszono:
**28.01.2015 Europejski Biuletyn Patentowy 2015/05
EP 2386640 B1**

(13) **T3**

(51) Int.Cl.

A61K 47/48 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

(54) Tytuł wynalazku:

**DOSTARCZANIE FUNKCJONALNYCH KWASÓW NUKLEINOWYCH DO KOMÓREK SSACZYCH ZA
POŚREDNICTWEM NIENARUSZONYCH MINIKOMÓREK POCHODZENIA BAKTERYJNEGO**

(30) Pierwszeństwo:
26.08.2004 US 604433 P

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
16.11.2011 w Europejskim Biuletynie Patentowym nr 2011/46

(45) O złożeniu tłumaczenia patentu ogłoszono:
31.08.2015 Wiadomości Urzędu Patentowego 2015/08

(73) Uprawniony z patentu:
EnGeneIC Molecular Delivery Pty Ltd, Lane Cove West, AU

(72) Twórca(y) wynalazku:
**HIMANSHU BRAHMBHATT, Sydney, AU
JENNIFER MACDIARMID, Sydney, AU**

(74) Pełnomocnik:
**rzecz. pat. Katarzyna Rudnicka
SULIMA-GRABOWSKA-SIERZPUTOWSKA
BIURO PATENTÓW I ZNAKÓW TOWAROWYCH SP.J.
skr. poczt. 6
00-956 Warszawa 10**

PL/EP 2386640 T3

Uwaga:

W ciągu dziewięciu miesięcy od publikacji informacji o udzieleniu patentu europejskiego, każda osoba może wnieść do Europejskiego Urzędu Patentowego sprzeciw dotyczący udzielonego patentu europejskiego. Sprzeciw wnosi się w formie uzasadnionego na piśmie oświadczenia. Uważa się go za wniesiony dopiero z chwilą wniesienia opłaty za sprzeciw (Art. 99 (1) Konwencji o udzielaniu patentów europejskich).

Opis

TŁO WYNALAZKU

[0001] Wynalazek dotyczy wysiłków podjętych w celu skutecznego dostarczania funkcjonalnych kwasów nukleinowych do komórek ssaczych. Dokładniej, wynalazek dotyczy stosowania bakteryjnych wektorów — minikomórek — do dostarczania funkcjonalnych kwasów nukleinowych do komórek ssaczych. Wynalazek ma określone zastosowanie przy eliminowaniu lekooporności, szczególnie w kontekście terapii raka i AIDS, do stymulowania apoptozy i do przeciwdziałania nowotworzeniu w komórkach docelowych.

[0002] Najnowsze osiągnięcia zwróciły uwagę na różne techniki wprowadzania funkcjonalnych kwasów nukleinowych do komórek. Na przykład, oparte na liposomach sposoby transfekcji mogą dostarczać wytworzone egzogenne kwasy nukleinowe. Takie egzogenne podejście ma jednak wadę — powoduje jedynie przejściową inhibicję obiektu docelowego. Ponadto liposomy są niestabilne w warunkach *in vivo*. W charakterze alternatywy przy dostarczaniu egzogenne wytworzonych kwasów nukleinowych, wektory mogą dostarczać plazmidy, które kodują funkcjonalne kwasy nukleinowe, które są produkowane endogenne. Wirusowe wektory obecnie użyteczne do tego celu wiążą się jednak z poważnymi obawami w zakresie bezpieczeństwa. Przykładowe problemy obejmują rekombinację z wirusami typu dzikiego, potencjał insercyjny i onkogenny, immunosupresję indukowaną wirusem, ograniczoną zdolność wektorów wirusowych do przenoszenia dużych segmentów DNA, powrót do stanu wirulencji u atenuowanych wirusów, trudności w wytwarzaniu i dystrybucji rekombinowanych wirusów, niską stabilność i reakcje niepożądane, takie jak odpowiedź zapalna, powodowane przez istniejącą odporność. Podejście, które zapobiega tym problemom będzie oferować znaczne korzyści, poprzez uczynienie dostarczania funkcjonalnych kwasów nukleinowych bezpieczniejszym i bardziej skutecznym.

[0003] Skuteczny sposób dostarczania funkcjonalnych kwasów nukleinowych byłby szczególnie korzystny do odwracania lekooporności. Komórki ssacze wykorzystują szereg procesów biologicznych do uzyskiwania oporności na leki, co stanowi główną przeszkodę w skutecznym leczeniu raka. Podobnie, lekooporność ogranicza skuteczność leczenia HIV, szczególnie w odniesieniu do wysoce aktywnej terapii przeciwretrowirusowej (HAART), która jest oparta na kombinacji nukleozydowych inhibitorów odwrotnej transkryptazy (NRTI) i inhibitorów proteazy (PI) lub nienukleozydowego inhibitora odwrotnej transkryptazy (NNRTI).

[0004] Kliniczna oporność nowotworu na chemioterapię może być wrodzona lub nabyta. Oporność wrodzona występuje w momencie zdiagnozowania względem nowotworów, które nie wykazują odpowiedzi na chemioterapię pierwszego rzutu. Nabyta oporność występuje wobec nowotworów, które mogą korzystnie odpowiedzieć na początkowe leczenie, ale wykazują oporny fenotyp w przypadku nawrotu. Takie nowotwory uzyskują oporność zarówno na wcześniej stosowane leki, jak i na nowe leki, w tym leki o różnych strukturach i mechanizmach działania. Pojęcie MDR (oporność wielolekowa) opisuje to zjawisko, w którym komórki nowotworowe uzyskują oporność krzyżową na kilka strukturalnie niepowiązanych leków po ekspozycji na pojedynczy lek.

[0005] Mechanizmy oporności wielolekowej są złożone i wieloczynnikowe, głównie ze względu na wysoki poziom niestabilności genomowej i mutacje w komórkach rakowych.

Przykładowymi mechanizmami są inaktywacja leku, wypychanie leku przez pompy błony komórkowej, zmniejszony napływ leku, mutacje obiektów docelowych leku i niepowodzenie w inicjowaniu apoptozy (Bredel, 2001; Chen et al., 2001; White i McCubrey, 2001; Sun et al., 2001).

5 **[0006]** Wypychanie leku jest szczególnie powszechne, i może być skutkiem nadekspresji białek powiązanych z błoną, które pompują leki ze środowiska wewnątrzkomórkowego do pozakomórkowego. Takie pompy należą często do nadrodziny transporterów z kasetą wiążącą ATP (ABC) (Doige et al., 1993). P-glikoproteina (Pgp) to jeden z takich przykładów, i jest głównym czynnikiem przyczyniającym się do MDR w szeregu komórek rakowych
10 (Endicott et al., 1989; Litman et al., 2001). Inne przykłady obejmują białko powiązane z MDR (MRP; Cole et al., 1992), białko oporności na raka sutka (BCRP; Litman et al., 2000), i białko powiązane z opornością w płucach (LRP; większe białko krypt; Scheffer et al., 2000). Zidentyfikowano również inne białka transporterów wielolekowych w komórkach rakowych (Gottesman et al., 2002) i w patogenicznych mikroorganizmach (Van Bambeke et al., 2000).
15

[0007] Oporność na apoptozę (programowana śmierć komórki) komórek nowotworowych indukowana przez środki cytotoksyczne i promieniowanie (Sellers i Fisher, 1999) to kolejny powszechny mechanizm. Mechanizm ten często wiąże się z nadekspresją białek anty-apoptotycznych, takich jak białko 2 białaczki z komórek B (Bcl-2), Bcl-X_L, Bcl-W, A1/Bf11, Mcl-1 i mutacjami w białku p53. Chociaż dokładne zrozumienie tego, jak białka typu Bcl-2 wywierają swoje działanie anty-apoptotyczne pozostaje nieuchwytnie, białka są nadekspresjonowane w wielu nowotworach, w tym w nowotworach jelita grubego, gruczołu krokowego i w rakach sutka (Hanada, et al., 1995; Bakhshi et al., 1985; Wang et al., 1996).
20 Podwyższona ekspresja czynnika transkrypcyjnego, czynnika jądrowego kappa B (NF-κB) również stanowi główny mechanizm nabywania oporności na chemioterapię przez komórki nowotworowe (Wang et al., 1999).
25

[0008] Zidentyfikowano leki przeciwdziałające MDR, takie jak leki, które blokują działanie P-glikoproteiny (List et al., 1993; Miller et al., 1991; Wishart et al., 1992). Wiele takich leków było jednak nieskutecznych w badaniach klinicznych, ponieważ wiązały się do osocza pacjentów, nie docierały do miejsca przeznaczenia (Ayesh et al., 1996a; Broxterman et al., 1987; Lehnert et al., 1996) i były toksyczne dla normalnych komórek. Podejmowano również próby stosowania funkcjonalnych kwasów nukleinowych do przeciwdziałania MDR. Mimo tego, jak odnotowano powyżej, istniejące wektory do tego celu były niestabilne lub toksyczne, lub stwarzały inne poważne problemy związane z bezpieczeństwem,
30 które utrudniają ich stosowanie u ludzi (Sioud, 2004).
35

[0009] WO 02/17852 A ujawnia kompozycję farmaceutyczną zawierającą antysensowny nukleotyd nakierowany na bcl-2 i farmaceutycznie dopuszczalny nośnik.

[0010] US 2003/203481 A1 ujawnia minikomórki pochodzenia bakteryjnego do dostarczania związków do komórek ssaczy i sugeruje stosowanie minikomórek do leczenia raka, w tym dostarczanie antysensownych oligonukleotydów, rybozymów lub leków drobnocząsteczkowych, i sugeruje dodatkowo stosowanie ugrupowania do nakierowywania, dla
40 swojego dostarczania do komórek docelowych.

[0011] WO 03/033519 A ujawnia minikomórki pochodzenia bakteryjnego do dostarczania związków do komórek ssaczy.

45 **[0012]** Stosownie do tego, ciągle istnieje zapotrzebowanie na narzędzia i sposoby dostar-

czania funkcjonalnych kwasów nukleinowych, które zmniejszają lekooporność, stymulują apoptozę, i przeciwdziałają nowotworzeniu w komórkach docelowych.

KRÓTKI OPIS WYNAŁAZKU

5 [0013] Aby zaspokoić te i inne potrzeby, wynalazek zapewnia, w jednym aspekcie, kompozycję zawierającą (a) nienaruszoną minikomórkę pochodzenia bakteryjnego, która zawiera funkcjonalną cząsteczkę kwasu nukleinowego lub plazmid zawierający segment, który koduje funkcjonalną cząsteczkę kwasu nukleinowego, minikomórkę zawierającą dodatkowo dwuswoisty ligand, dwuswoisty ligand mający swoistość zarówno dla składnika powierzchniowego na minikomórce, jak i składnika powierzchniowego na nefagocytu-
10 jącej komórce ssaczey; i (b) do niej farmaceutycznie dopuszczalny nośnik, przy czym funkcjonalna cząsteczka kwasu nukleinowego jest nakierowana na gen lub transkrypt białka, które przyczyniają się do oporności na chemoterapeutyk.

15 [0014] W kolejnym aspekcie wynalazek zapewnia nienaruszoną minikomórkę pochodzenia bakteryjnego zawierającą funkcjonalną cząsteczkę kwasu nukleinowego lub plazmid zawierający segment, który koduje funkcjonalną cząsteczkę kwasu nukleinowego, przy czym funkcjonalna cząsteczka kwasu nukleinowego jest nakierowana na gen lub transkrypt białka, który stymuluje oporność na chemoterapeutyk, minikomórka zawierająca dodatkowo dwuswoisty ligand, dwuswoisty ligand mający swoistość zarówno dla składnika powierzchniowego na minikomórce, jak i składnika powierzchniowego na nefagocytu-
20 jącej komórce ssaczey; do stosowania jako lek.

25 [0015] W dalszym aspekcie, wynalazek zapewnia nienaruszoną minikomórkę pochodzenia bakteryjnego zawierającą funkcjonalną cząsteczkę kwasu nukleinowego lub plazmid zawierający segment, który koduje funkcjonalną cząsteczkę kwasu nukleinowego, przy czym funkcjonalna cząsteczka kwasu nukleinowego jest nakierowana na gen lub transkrypt białka, który stymuluje oporność na chemoterapeutyk, minikomórka zawierająca dodatkowo dwuswoisty ligand, dwuswoisty ligand mający swoistość zarówno dla składnika powierzchniowego na minikomórce, jak i składnika powierzchniowego na nefagocytu-
30 jącej komórce ssaczey; do stosowania w leczeniu choroby odpornej na chemoterapeutyk, przy czym nienaruszona minikomórka jest podawana równocześnie lub kolejno z chemoterapeutykiem, aby umożliwić funkcjonalnemu kwasowi nukleinowemu zmniejszenie oporności na chemoterapeutyk.

35 [0016] W kolejnym aspekcie wynalazek zapewnia chemoterapeutyk do stosowania w leczeniu lekoopornego nowotworu złośliwego, przy czym nienaruszona minikomórka pochodzenia bakteryjnego zawierająca funkcjonalną cząsteczkę kwasu nukleinowego lub plazmid zawierający segment, który koduje funkcjonalną cząsteczkę kwasu nukleinowego, przy czym funkcjonalna cząsteczka kwasu nukleinowego jest nakierowana na gen lub transkrypt białka, który stymuluje oporność na chemoterapeutyk, minikomórka zawierająca dodatkowo dwuswoisty ligand, dwuswoisty ligand mający swoistość zarówno dla składnika powierzchniowego na minikomórce i składnika powierzchniowego na nefagocytu-
40 jącej komórce ssaczey, jest podawana równocześnie lub kolejno z chemoterapeutykiem, aby umożliwić funkcjonalnemu kwasowi nukleinowemu zmniejszenie oporności na chemoterapeutyk.

45 [0017] Wynalazek zapewnia sposób dostarczania funkcjonalnego kwasu nukleinowego, obejmujący (a) zapewnianie nienaruszonej minikomórki, która zawiera funkcjonalną cząsteczkę kwasu nukleinowego lub zawiera plazmid zawierający segment, który koduje funkcjonalną cząsteczkę kwasu nukleinowego, a następnie (b) doprowadzanie do kontaktu

minikomórki z docelową komórką ssaczą, tak, że komórka ssacza pochłania minikomórkę. Po pochłonięciu minikomórki, funkcjonalna cząsteczka kwasu nukleinowego jest uwalniana do cytoplazmy, transportowana do jądra i ekspymowana przy udziale komórki docelowej. Wyżej wspomniany plazmid może również zawierać element regulatorowy, taki jak promotor, terminator, enhancer lub sekwencję sygnałową, która jest funkcjonalnie połączona z segmentem, który koduje funkcjonalną cząsteczkę kwasu nukleinowego. Szczególnie korzystnym jest, aby plazmid zawierał promotor, który jest zależny od polimerazy RNA (pol) II lub pol III, taki jak ludzkie promotory polimerazy RNA III 7SK, H1 i U6. Ponadto, plazmid może zawierać element reporterowy, taki jak odcinek kwasu nukleinowego kodujący białko zielonej fluorescencji. Kontakt pomiędzy minikomórką i komórką ssaczą może zachodzić w warunkach *in vitro* lub *in vivo*.

[0018] W odniesieniu do wynalazku, kategoria „funkcjonalne kwasy nukleinowe” obejmuje: cząsteczki siRNA, w tym cząsteczki shRNA; cząsteczki miRNA, cząsteczki antysensowne i cząsteczki rybozymów. Korzystnie, funkcjonalna cząsteczka kwasu nukleinowego jest nakierowana na gen lub transkrypt białka, który stymuluje lekooporność, inhibuje apoptozę lub przyczynia się do fenotypu nowotworowego. Szczególnie użyteczne obiekty docelowe, które przyczyniają się do lekooporności obejmują transportery mające kasetę wiążącą ATP, takie jak P-glikoproteina, MDR-2, MDR-3, BCRP, APT11a i LRP. Szczególnie użyteczne obiekty docelowe, które przyczyniają się do oporności na apoptozę obejmują Bcl-2 (białaczka z komórek B/chłoniak), Bcl-X_L, A1/Bfl 1, kinazę adhezyjno-ogniskową i zmutowane białko p53. Inne użyteczne obiekty docelowe to białka onkogenne i zmutowane białka supresorowe nowotworów.

[0019] Wynalazek zapewnia ponadto sposób przewycięzania lekooporności lub oporności na apoptozę i leczenie nowotworu złośliwego u danego osobnika. Sposób obejmuje (a) zapewnianie nienaruszonej minikomórki, która zawiera funkcjonalną cząsteczkę kwasu nukleinowego lub plazmid zawierający segment, który koduje funkcjonalną cząsteczkę kwasu nukleinowego, przy czym funkcjonalna cząsteczka kwasu nukleinowego jest nakierowana na transkrypt białka, który stymuluje lekooporność, (b) doprowadzanie do kontaktu minikomórki z docelową komórką ssaczą, tak, że komórka ssacza pochłania minikomórkę i (c) dostarczanie chemoterapeutyku do docelowej komórki ssaczej. Korzystnie, etap (c) prowadzi się po etapach (a) i (b), aby umożliwić funkcjonalnemu kwasowi nukleinowemu zmniejszenie oporności na lek przed podaniem leku. Lek można dostarczać dowolnymi konwencjonalnymi sposobami, ale korzystnie jest on dostarczany za pośrednictwem nienaruszonej minikomórki.

[0020] Jak wskazano powyżej, dwuswoisty ligand ma swoistość zarówno dla składnika powierzchniowego na minikomórce, jak i składnika powierzchniowego na komórce ssaczej, takiego jak receptor. W wyniku, ligand powoduje wiązanie minikomórki do komórki ssaczej, minikomórka jest pochłaniana przez komórkę ssaczą, a zawartość minikomórki jest uwalniana do cytoplazmy komórki ssaczej. W innych postaciach wykonania wynalazku dochodzi do kontaktu minikomórki z docelową komórką ssaczą, która jest kompetentna pod kątem fagocytozy lub endocytozy. Stosowanie dwuswoistych ligandów jest opcjonalne, gdy komórka docelowa jest kompetentna pod kątem fagocytozy.

[0021] W kompozycji według wynalazku funkcjonalna cząsteczka kwasu nukleinowego może oznaczać cząsteczkę shRNA lub miRNA lub innego siRNA, cząsteczkę antysensowną, lub cząsteczkę rybozymu. Korzystnie, funkcjonalna cząsteczka kwasu nukleinowego jest nakierowana na gen lub transkrypt białka, który stymuluje lekooporność, inhibuje

apoptozę lub przyczynia się do fenotypu nowotworowego. Szczególnie użyteczne obiekty docelowe, które przyczyniają się do lekooporności obejmują transportery mające kasetę wiążącą ATP, takie jak P-glikoproteina, MDR-2 i MDR-3. Szczególnie użyteczne obiekty docelowe, które przyczyniają się do oporności na apoptozę obejmują Bcl-2 (białaczka z komórek B/chłoniak), Bcl-X_L, A1/Bfl 1, kinazę adhezyjno-ogniskową i zmutowane białko p53. Inne użyteczne obiekty docelowe to białka onkogenne i zmutowane białka supresorowe nowotworów. Plazmid może również zawierać element regulatorowy, taki jak promotor, terminator, enhancer lub sekwencję sygnałową, która jest funkcjonalnie połączona z segmentem, który koduje funkcjonalną cząsteczkę kwasu nukleinowego. Ponadto plazmid może zawierać element reporterowy. Funkcjonalna cząsteczką kwasu nukleinowego może zawierać liczne sekwencje do interferencji RNA, jak miRNA lub shRNA, i mogą one występować w jednym cistronie lub być eksprymowane z odrębnych promotorów, dla umożliwienia uzyskania równoczesnego efektu knockdown wobec wielu elementów docelowych powiązanych z lekoopornością. W korzystnych postaciach wykonania kompozycja zawiera mniej niż jedną zanieczyszczającą komórkę macierzystą na 10⁷, 10⁸, 10⁹, 10¹⁰, 10¹¹ lub 10¹² minikomórek.

[0022] Wynalazek zapewne dodatkowo stosowanie nienaruszonych minikomórek w otrzymywaniu leku do stosowania w sposobie przewycięzania lekooporności lub stymulowania apoptozy przez podawanie leku do komórki, tkanki lub narządu. W leku minikomórki zawierają funkcjonalną cząsteczkę kwasu nukleinowego lub plazmid kodujący funkcjonalną cząsteczkę kwasu nukleinowego, przy czym funkcjonalna cząsteczką kwasu nukleinowego jest nakierowana na transkrypt białka, który stymuluje lekooporność lub inhibuje apoptozę. Chorobą leczoną w tym kontekście może być, na przykład, rak lub choroba nabyta, taka jak AIDS i gruźlica.

[0023] Wynalazek zapewnia istotną poprawę względem konwencjonalnych sposobów i formułacji do dostarczania funkcjonalnych kwasów nukleinowych w kontekście raka i HIV przez (i) zapewnianie bezpiecznych i stabilnych zaródek do dostarczania funkcjonalnych kwasów nukleinowych, (ii) przeciwdziałanie głównym mechanizmom lekooporności w objętych chorobą komórkach, (iii) zmniejszanie toksycznych działań niepożądanych powiązanych z przewycięzaniem lekooporności i (iv) zapewnianie ukierunkowanych zaródek, z upakowanym lekiem, do celów leczenia choroby.

KRÓTKI OPIS RYSUNKÓW

[0024]

Figura 1 pokazuje wpływ różnych zabiegów na żywotność linii komórkowej ludzkiego raka okrężnicy Caco-2. Zabiegi pokazano na osi x (minikomórki oznaczono jako „M”), a odsetek żywotności komórek pokazano za pomocą słupków. Każdy słupek oznacza średnią z sześciu niezależnych pomiarów, i pokazano standardowe odchylenie od średniej.

Figura 2 pokazuje regresję heteroprzeszczepów ludzkiego raka okrężnicy (Caco-2) u myszy rasy nude (11 myszy na grupę) po podwójnym zabiegu za pomocą (1) ukierunkowanych rekombinowanych minikomórek niosących plazmidy kodujące shRNA (anty-bcl2 lub anty-Mdr1) i (2) ukierunkowanych minikomórek z upakowanym chemoterapeutycznym — irynotekaniem. Dwuswoiste przeciwciała użyte do nakierowywania na komórki raka okrężnicy niosło swoistość przeciwko antygenowi O z *S. typhimurium* na jednym ramieniu i ludzkiemu receptorowi naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR) na drugim ramieniu. Ukierunkowane re-

kombinowane minikomórki wstrzykiwano dożylnie w dniach 9 i 23, a ukierunkowane minikomórki z upakowanym irynotekaniem podawano dożylnie w dniach 15, 18, 29 i 32. Inne zabiegi — kontrole podawane dożylnie obejmowały: Grupa 1 — jedynie nowotwór, Grupa 2 — wolny irynotekan, Grupa 3 — $EGFR$ minikomórki_{Iryno}, Grupa 4 — $EGFR$ minikomórki_{shRNA-MDR-1}, Grupa 5 — $EGFP$ minikomórki_{shRNA-bcl-2} i Grupa 6 — $EGFR$ minikomórki_{shRNA-MDR-1}, a następnie wolny Iryno. Objętość nowotworu pokazano na osi y. SEM pokazano dla każdego pomiaru.

Figura 3 pokazuje regresję heteroprzeszczepów ludzkiego raka okrężnicy (Caco-2) u myszy rasy nude (11 myszy na grupę) po podwójnym zabiegu za pomocą (1) ukierunkowanych rekombinowanych minikomórek niosących plazmidy kodujące shRNA (anty-bcl2 lub anty-Mdr1) i (2) ukierunkowanych minikomórek z upakowanym chemoterapeutykem — 5-FU. Dwuswoiste przeciwciąło użyte do nakierowywania na komórki raka okrężnicy niosło swoistość przeciwko antygenowi O z *S. typhimurium* na jednym ramieniu i ludzkiemu receptorowi naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR) na drugim ramieniu. Ukierunkowane rekombinowane minikomórki wstrzykiwano dożylnie w dniach 9 i 23, a ukierunkowane minikomórki z upakowanym 5-FU podawano dożylnie w dniach 15, 18, 29 i 32. Inne zabiegi — kontrole podawane dożylnie obejmowały: **G1** — jedynie nowotwór, **G2 (kontrola)**, wolny 5-FU (5×10^4 ng/g masy ciała myszy $\sim 1 \times 10^6$ ng na mysz), **G3 (kontrola)**, $EGFR$ minikomórki_{5-FU}, **G4 (kontrola)**, $EGFR$ minikomórki_{shRNA-MDR-1}, **G5 (kontrola)**, $EGFR$ minikomórki_{shRNA-bcl-2}, **G6 (kontrola)**, $EGFR$ minikomórki_{shRNA-MDR-1}, a następnie CMV minikomórki_{5-FU}, **G7 (kontrola)**, $EGFR$ minikomórki_{shRNA-nonsense}, a następnie $EGFR$ minikomórki_{5-FU}, **G8 (kontrola)**, $EGFR$ minikomórki_{shRNA-MDR-1}, a następnie wolny 5-FU, **G9 (expt)**, $EGFR$ minikomórki_{shRNA-MDR-1}, a następnie $EGFR$ minikomórki_{5-FU}, i **G10 (expt)**, $EGFR$ minikomórki_{shRNA-bcl-2}, a następnie $EGFR$ minikomórki_{5-FU}. Objętość nowotworu pokazano na osi y. SEM pokazano dla każdego pomiaru.

Figura 4 pokazuje regresję heteroprzeszczepów ludzkiego raka sutka (MDA-MB-468) u myszy rasy nude (11 myszy na grupę) po podwójnym zabiegu za pomocą (1) ukierunkowanych rekombinowanych minikomórek niosących plazmidy kodujące shRNA (anty-Mdr1) i (2) ukierunkowanych minikomórek z upakowanym chemoterapeutykem — dokсорubicyną. Dwuswoiste przeciwciąło użyte do nakierowywania na komórki raka sutka niosło na jednym ramieniu swoistość przeciwko antygenowi O z *S. typhimurium* i na drugim ramieniu przeciwko ludzkiemu EGFR. Ukierunkowane rekombinowane minikomórki wstrzykiwano dożylnie w dniu 21, a ukierunkowane minikomórki z upakowaną Dox podawano dożylnie w dniach 27, 34 i 41. Zabiegi podawane dożylnie obejmowały: **G1** — jedynie nowotwór, **G2 (kontrola)**, $EGFR$ minikomórki_{Dox}, i **G3 (expt)**, $EGFR$ minikomórki_{shRNA-MDR-1}, a następnie $EGFR$ minikomórki_{Dox}. Objętość nowotworu pokazano na osi y. SEM pokazano dla każdego pomiaru.

Figura 5 pokazuje wpływ schematów dawkowania na odwrócenie lekooporności i efekt terapeutyczny. Heteroprzeszczepy ludzkiego raka okrężnicy (Caco-2) ustanawiano u myszy rasy myszy i podawano poniższe zabiegi dożylne: **G1** — jedynie nowotwór, **G2 (kontrola)**, wolny irynotekan, **G3 (expt)**, $EGFR$ minikomórki_{shRNA-MDR-1}, a następnie 96 godz. później $EGFR$ minikomórki_{Iryno}, **G4 (expt)**, $EGFR$ minikomórki_{shRNA-MDR-1}, a następnie 120 godz. później $EGFR$ minikomórki_{Iryno}, i **G5 (expt)**, $EGFR$ minikomórki_{shRNA-MDR-1} a następnie 144 godz. później $EGFR$ minikomórki_{Iryno}.

Dwuswoiste przeciwciało użyte do nakierowywania na komórki raka sutka nosło swoistość przeciwko antygenowi O z *S. typhimurium* na jednym ramieniu i ludzkiemu EGFR na drugim ramieniu. Objętość nowotworu pokazano na osi y. SEM pokazano dla każdego pomiaru.

5 **Figura 6** pokazuje wpływ schematów dawkowania na odwrócenie lekooporności i efekt terapeutyczny. Heteroprzeszczepy ludzkiego raka okrężnicy (Caco-2) ustanawiano u myszy rasy myszy i podawano poniższe zabiegi dożylne: **G1** — jedynie nowotwór, **G2 (kontrola)**, wolny 5-FU, **G3 (expt)**, ^{EGFR}minikomórki_{shRNA-MDR-1}, a następnie 96 godz. później ^{EGFR}minikomórki_{5-FU}, **G4 (expt)**, ^{EGFR}minikomórki_{shRNA-MDR-1}, a następnie 120 godz. później ^{EGFR}minikomórki_{5-FU}, i **G5 (expt)**, ^{EGFR}minikomórki_{shRNA-MDR-1}, a następnie 144 godz. później ^{EGFR}minikomórki_{5-FU}. Dwuswoiste przeciwciało użyte do nakierowywania na komórki raka sutka nosło swoistość przeciwko antygenowi O z *S. typhimurium* na jednym ramieniu i ludzkiemu EGFR na drugim ramieniu. Objętość nowotworu pokazano na osi y. SEM pokazano dla każdego pomiaru.

SZCZEGÓŁOWY OPIS KORZYSTNYCH POSTACI WYKONANIA

15 **[0025]** Twórcy stwierdzili, że nienaruszone minikomórki pochodzenia bakteryjnego mogą bezpiecznie i skutecznie wprowadzać do ssaczych komórek docelowych dowolne z zakresu funkcjonalnych kwasów nukleinowych, takich jak cząsteczka siRNA, cząsteczka miRNA, rybozym lub antysensowny kwas nukleinowy. W określonym kontekście raka i zakażenia HIV, twórcy stwierdzili, że wprowadzanie funkcjonalnych kwasów nukleinowych do komórek docelowych, za pośrednictwem nienaruszonych minikomórek, może zmniejszyć lekooporność lub oporność na apoptozę w komórkach docelowych.

20 **[0026]** Twórcy również stwierdzili, że minikomórki mogą kolejno transfekować te same docelowe komórki ssacze, szczególnie w warunkach *in vivo*, i że minikomórki mogą kolejno dostarczać szereg różnych zawartości do tych samych ssaczych komórek docelowych. Stwierdzenia te są pierwszymi w kontekście jakichkolwiek makrocząsteczkowych zaróbek do dostarczania i zapewniają, po raz pierwszy, sposób do leczenia złożonych, wieloczynnikowych chorób, typu rak i HIV, w przypadku których konieczne jest dostarczanie różnych zawartości terapeutycznych do tej samej komórki przed osiągnięciem efektu terapeutycznego. Podobnie, twórcy stwierdzili, że złożony problem lekooporności powiązany z licznymi mutacjami w różnych genach można potraktować przy użyciu minikomórek, które wprowadzają wiele sekwencji RNAi do komórki gospodarza, aby przeciwdziałać wielu defektom genetycznym, i że po dostarczeniu RNAi za pośrednictwem minikomórek i zapewnieniu wystarczającego czasu na uzyskanie efektu knockdown wobec docelowych białek regulujących lekooporność, komórki rakowe uprzednio odporne na swoiste chemoterapeutyki można skutecznie leczyć minikomórkami z upakowanymi tymi samymi lekami. Jest to pierwsze zademonstrowanie w warunkach *in vivo* skutecznego leczenia raka, który jest odporny na wszelkie inne sposoby leczenia. Stężenia chemoterapeutyków, dostarczanych za pośrednictwem minikomórek, wymagane do skutecznego leczenia lekoopornych komórek rakowych okazały się być ponad 1000-krotnie niższe niż przy leczeniu wolnym lekiem. Jest to zaskakujące stwierdzenie, ponieważ wszystkie wcześniejsze sposoby odwracania lekooporności przy użyciu RNAi lub inhibitorów białek regulujących lekooporność nadal wymagały stężeń leku, które mogły powodować poważną toksyczność u ssaczego osobnika. Stąd sposoby według wynalazku, tj. regulowane przy użyciu minikomórek dostarczanie RNAi, a następnie regulowane przy użyciu minikomórek dostarczanie chemoterapeutyku,

mają potencjał skutecznego leczenia raka bez ciężkiej toksyczności.

[0027] Ponadto twórcy stwierdzili, że serotyp minikomórek można przystosowywać, do celów przewyciężenia odpowiedzi immunologicznej gospodarza przeciwko minikomórkom.

- 5 **[0028]** Poniższy opis nakreśla wynalazek powiązany z tymi stwierdzeniami, bez ograniczania wynalazku do opisanych określonych postaci wykonania, metodologii, protokołów lub odczynników. Podobnie, stosowana w opisie terminologia opisuje jedynie określone postaci wykonania i nie ogranicza zakresu wynalazku.

I. Definicje

- 10 **[0029]** O ile nie zdefiniowano inaczej, wszystkie techniczne i naukowe pojęcia stosowane w opisie mają takie samo znaczenie, jak jest powszechnie rozumiane przez znawców danej dziedziny.

- 15 **[0030]** Dla wygody znaczenia konkretnych terminów i fraz zastosowanych w opisie, przykładach i załączonych zastrzeżeniach podano poniżej. Inne terminy i frazy są definiowane w całym opisie.

[0031] Określenia odnoszące się do liczby pojedynczej „a”, „an” i „the” [rodzajniki w języku angielskim] obejmują odniesienia do liczby mnogiej, o ile kontekst wyraźnie nie wskazuje inaczej.

- 20 **[0032]** „Antysensowny oligonukleotyd” oznacza cząsteczkę kwasu nukleinowego komplementarną do części określonego transkryptu genu, która może hybrydyzować do transkryptu i blokować jego translację. Oligonukleotyd antysensowny może zawierać RNA lub DNA.

[0033] „Sekwencja biomolekularna” lub „sekwencja” oznacza całą lub część sekwencji polinukleotydu lub polipeptydu.

- 25 **[0034]** „Rak”, „nowotwór”, „guz”, „nowotwór złośliwy” i „rak”, stosowane w opisie zamiennie, oznaczają komórki lub tkanki, które mają nieprawidłowy fenotyp wzrostu, charakteryzujący się znaczną utratą kontroli nad proliferacją komórkową. Sposoby i kompozycje według wynalazku stosuje się szczególnie w odniesieniu do komórek przedrakowych, złośliwych, przedprzerzutowych, przerzutowych i nieprzerzutowych.

- 30 **[0035]** „Komplementarny” oznacza topologiczną kompatybilność lub dopasowanie oddziałujących powierzchni dwóch cząsteczek, takich jak funkcjonalna cząsteczka kwasu nukleinowego i jej obiekt docelowy. Cząsteczki mogą być opisane jako komplementarne i ponadto charakterystyki powierzchni kontaktowych są komplementarne do siebie.

- 35 **[0036]** „Odpowiadać” lub „przedstawiać” jeśli są stosowane na przykład w kontekście polinukleotydu lub sekwencji, która „odpowiada” lub „przedstawia” gen, oznacza, że sekwencja polinukleotydu jest obecna w genie lub w produkcie genowym kwasu nukleinowego np. mRNA. Polinukleotyd może być obecny w całości w obrębie eksonu sekwencji genomowej genu lub różne części sekwencji polinukleotydu mogą być obecne w różnych eksonach, np. tak, że przyległa sekwencja polinukleotydowa jest obecna w mRNA, przed
40 lub po splicingu, która jest produktem ekspresji genu.

[0037] Pojęcie „cytokina” to pojęcie rodzajowe dla białek uwalnianych przez jedną populację komórek, które działają na inną komórkę jako mediatory międzykomórkowe.

[0038] „Lek” oznacza dowolną substancję czynną fizjologicznie lub farmakologicznie,

która powoduje pożądane miejscowe lub układowe działanie u zwierząt, szczególnie u ssaków i ludzi.

5 [0039] „Ekspresja” oznacza ogólnie proces, przez który sekwencja polinukleotydowa ulega pomyślnej transkrypcji i translacji tak, że eksprymowane są wykrywalne poziomy sekwencji aminokwasowej lub białka. W opisie w niektórych kontekstach ekspresja dotyczy wytwarzania mRNA. W innych kontekstach ekspresja dotyczy wytwarzania białka.

10 [0040] „Funkcjonalny kwas nukleinowy” dotyczy cząsteczki kwasu nukleinowego, która po wprowadzeniu do komórki gospodarza swoiście zakłóca ekspresję białka. Zazwyczaj cząsteczki funkcjonalnego kwasu nukleinowego mają zdolność do zmniejszania ekspresji białka poprzez bezpośrednie oddziaływanie na transkrypt, który koduje to białko. Rybozomy, antysensowne kwasy nukleinowe i cząsteczki siRNA, w tym cząsteczki shRNA, krótkie RNA (zazwyczaj o długości mniej niż 400 zasad), mikro-RNA (miRNA) stanowią przykładowe funkcjonalne kwasy nukleinowe.

15 [0041] „Gen” dotyczy sekwencji polinukleotydowej, która zawiera sekwencje kontrolne i kodujące, konieczne do wytwarzania polipeptydu lub prekursora. Polipeptyd może być kodowany przez sekwencję kodującą o pełnej długości lub dowolną część sekwencji kodującej. Gen może stanowić nieprzerwaną sekwencję kodującą lub może obejmować jeden lub więcej intronów, połączonych przez odpowiednie miejsca splicingowe. Ponadto gen może zawierać jedną lub więcej modyfikacji w regionach kodujących lub nieulegających 20 translacji, które mogą wpływać na aktywność biologiczną lub strukturę chemiczną produktu ekspresji, szybkość ekspresji lub na sposób kontroli ekspresji. Takie modyfikacje obejmują, nieograniczająco, mutacje, insercje, delecje i substytucje jednego lub więcej nukleotydów. W związku z tym, takie zmodyfikowane geny mogą być określane jako „warianty” genu „natywnego”.

25 [0042] „Komórka gospodarza” oznacza komórkę, która może być lub była stosowana jako biorca rekombinowanego wektora lub innego przeniesienia polinukleotydów i zawiera potomstwo komórki podstawowej, którą transfekowano. Potomstwo pojedynczej komórki nie musi być koniecznie w pełni identyczne pod względem morfologii lub pod względem genomowego lub całkowitego DNA z komórką macierzystą, na skutek naturalnej, przypadkowej lub zamierzonej mutacji. 30

[0043] „Hybrydyzacja” oznacza dowolny proces, za pomocą którego sekwencja polinukleotydowa wiąże do komplementarnej sekwencji przez łączenie się zasad w pary.

35 [0044] „Osobnik”, „podmiot”, „gospodarz” i „pacjent”, stosowane zamiennie w opisie oznaczają dowolny podmiot ssaczy, dla którego pożądana jest diagnoza, leczenie lub terapia. W korzystnej postaci wykonania osobnikiem, podmiotem, gospodarzem lub pacjentem jest człowiek. Inne podmioty mogą obejmować, nieograniczająco, bydło, konie, psy, koty, świnki morskie, króliki, szczury, naczelnice i myszy.

40 [0045] „Znacznik” oznacza substancje, które są zdolne do dostarczania wykrywalnego sygnału, bezpośrednio lub przez interakcję z jednym lub więcej dodatkowymi członkami układu wytwarzania sygnału. Znaczniki, które są bezpośrednio wykrywane i mogą znaleźć zastosowanie w wynalazku obejmują znaczniki fluorescencyjne. Swoiste fluorofory obejmują fluoresceinę, rodaminę, BODIPY, barwniki cyjaninowe i podobne. Wynalazek rozważa również zastosowanie izotopów radioaktywnych, takich jak ^{35}S , ^{32}P , ^3H i podobnych jako znaczników. Mogą być również stosowane znaczniki kolorymetryczne, takie jak złoto 45 koloidalne lub kulki z barwnego szkła lub tworzywa sztucznego (np. polistyrenu, polipro-

pylenu, lateksu). Na przykład zob. patenty amerykańskie nr 4,366,241, nr 4,277,437, nr 4,275,149, nr 3,996,345, nr 3,939,350, nr 3,850,752 i nr 3,817,837.

5 [0046] „Oligonukleotydy” oznacza polinukleotydy zawierający na przykład od około 10 nukleotydów (nt) do około 1000 nt. Oligonukleotydy do stosowania w wynalazku mają korzystnie długość od około 10 nt do około 150 nt. Oligonukleotydy może być naturalnie występującym oligonukleotydem lub oligonukleotydem syntetycznym. Oligonukleotydy mogą być modyfikowane.

10 [0047] Minikomórka” oznacza bezjądrowe postaci komórek bakteryjnych wykonane przez zaburzenie w koordynacji podczas rozszczepienia binarnego podziału komórki z segregacją DNA. Minikomórki są różne od innych małych pęcherzyków, które są wytwarzane i uwalniane spontanicznie w konkretnych sytuacjach i nie są, w przeciwieństwie do minikomórek, przedmiotem swoistych rearanżacji genetycznych lub ekspresji genów episomalnych. Przy praktykowaniu wynalazku pożądane jest, aby minikomórki miały nienaruszone ściany komórkowe („nienaruszone minikomórki”).

15 [0048] „Modyfikowany oligonukleotydy” i „modyfikowany polinukleotydy” oznaczają oligonukleotydy lub polinukleotydy z jedną lub wieloma modyfikacjami chemicznymi, na poziomie molekularnym, w stosunku do naturalnej struktury cząsteczkowej wszystkich lub dowolnych zasad, reszt cukrowych i międzynukleozydowych wiązań fosforanowych, jak również cząsteczek mających dodane podstawienie lub kombinacje modyfikacji w tych
20 miejscach. Międzynukleozydowymi wiązaniami fosforanowymi mogą być wiązania fosfodiestrowe, fosfortriestrowe, fosforoamidynianowe, siloksanowe, węglanowe, karboksymetyloestrowe, acetamidynianowe, karbamidynianowe, tioeterowe, mostkowane fosforoamidyniany, mostkowane metylenofosfoniany, fosfortioniany, metylofosfoniany, fosforoditioniany, mostkowane fosfortioniany lub sulfonowe wiązania międzynukleozydowe lub
25 wiązania 3'-3', 5'-3' lub 5'-5' i kombinacje takich podobnych wiązań. Wiązanie fosfodiestrowe może być zastępowane wiązaniem zastępczym, takim jak fosfortioestrowe, metyloamino, metylofosfonian, fosforoamidynian i guanidyna, a podjednostka rybozy polinukleotydów może być również podstawiona (np. fosfodiester heksozy; peptydowe kwasy nukleinowe). Modyfikacje mogą być wewnętrzne (pojedyncze lub powtarzane) lub na
30 końcu (końcach) cząsteczki oligonukleotydu i mogą obejmować addycje do cząsteczki międzynukleozydowych wiązań fosforanowych, takie jak modyfikacje deoksyrybozowe i fosforanowe, które tną lub sieciują do przeciwnych łańcuchów lub powiązanych enzymów lub innych białek. Terminy „modyfikowane oligonukleotydy” i „modyfikowane polinukleotydy” obejmują również oligonukleotydy lub polinukleotydy zawierające modyfikacje reszt cukrowych (np. podstawione na 3' monomery rybonukleotydy lub deoksyrybonukleotydy), z których dowolne są połączone ze sobą wiązaniami 5' do 3'.

[0049] Wyrażenie „cząsteczki kwasu nukleinowego” i termin „polinukleotydy” oznaczają polimeryczne postaci nukleotydów o dowolnej długości lub rybonukleotydów, lub deoksynukleotydów. Te pojęcia obejmują, w sposób nieograniczający, pojedynczo-, podwójno-
40 lub potrójno-niciowy DNA lub RNA, genomowy DNA, cDNA, hybrydy DNA-RNA lub polimer zawierający zasady purynowe i pirymidynowe lub inne naturalne, chemicznie lub biochemicznie modyfikowane, niewystępujące w naturze lub derywatyzowane zasady nukleotydów. Szkielet polinukleotydu może zawierać cukry i grupy fosforanowe (jaki można typowo znaleźć w RNA i DNA) lub modyfikowane lub podstawione grupy cukrowe lub
45 fosforanowe. Alternatywnie, szkielet polinukleotydu może zawierać polimer syntetycznych podjednostek takich jak fosforamidyny i zatem może być amidofosforanem oli-

godeoksynukleozydu lub mieszanym oligomerem amidofosforan-fosfodiester. Polinukleotyd może zawierać modyfikowane nukleotydy, takie jak nukleotydy metylowane i analogi nukleotydów, uracyl, inne cukry i grupy łączące, takie jak fluororyboza i tioestry i rozgałęzienia nukleotydowe. Polinukleotyd może być dalej modyfikowany, tak przez
 5 sprzężanie ze składnikiem znakującym. Inne rodzaje modyfikacji obejmują czapeczki, podstawienie jednego lub więcej naturalnie występujących nukleotydów analogiem i wprowadzenie środków do przyłączania polinukleotydu do białek, jonów metali, składników znakujących, innych polinukleotydów lub stałego nośnika.

[0050] „Farmaceutycznie dopuszczalny” dotyczy zgodności fizjologicznej. Farmaceutycznie
 10 nie dopuszczalny nośnik lub zaróbka nie znosi aktywności biologicznej podawanej kompozycji, jest chemicznie obojętny i nie jest toksyczny dla organizmu, któremu jest podawany.

[0051] „Polipeptyd” i „białko” stosowane w opisie zamiennie oznaczają postać polimeryczną aminokwasów o dowolnej długości, która może obejmować poddane translacji,
 15 niepoddane translacji, modyfikowane chemicznie, modyfikowane biochemicznie i derywatywizowane aminokwasy. Polipeptyd lub białko może być występującym naturalnie, rekombinowanym lub syntetycznym lub ich dowolną kombinacją. Ponadto polipeptyd lub białko mogą zawierać fragment naturalnie występującego białka lub peptydu. Polipeptyd lub białko może być pojedynczą cząsteczką lub może być złożonym kompleksem wielocząsteczkowym. Dodatkowo takie polipeptydy lub białka mogą mieć zmodyfikowane szkielety peptydowe. Terminy obejmują białka fuzyjne, w tym białka fuzyjne z heterologiczną sekwencją aminokwasową, fuzje z heterologiczną i homologiczną sekwencją liderową, z lub bez N-końcowych reszt metioniny, białka znakowane immunologicznie i podobne.

[0052] „Oczyszczony” dotyczy związku, który jest usuwany ze swojego naturalnego środowiska i jest w co najmniej około 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%,
 25 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,9% lub 99,99% wolny od innych składników, z którymi jest naturalnie związany.

[0053] „Rybozym” oznacza cząsteczkę RNA mającą aktywność enzymatyczną, która potwarzalnie rozcina inne cząsteczki RNA w sposób swoisty dla sekwencji zasad nukleotydowych.
 30

[0054] „Interferencja RNA” (RNAi) oznacza swoistą dla sekwencji lub swoistą dla genu supresję ekspresji genu (synteza białka), w której pośredniczą krótkie interferujące RNA (siRNA), krótkie RNA o strukturze spinki do włosów, krótkie RNA lub mikroRNA.

[0055] „Identyczność sekwencji” dotyczy stopnia podobieństwa lub komplementarności.
 35 Może występować częściowa identyczność lub identyczność całkowita. Częściowa komplementarność sekwencji oznacza taką, która inhibuje co najmniej częściowo hybrydyzację identycznej sekwencji z docelowym polinukleotydem; oznacza to zastosowanie terminu funkcjonalnego „zasadniczo identyczna”. Inhibicja hybrydyzacji całkowicie komplementarnej sekwencji do sekwencji docelowej może być badana przez zastosowanie oznaczenia hybrydyzacji (analiza hybrydyzacji typu Southern lub Northern, hybrydyzacja w roztworze i podobne) w mało rygorystycznych warunkach. Zasadniczo identyczna sekwencja lub sonda będzie współzawodniczyć i hamować wiązanie (tj. hybrydyzację) całkowicie identycznej sekwencji lub sondy do docelowej sekwencji w mało rygorystycznych warunkach.
 40 Nie oznacza to, że mało rygorystyczne warunki oznaczają takie, w których jest dozwolone nieswoiste wiązanie; mało rygorystyczne warunki wymagają, aby wiązanie dwóch sekwencji do siebie było swoistym (tj. selektywnym) oddziaływaniem. Brak nieswoistego
 45

wiązania może być badany przez zastosowanie drugiej docelowej sekwencji, w której brakuje nawet częściowego stopnia komplementarności (np. mniej niż około 30% identyczności); przy braku nieswoistego wiązania sonda nie będzie hybrydyzować do drugiej niekomplementarnej sekwencji docelowej.

5 **[0056]** Inna droga rozpatrywania identyczności sekwencji, w kontekście dwóch sekwencji kwasu nukleinowego lub polipeptydu, obejmuje odnoszenie reszt w dwóch sekwencjach, które są takie same, gdy są dopasowane pod kątem maksimum zgodności w konkretnym regionie. Według opisu, „odsetek identyczności sekwencji” oznacza wartość określoną przez porównywanie dwóch optymalnie dopasowanych sekwencji w obrębie okna porównania, przy czym część sekwencji polinukleotydu w oknie porównania może zawierać addycje lub delecje (tj. przerwy) w porównaniu do sekwencji referencyjnej (która nie zawiera addycji ani delecji), w celu optymalnego dopasowania dwóch sekwencji. Odsetek oblicza się przez określanie liczby pozycji, w których występują identyczne zasady kwasu nukleinowego w obu sekwencjach, w celu uzyskania liczby zgodnych pozycji, dzieląc liczbę zgodnych pozycji przez całkowitą liczbę pozycji w oknie porównania i mnożąc ten wynik przez 100 w celu uzyskania odsetka identyczności sekwencji.

10 **[0057]** „Krótkie interferujące RNA” (siRNA) dotyczy podwójnoniciowych cząsteczek RNA, zazwyczaj o długości od około 10 do około 30 nukleotydów, które są zdolne do pośredniczenia w interferencji RNA (RNAi). Według opisu pojęcie siRNA obejmuje krótkie RNA o strukturze spinki do włosów, znane również jako shRNA.

15 **[0058]** Terminy „leczenie”, „traktowanie”, „traktować” i podobne dotyczą uzyskiwania pożądanego efektu farmakologicznego i/lub fizjologicznego. Efekt może być profilaktyczny pod względem całkowitego lub częściowego zapobieżenia chorobie lub jej objawom i/lub może być terapeutyczny pod względem częściowej lub całkowitej stabilizacji stanu lub wyzdrowienia z choroby i/lub niekorzystnych skutków przypisywanych chorobie. „Leczenie” obejmuje dowolne leczenie choroby u ssaka, szczególnie u człowieka i obejmuje: 25 (a) zapobieganie wystąpieniu choroby lub objawu u osobnika, który może być predysponowany do wystąpienia choroby lub objawu, ale nie został jeszcze zdiagnozowany jako chory; (b) hamowanie objawu choroby, tj. zatrzymywanie postępu; lub (c) łagodzenie objawu choroby, tj. powodowanie regresji choroby lub objawu.

II. Dostarczanie funkcjonalnych kwasów nukleinowych za pośrednictwem minikomórek

30 **[0059]** Jak wskazano powyżej, wynalazek zapewnia sposób dostarczania funkcjonalnego kwasu nukleinowego do komórki docelowej, obejmujący (a) zapewnianie nienaruszonej minikomórki, która zawiera funkcjonalną cząsteczkę kwasu nukleinowego lub plazmid zawierający segment, który koduje funkcjonalną cząsteczkę kwasu nukleinowego, a następnie (b) doprowadzanie do kontaktu minikomórki z docelową komórką ssacza, tak, że komórka ssacza pochłania minikomórkę. Po pochłonięciu minikomórki, funkcjonalna cząsteczka kwasu nukleinowego jest uwalniana do cytoplazmy komórki docelowej lub eksprymowana przy udziale komórki docelowej. Minikomórki mogą wchodzić w kontakt ze ssaczymi komórkami docelowymi za pośrednictwem dwuswoistych ligandów, jak opisano w WO 2005/056749. Kontakt pomiędzy minikomórką i docelową komórką ssacza może zachodzić w warunkach *in vitro* lub *in vivo*.

A. Minikomórki

45 **[0060]** Minikomórki według wynalazku są bezjądroowymi postaciami komórek *E. coli* lub innych bakterii, wykonanych przez zaburzenie w koordynacji, podczas rozszczepienia bi-

narnego, podziału komórki z segregacją DNA. Prokariotyczna replikacja chromosomu jest związana z prawidłowym rozszczepieniem binarnym, które obejmuje tworzenie przegrody pośrodku komórki. Na przykład u *E. coli*, mutacja genów *min*, takich jak *minCD*, może usuwać inhibicję tworzenia przegrody na biegunach komórkowych podczas podziału komórki, skutkując wytwarzaniem prawidłowej komórki potomnej i bezjądrowej minikomórki. Patrz de Boer *et al.*, 1992; Raskin & de Boer, 1999; Hu & Lutkenhaus, 1999; Harry, 2001. Minikomórki są różne od innych małych pęcherzyków, które są wytwarzane i uwalniane spontanicznie w konkretnych sytuacjach i nie są, w przeciwieństwie do minikomórek, przedmiotem swoistych rearanżacji genetycznych lub ekspresji genów episomalnych. W praktyce wynalazku pożądane jest, aby minikomórki miały nienaruszone ściany komórkowe („nienaruszone minikomórki”).

[0061] Oprócz mutacji operonu *min* bezjądrowe minikomórki są również wytwarzane po wielu innych rearanżacjach genetycznych lub mutacjach, które zaburzają tworzenie przegrody, na przykład w *divIVB1* u *B. subtilis*. Zob. Reeve i Cornett, 1975; Levin *et al.*, 1992. Minikomórki mogą być również tworzone po zakłóceniu na poziomach ekspresji genów białek zaangażowanych w podział komórkowy/segregację chromosomów. Na przykład, nadekspresja *minE* prowadzi do podziału biegunowego i wytwarzania minikomórek. Podobnie minikomórki pozbawione chromosomu mogą być wynikiem wad segregacji chromosomu, na przykład mutacji *smc* u *Bacillus subtilis* (Britton *et al.*, 1998), delecji *spoOJ* u *B. subtilis* (Ireton *et al.*, 1994), mutacji *mukB* u *E. coli* (Hiraga *et al.*, 1989) i mutacji *parC* u *E. coli* (Stewart i D’Ari, 1992). Produkty genowe mogą być dostarczane w *trans*. Jeśli są nadekspymowane z plazmidu wysokokopijnego, na przykład, CafA mogą zwiększać szybkość podziału komórki i/lub inhibować podział chromosomu po replikacji (Okada *et al.*, 1994), co skutkuje tworzeniem połączonych w łańcuchy komórek i bezjądrowych minikomórek (Wachi *et al.*, 1989; Okada *et al.*, 1993). Minikomórki można otrzymywać z dowolnych komórek bakteryjnych o pochodzeniu Gram-dodatnim lub Gram-ujemnym.

[0062] Zgodnie z wynalazkiem, minikomórki zawierają funkcjonalny kwas nukleinowy lub plazmid, który koduje funkcjonalny kwas nukleinowy, których dostarczenie jest pożądane. „Funkcjonalne” cząsteczki kwasu nukleinowego według wynalazku mają zdolność do zmniejszania ekspresji białka przez bezpośrednie oddziaływanie z transkryptem, który koduje to białko. Cząsteczki siRNA, rybozymy, i antysensowne kwasy nukleinowe stanowią przykładowe funkcjonalne kwasy nukleinowe.

B. Cząsteczki siRNA

[0063] Cząsteczki krótkiego interferującego RNA (siRNA) są przydatne do prowadzenia RNAi, potranskrypcyjnego mechanizmu wyciszania genów. Zazwyczaj „siRNA” oznacza podwójnoniciowe cząsteczki RNA o długości od około 10 do około 30 nukleotydów, które zostały nazwane ze względu na ich zdolność do swoistego zakłócania ekspresji białka. Korzystnie cząsteczki siRNA mają długość 12-28 nukleotydów, korzystniej długość 15-25 nukleotydów, jeszcze korzystniej długość 19-23 nukleotydów i najkorzystniej długość 21-23 nukleotydów. Dlatego korzystne cząsteczki siRNA mają długość 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 lub 29 nukleotydów.

[0064] Długość jednej nici wyznacza długość cząsteczki siRNA. Na przykład siRNA, które jest opisane jako mające długość 21 rybonukleotydów (21-mer) może zawierać dwie przeciwległe nici RNA, które przyłączyły się do siebie na długości 19 przylegających do siebie par zasad. Pozostałe dwa rybonukleotydy na każdej nici będą stanowić „niesparowany koniec”. Gdy siRNA zawiera dwie nici o różnych długościach, dłuższa z nici wyzna-

cza długość siRNA. Na przykład dsRNA zawierający jedną nić, która ma długość 21 nukleotydów i drugą nić o długości 20 nukleotydów, stanowi 21-mer.

5 [0065] Pożądane są siRNA, które zawierają niesparowany koniec. Niesparowany koniec może występować na końcu 5' lub 3' nici. Korzystnie, występuje na końcu 3' nici RNA. Długość niesparowanego końca może się zmieniać, ale korzystnie wynosi od około 1 do około 5 zasad i bardziej korzystnie ma długość około 2 nukleotydów. Korzystnie, siRNA według wynalazku będzie zawierać niesparowany koniec 3' mający około 2 do 4 zasad. Bardziej korzystnie, niesparowany koniec 3' ma długość 2 rybonukleotydów. Nawet bardziej korzystnie, 2 rybonukleotydy zawierające niesparowany koniec 3' oznaczają urydynę (U).
10

[0066] Według wynalazku, pojęcie siRNA obejmuje krótkie RNA o strukturze spinki do włosów. shRNA zawierają pojedynczą nić RNA, która tworzy strukturę pnia-pętli, gdzie pień składa się z komplementarnych nici sensownych i antysensownych, które zawierają dwuniciowy siRNA, a pętla jest łącznikiem o zmiennej wielkości. Struktura pnia shRNA ma zazwyczaj długość od około 10 do około 30 nukleotydów. Korzystnie pień cząsteczki siRNA ma długość 12-28 nukleotydów, bardziej korzystnie długość 15-25 nukleotydów, jeszcze bardziej korzystnie długość 19-23 nukleotydów i najbardziej korzystnie długość 21-23 nukleotydów. Dlatego korzystne cząsteczki shRNA zawierają pnie, które mają długość 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 lub 29 nukleotydów.
15

20 [0067] siRNA według wynalazku są przeznaczone do oddziaływania z docelową sekwencją rybonukleotydową, co oznacza, że stanowią one w wystarczającym stopniu dopełnienie sekwencji docelowej, aby hybrydyzować do sekwencji docelowej. W jednym przykładzie wykonania wynalazek zapewnia cząsteczki siRNA zawierające sekwencję rybonukleotydową identyczną co najmniej w 70%, 75%, 80%, 85% lub 90% z docelową sekwencją rybonukleotydową lub komplementarną do docelowej sekwencji rybonukleotydowej. Korzystnie, cząsteczka siRNA jest co najmniej w 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% lub 100% identyczna z docelową sekwencją rybonukleotydową lub komplementarna do docelowej sekwencji rybonukleotydowej. Najbardziej korzystnie, siRNA będzie w 100% identyczne z docelową sekwencją nukleotydową lub komplementarne do sekwencji rybonukleotydowej.
25
30 Jednak cząsteczki siRNA z insercjami, delecjami lub pojedynczymi mutacjami punktowymi w stosunku do obiektu docelowego mogą być również skuteczne.

[0068] Narzędzia wspomagające projektowanie siRNA są łatwo dostępne dla społeczeństwa. Na przykład narzędzie do projektowania komputerowego siRNA jest dostępne w Internecie pod adresem www.dharmacon.com.

35 C. Rybozomy

[0069] Rybozomy oznaczają cząsteczki RNA mające aktywność enzymatyczną, które mogą powtarzalnie rozcinać inne cząsteczki RNA swoiście dla sekwencji zasad nukleotydowych. Takie enzymatyczne cząsteczki RNA mogą być ukierunkowane na zasadniczo dowolny transkrypt RNA i prowadzić skuteczne cięcia w warunkach *in vitro*.

40 [0070] Obecnie znanych jest sześć rodzajów naturalnie występujących enzymatycznych RNA. Każdy może katalizować hydrolizę wiązań fosfodiesterowych RNA w układzie trans (i może rozcinać inne cząsteczki RNA) w warunkach fizjologicznych. Na ogół enzymatyczne polinukleotydy działają poprzez związanie się najpierw do docelowego RNA. Takie wiązanie zachodzi poprzez wiążącą obiekt docelowy część enzymatycznego polinukleotydu, który jest utrzymywany w bliskim sąsiedztwie enzymatycznej części cząsteczki, która
45

działa doprowadzając do cięcia docelowego RNA. Stąd enzymatyczny polinukleotyd naj-
 5 pierw rozpoznaje, a następnie wiąże docelowy RNA poprzez komplementarne parowanie
 zasad, a po związaniu do właściwego miejsca działa enzymatycznie, przecinając docelowe
 RNA. Strategiczne przecięcie takiego docelowego RNA zniszczy jego zdolność do kiero-
 wania syntezą kodowanego białka. Po tym, jak enzymatyczny polinukleotyd zwiąże i prze-
 tnie dane docelowe RNA, jest on uwalniany od tego RNA, do poszukiwania kolejnego
 obiektu docelowego i może powtarzalnie wiązać i przecinać nowe obiekty docelowe.

[0071] Korzystny jest enzymatyczny charakter rybozomu. Ze względu na to, że pojedyn-
 cza cząsteczka rybozomu ma zdolność przecinania wielu cząsteczek docelowego RNA,
 10 skuteczne stężenia rybozomu mogą być całkiem niskie.

[0072] Użyteczne rybozomy mogą zawierać jeden z kilku motywów, w tym głowę młotka
 (Rossi et al. (1992)), spinkę do włosów (Hampel i Tritz, (1989), Hampel et al. (1990)), mo-
 tyw wirusa zapalenia wątroby typu delta (Perrotta i Been (1992), intron grupy I (patent
 amerykański nr 4,987,071), RNA RNazyP w połączeniu z sekwencją nakierowującą RNA
 15 (Guerrier-Takada et al. (1983)), i VS RNA Neurospora (Saville & Collins (1990); Saville
 & Collins (1991); Collins & Olive (1993)). Te swoiste motywy nie mają charakteru ogra-
 niczającego, jako że wszystko to, co jest ważne w rybozymie według wynalazku to, aby
 miał miejsce wiązania swoistego substratu, które jest komplementarne do jednego lub wię-
 ciej regionów docelowego RNA, i aby miał sekwencje nukleotydowe w obrębie lub otacza-
 20 jące to miejsce wiązania substratu, które nadają cząsteczce aktywność cięcia RNA.

[0073] Rybozomy według wynalazku mogą zawierać modyfikowane oligonukleotydy (np.
 dla ulepszenia stabilności, ukierunkowania itp.). Sekwencje kwasu nukleinowego kodujące
 rybozomy mogą znajdować się pod kontrolą silnego konstytutywnego promotora, takiego
 jak, na przykład, promotor polimerazy RNA II lub polimerazy RNA III, aby transfekowane
 25 komórki produkowały wystarczające ilości rybozomu, dla zniszczenia docelowych endo-
 gennych [RNA] informacyjnych i inhibowania translacji.

D. Antysensowne oligonukleotydy

[0074] Antysensowne oligonukleotydy według wynalazku swoiście hybrydują z kwasem
 nukleinowym kodującym białko i zakłócają transkrypcję lub translację białka. W jednym
 30 przykładzie wykonania antysensowny oligonukleotyd jest nakierowany na DNA i zakłóca
 jego replikację i/lub transkrypcję. W innym przykładzie wykonania antysensowny oligo-
 nukleotyd swoiście hybryduje z RNA, w tym pre-mRNA i mRNA. Takie antysensowne
 oligonukleotydy mogą oddziaływać, na przykład, na translokację RNA do miejsca transla-
 cji białka, translację białka z RNA, splicing RNA, dla otrzymania jednego lub więcej rod-
 35 zajów mRNA, i aktywność katalityczną, która może być powiązana z lub ułatwiana przez
 RNA. Ogólny efekt takiej interferencji to modulowanie, zmniejszanie lub inhibowanie
 ekspresji docelowego białka.

[0075] Jest kilka miejsc w obrębie genu, które można wykorzystać przy projektowaniu an-
 tysensownego oligonukleotydu. Na przykład, antysensowny oligonukleotyd może wiązać
 40 region obejmujący kodon inicjacji translacji, znany również jako kodon start, otwartej
 ramki odczytu. Pod tym względem, „kodon start” i „kodon inicjacji translacji” ogólnie do-
 tyczą części takiego mRNA lub genu, które obejmują od co najmniej około 25 do co naj-
 mniej około 50 kolejnych nukleotydów w dowolnym kierunku (tj. 5' lub 3') od kodonu ini-
 cjacji translacji.

45 [0076] Kolejnym miejscem do wystąpienia oddziaływania antysensownego jest kodon

terminacji otwartej ramki odczytu. Pojęcia „region kodonu stop” i „region kodonu terminacji translacji” ogólnie dotyczą części takiego mRNA lub genu, które obejmują od co najmniej około 25 do co najmniej około 50 kolejnych nukleotydów w dowolnym kierunku od kodonu terminacji translacji.

5 **[0077]** Otwarta ramka odczytu lub region kodujący również mogą oznaczać obiekty docelowe zapewniające sukces. Otwarta ramka odczytu jest na ogół rozumiana jako odnosząca się do regionu pomiędzy kodonem inicjacji translacji i kodonem terminacji translacji. Kolejnym regionem docelowym jest nieulegający translacji region 5', który stanowi część mRNA w kierunku 5' od kodonu inicjacji translacji. Obejmuje on nukleotydy pomiędzy 5'
10 miejscem czapeczki i kodonem inicjacji translacji mRNA lub odpowiadających nukleotydów w genie.

[0078] Podobnie, można stosować nieulegający translacji region 3' jako obiekt docelowy dla antysensownych oligonukleotydów. Nieulegający translacji region 3' oznacza tę część mRNA w kierunku 3' od kodonu terminacji translacji i stąd obejmuje nukleotydy pomiędzy
15 kodonem terminacji translacji i 3' końcem mRNA lub odpowiadających nukleotydów w genie.

[0079] Antysensowny oligonukleotyd może być również nakierowany na 5' region czapeczki mRNA. 5' czapeczka zawiera resztę N7-metylowanej guanozyny, połączoną z najbliższą od strony 5'- resztą mRNA za pomocą wiązania 5'-5' trójfosforanowego. Region 5'
20 czapeczki obejmuje, jak się uważa, samą strukturę czapeczki 5', jak również pierwsze 50 nukleotydów sąsiadujących z czapeczką.

[0080] Chociaż niektóre eukariotyczne transkrypty mRNA podlegają bezpośrednio translacji, wiele zawiera jeden lub więcej regionów intronowych, które są wycinane z transkrypty przed przeprowadzeniem jego translacji. Pozostałe (a tym samym poddawane translacji)
25 regiony eksonów są łączone ze sobą w wyniku splicingu, tworząc ciągłą sekwencję mRNA. Miejsca splicingu mRNA, tj. połączenia intron-ekson, stanowią potencjalne regiony — obiekty docelowe, i są szczególnie użyteczne w sytuacjach, gdy nieprawidłowy splicing jest powiązany z chorobą, lub gdy nadprodukcja określonego produktu splicingu mRNA jest powiązana z chorobą. Ponadto nieprawidłowe miejsca połączeń, z związku z rearanżacjami lub delecjami również są potencjalnymi obiektami docelowymi dla antysensownych
30 oligonukleotydów.

[0081] Mając na uwadze te różne miejsca docelowe należy wybierać antysensowne oligonukleotydy, które są wystarczająco komplementarne do docelowych polinukleotydów. Muszą one wykazywać wystarczający stopień komplementarności lub precyzyjnego parowania tak, że występuje stabilne i swoiste wiązanie pomiędzy oligonukleotydem i polinukleotydowym obiektem docelowym. Co ważne, sekwencja antysensownego oligonukleotydu nie musi być w 100% komplementarna do tej dla jego docelowego polinukleotydu, aby swoiście hybridyzować. Antysensowny oligonukleotyd podlega swoiście hybridyzacji, gdy wiązanie antysensownego oligonukleotydu do docelowego polinukleotydu
35 zakłóca normalne funkcjonowanie docelowego polinukleotydu, powodując utratę użyteczności, i gdy występuje wystarczający stopień komplementarności dla uniknięcia nieswoistego wiązania antysensownego oligonukleotydu do sekwencji różnej od docelowej w warunkach, w których pożądane jest swoiste wiązanie, tj. w warunkach fizjologicznych w przypadku oznaczeń *in vivo* lub traktowania terapeutycznego, i w przypadku oznaczeń
40 *in vitro*, w warunkach, w których prowadzone są oznaczenia.

[0082] Antysensowne oligonukleotydy mogą mieć co najmniej około 8 nt do co najmniej

około 50 nt długości. W jednym przykładzie wykonania antysensowne oligonukleotydy mogą mieć około 12 do około 30 nt długości.

[0083] Antysensowne oligonukleotydy stosowane zgodnie z wynalazkiem mogą być dogodnie i rutynowo wytwarzane dobrze znaną techniką syntezy w fazie stałej. Sprzęt do takiej syntezy jest sprzedawany przez kilku dostawców, w tym, na przykład, Applied Biosystems (Foster City, CA). Można stosować, ponadto lub alternatywnie, inne sposoby takiej syntezy, znane ze stanu techniki. Dobrze znane jest stosowanie podobnych technik do otrzymywania oligonukleotydów, takich jak fosforotioaniany i alkilowane pochodne.

E. Kwasy nukleinowe kodujące funkcjonalne kwasy nukleinowe

[0084] W korzystnych postaciach wykonania wynalazku minikomórki zawierają kwasy nukleinowe, które kodują funkcjonalne kwasy nukleinowe. Na przykład, plazmid może kodować funkcjonalny kwas nukleinowy, który jest ekspresyjowany wewnątrz ssaczych komórek docelowych. Umożliwia to endogenne dostarczanie funkcjonalnych kwasów nukleinowych, które wykazuje zalety w porównaniu z przejściowym charakterem egzogenego dostarczenia.

[0085] Stąd rekombinowane nienaruszone minikomórki mogą nieść plazmidowy DNA kodujący jedną lub więcej sekwencji siRNA nakierowanych na wyciszenie genów lekooporności lub oporności na apoptozę. Przy użyciu minikomórek, które kodują wiele funkcjonalnych kwasów nukleinowych, możliwe jest traktowanie komórek, które ekspresyjują wiele mechanizmów lekooporności. Różne sekwencje siRNA można ekspresyjować indywidualnie z różnych promotorów. Na przykład, siRNA nakierowane na mRNA Pgp można ekspresyjować z promotora U6, a siRNA nakierowane na mRNA Bcl-2 można ekspresyjować z promotora H1. Te liczne kasety do ekspresji korzystnie znajdują się na pojedynczym plazmidzie, ale mogą również występować na różnych plazmidach. Różne sekwencje siRNA można również ekspresyjować z pojedynczego promotora, przy czym rekombinowany plazmid niesie kasetę do ekspresji złożoną z wielu sekwencji kodujących siRNA, które są połączone ze sobą za pomocą niekodujących sekwencji polinukleotydów. Pojedynczy terminator transkrypcji genu można umieścić poniżej kompletnej kasety do ekspresji.

[0086] W jednej strategii, plazmid koduje nici sensowną i antysensowną siRNA jako dwa niezależne transkrypty, które, po ekspresji w obrębie komórki docelowej, hybrydują, z utworzeniem funkcjonalnych dupleksów siRNA. W drugiej korzystnej strategii, plazmid koduje jeden lub więcej siRNAs, z których wszystkie są ekspresyjowane jako pojedynczy transkrypt, który tworzy strukturę pień-pętla krótkiego RNA typu spinka do włosów. Struktura spinki do włosów może być poddawana obróbce przez enzym Dicer do postaci funkcjonalnych siRNA.

F. Elementy reporterowe

[0087] Cząsteczka kwasu nukleinowego do wprowadzenia za pomocą podejścia według wynalazku może zawierać element reporterowy. Element reporterowy nadaje rekombinowanemu gospodarzowi łatwo wykrywalny fenotyp lub cechę, typowo przez kodowanie polipeptydu, nieprodukowanego w innych warunkach przez gospodarza, który można wykrywać, po ekspresji, za pomocą analizy histologicznej lub *in situ*, tak jak za pomocą technik obrazowania w warunkach *in vivo*. Na przykład, element reporterowy dostarczany przez nienaruszoną minikomórkę, według wynalazku, mógłby kodować białko, które powoduje, przy pochłonięciu przez komórkę gospodarza, kolorymetryczną lub fluorometryczną zmianę, która jest wykrywalna za pomocą analizy *in situ* i która jest ilościową lub

półilościową funkcją aktywacji transkrypcji. Ilustracją tych białek są esterazy, fosfatazy, proteazy i inne enzymy, których aktywność generuje wykrywalny chromofor lub fluorofor.

5 **[0088]** Korzystne przykłady to β -galaktozydaza *E. coli*, która powoduje zmianę koloru poprzez cięcie indygenego substratu, indolilo- β -D-galaktozydu, i lucyferaza, która utlenia długołańcuchowy aldehyd (bakteryjna lucyferaza) lub heterocykliczny karboksylowy kwas (lucyferyna), z równoczesnym uwolnieniem światła. Również, użytecznym w tym kontekście jest element reporterowy, który koduje białko zielonej fluorescencji (GFP) z meduzy, *Aequorea victoria*, jak opisano w Prasher et al. (1995). Dziedzinę technologii powiązanej z GFP ilustrują dwa opublikowane zgłoszenia PCT, WO 095/21191 (ujawnia polinukleotydową sekwencję kodującą 238 aminokwasowe apoproteinę GFP, zawierającą chromofor utworzony z aminokwasów 65 do 67) i WO 095/21191 (ujawnia modyfikację cDNA dla apopeptydu GFP *A. victoria*, zapewniając peptyd o zmienionych właściwościach fluorescencyjnych), i zgłoszenie Heim et al. (1994) dotyczące zmutowanego GFP, charakteryzowanego przez 4- do 6-krotną poprawę w amplitudzie wzbudzenia.

15 **[0089]** Kolejny rodzaj elementu reporterowego jest powiązany z produktem ekspresji, który czyni rekombinowaną minikomórkę oporną na toksynę. Na przykład, gen *neo* chroni gospodarza przed toksycznymi poziomami antybiotyku G418, podczas gdy gen kodujący reduktazę dihydrofolianową nadaje oporność na metotreksat, a gen acetylotransferazy chloramfenikolu (CAT) nadaje oporność na chloramfenikol.

20 **[0090]** Innymi genami do stosowania jako elementy reporterowe są te, które mogą transformować minikomórkę gospodarza, do celów ekspresji odróżniających antygenów powierzchni komórkowej, np. białka otoczki wirusowej, takie jak HIV gp120 lub herpes gD, które są łatwo wykrywalne w immunooznaczeniach.

G. Elementy regulatorowe

25 **[0091]** Cząsteczka kwasu nukleinowego do wprowadzenia za pomocą podejścia według wynalazku może również mieć pożądaną kodującą segment połączony funkcjonalnie z elementem regulatorowym, takim jak promotor, terminator, enhancer i/lub sekwencja sygnałowa. Odpowiedni promotor może być tkankowo-specyficzny lub nawet nowotworowo-specyficzny, na miarę potrzeb kontekstu terapeutycznego.

30 **[0092]** Promotor jest „tkankowo-specyficzny” gdy jest aktywowany preferencyjnie w danej tkance, i stąd jest skuteczny w kierowaniu ekspresją, w docelowej tkance, funkcjonalnie połączonej sekwencji strukturalnej. Kategoria tkankowo-specyficznych promotorów obejmuje, na przykład: swoisty dla hepatocytów promotor dla albuminy i α_1 -antytrypsyny, odpowiednio; region kontrolny genu elastazy I, który jest aktywny w komórkach zrazikowych trzustki; region kontrolny genu insuliny, aktywny w trzustkowych komórkach beta; 35 mysiego region kontrolny wirusa nowotworu gruczołu sutkowego, który jest aktywny w komórkach jądra, sutka, limfatycznych i tucznych; region kontrolny genu zasadowego białka mieliny, aktywny w komórkach oligodendrocytów; i region kontrolny genu hormonu uwalniającego gonadotropinę, który jest aktywny w komórkach podwzgórza. Zob. Frain et al. (1990), Ciliberto et al. (1985), Pinkert et al., (1987), Kelsey et al. (1987), Swift et al. (1984), MacDonald (1987), Hanahan, (1985), Leder et al. (1986), Readhead et al. (1987), i Mason et al. (1986).

45 **[0093]** Istnieją również promotory, które są eksprymowane preferencyjnie w określonych komórkach nowotworowych lub w komórkach nowotworowych per se, i które są użyteczne w leczeniu różnych raków, zgodnie z wynalazkiem. Klasa promotorów, które są swoiste

dla komórek rakowych jest ilustrowana przez: promotor tyrozynazy, do celowania w czerniaki; promotor MUC1/Df3 do celowania w raka sutka; hybrydowy *myoD* enhancer/promotor SV40, celujący w ekspresję mięśniakomięsaka prądkowanego (RMS); promotor antygeny karcynoembrionalnego (CEA), który jest swoisty dla komórek ekspresjujących CEA, takich jak komórki raka okrężnicy, i promotor genu heksokinazy typu II, do celowania w niedrobnokomórkowe raki płuc. Zob. Hart (1996), Morton & Potter (1998), Kurane et al. (1998) i Katabi et al. (1999).

[0094] Promotory, które są zależne od polimerazy RNA (pol) II lub pol II to korzystne promotory. Wysoce korzystne promotory to promotory polimerazy RNA III, H1 i U6.

[0095] Można stosować sekwencję sygnałową, według wynalazku, do powodowania wydzielania produktu ekspresji lub lokalizowania produktu ekspresji w określonym przedziale komórkowym. Stąd terapeutyczna polinukleotydomowa cząsteczka, która jest dostarczana za pośrednictwem nienaruszonych minikomórek może zawierać sekwencję sygnałową, we właściwej ramce odczytu, tak, że przedmiotowy produkt ekspresji jest wydzielany przez komórkę pochłaniającą lub jej potomstwo, oddziałując tym samym na otaczające komórki, zgodnie z wybranym paradygmatem leczenia. Ilustrujące sekwencje sygnałowe obejmują C-końcową sekwencję wydzielniczą hemolizyny, opisaną w patencie amerykańskim nr 5,143,830, sekwencję wydzielniczą BAR1, ujawnioną w patencie amerykańskim nr 5,037,743, i część sekwencji sygnałowej polipeptydu zsig32, opisaną w patencie amerykańskim nr 6,025,197.

H. Obiekty docelowe funkcjonalnych kwasów nukleinowych

[0096] Funkcjonalne kwasy nukleinowe według wynalazku są nakierowane na gen lub transkrypt białka, który stymuluje lekooporność, inhibuje apoptozę lub przyczynia się do fenotypu nowotworowego. Pomyślne zastosowanie strategii funkcjonalnych kwasów nukleinowych w takich sytuacjach zostało już osiągnięte w stanie techniki, jednak bez korzyści z wektorów minikomórkowych. Zob. np. Sioud (2004), Caplen (2003), Wu et al. (2003), Nieth et al. (2003), Caplen i Mousses (2003), Duxbury et al. (2004), Yague et al. (2004), Duan et al. (2004),

[0097] Białka, które przyczyniają się do lekooporności stanowią korzystne obiekty docelowe funkcjonalnych kwasów nukleinowych. Białka mogą przyczyniać się do nabytej lekooporności lub do wewnętrznej lekooporności. Nabywanie opornego fenotypu występuje, gdy komórki objęte chorobą, takie jak komórki nowotworu, początkowo reagują na leki, ale stają się odporne po kolejnych cyklach leczenia. Przydatne obiekty docelowe zaangażowane w nabytą lekooporność obejmują, transportery mające kasetę wiążącą ATP, takie jak P-glikoproteina (P-gp, P-170, PGY1, MDR1, ABCB1, białko związane z MDR, białko oporności wielolekowej 1), MDR-2 i MDR-3, MRP2 (białko związane z opornością wielolekową), BCR-ABL (region klastrów złamań — protoonkogen Abelsona), STI-571 białko związane z opornością, białko związane z opornością w płucach, cyklooksigenaza 2, czynnik jądrowy kappa, XRCC1 (komplementacja krzyżowa uszkodzeń powodowanych promieniowaniem X; grupa 1), ERCC1 (gen wycięcia i komplementacji krzyżowej), GSTP1 (S-transferaza glutationowa), mutant β -tubuliny i czynniki wzrostu, takie jak IL-6 są dodatkowymi obiektami docelowymi zaangażowanymi w nabytą lekooporność. Gdy nielezione wcześniej komórki nie odpowiadają na jeden lub więcej leków, fenotyp oporności jest wewnętrzny. Przykład białka przyczyniającego się do wewnętrznej oporności to LRP (białko powiązane z opornością w płucach).

[0098] Użyteczne obiekty docelowe obejmują również białka, które przyczyniają się do

oporności na apoptozę. Obejmują one Bcl-2 (białaczkę z komórek B/chłoniaka), Bcl-X_L, A1/Bfl 1, kinazę adhezyjno-ogniskową i zmutowane białko p53.

[0099] Użyteczne obiekty docelowe obejmują ponadto białka onkogenne i zmutowane białka supresorowe nowotworów. Przykłady obejmują β-kateninę, PKC-α (kinazę białkową C), C-RAF, K-Ras (V12), helikazę RNA typu Dead box DP97, DNMT1 (metylotransferazę DNA 1), FLIP (białko hamujące podobne do Flice), C-Sfc, 53BP1, białko grupy Polycomb EZH2 (wzmacniacz homologu zeste), ErbB 1, HPV-16 E5 i E7 (wirus brodawczaka ludzkiego wczesny 5 i wczesny 7), fortilinę i MCI1P (białko 1 białaczki komórek szpikowych), DIP13α (białko 13a reagujące z DDC), MBD2 (domena wiążąca metylo CpG), p21, KLF4 (czynnik podobny do Kruppela 4), tpt/TCTP (białko guza kontrolowane przez translację), SPK1 i SPK2 (kinazę sfingozynową), P300, PLK1 (kinazę 1 podobną do Polo), Trp53, Ras, ErbB1, VEGF (czynnik wzrostu śródbłónka naczyniowego) oraz BAG-1 (atanogen 1 związany z BCL2).

[0100] W odniesieniu do zakażenia HIV, obiekty docelowe obejmują HIV-Tat, HIV-Rev, HIV-Vif, HIV-Nef, HIV-Gag, HIV-Env, LTR, CD4, CXCR4 (receptor chemokin) i CCR5 (receptor chemokin).

[0101] Ze względu na heterogeniczność komórek guza, wiele ścieżek oporności na różne leki lub oporności na apoptozę może być uruchamianych w komórkach docelowych. Zatem funkcjonalne kwasy nukleinowe stosowane w sposobach według wynalazku mogą wymagać zmiany w czasie. Na przykład, jeśli próbki biopsji ujawniają nowe mutacje, które prowadzą do nabytej lekooporności, to można zaprojektować swoiste siRNAs i kodować na odpowiednim plazmidzie do ekspresji, którym transformowany będzie szczep bakteryjny wytwarzający minikomórki, stosowany do produkcji rekombinowanych minikomórek, załadować go do nienaruszonych minikomórek, które są podawane w celu uzyskania odpowiedzi na nabytą lekooporność.

III. Sposób przewycięzania lekooporności i leczenia choroby

[0102] W kolejnym aspekcie wynalazek zapewnia sposób pokonywania lekooporności i leczenia podmiotu z choroby takiej jak rak lub AIDS. Sposób obejmuje (a) zapewnianie nienaruszonej minikomórki, która zawiera funkcjonalną cząsteczkę kwasu nukleinowego lub plazmid zawierający segment, który koduje funkcjonalną cząsteczkę kwasu nukleinowego, przy czym funkcjonalna cząsteczkę kwasu nukleinowego jest nakierowana na transkrypt białka, który stymuluje lekooporność, (b) doprowadzanie do kontaktu minikomórki z docelową komórką ssaczą, tak, że komórka ssacza pochłania minikomórkę i (c) dostarczanie leku do docelowej komórki ssaczej. Korzystnie, etap (c) prowadzi się po etapach (a) i (b), aby umożliwić funkcjonalnemu kwasowi nukleinowemu zmniejszenie oporności na lek przed podaniem leku. Dostarczanie leku i wprowadzanie funkcjonalnego kwasu nukleinowego może zachodzić kolejno, w dowolnej kolejności, lub równocześnie.

[0103] Według wynalazku, leki mogą być dostarczane dowolnymi konwencjonalnymi sposobami. Na przykład, leki mogą być dostarczane doustnie, pozajelitowo (w tym podskórnym, dożylnym, domięśniowym, dootrzewnowym i przez infuzję), miejscowo, przezskórnym lub przez inhalację. Odpowiedni tryb dostarczania i dawkowanie każdego leku jest łatwe do ustalenia przez znawców dziedzin medycznych.

A. Dostarczanie leku za pośrednictwem minikomórek

[0104] Chociaż dostarczanie leku może następować poprzez środki konwencjonalne, to korzystne jest dostarczanie przez minikomórki. Twórcy w tym zakresie stwierdzili, że te sa-

me komórki ssacze mogą ponownie być skutecznie transfekowane przez nakierowywane nienaruszone minikomórki, które są wypakowane różnymi zawartościami. Na przykład, minikomórki wypakowane plazmidem kodującym siRNA mogą transfekować komórkę ssaczą, po czym wypakowane lekiem minikomórki mogą dostarczać lek do tej samej komórki ssaczej. Stwierdzenie to było zaskakujące, i wskazuje, że wewnątrzkomórkowe procesy powiązane z rozpadem minikomórek, endosomalnym uwalnianiem zawartości i ucieczką zawartości do wewnątrzkomórkowych obiektów docelowych pozostają w pełni funkcjonalne po pierwszej rundzie transfekcji i dostarczania zawartości.

5
10
15
[0105] Lek może być pakowany do oddzielnej minikomórki względem tej dla funkcjonalnego kwasu nukleinowego lub plazmidu kodującego funkcjonalny kwas nukleinowy. Alternatywnie lek może być pakowany do tej samej minikomórki co funkcjonalna cząsteczka kwasu nukleinowego lub plazmid kodujący funkcjonalną cząsteczkę kwasu nukleinowego. Niektóre leki mogą oddziaływać z kwasami nukleinowymi i uniemożliwiają wspólne pakowanie leku i kwasu nukleinowego do tej samej minikomórki. Na przykład, wiadomo, że doksorubicyna oddziałuje z DNA.

20
[0106] Korzystnie minikomórki według wynalazku zawierają wystarczającą ilość leku do wywierania działania fizjologicznego lub farmakologicznego leku na docelową komórkę. Również korzystnie leki zawarte w obrębie minikomórek są heterologiczne lub obce minikomórkom, co oznacza, że macierzyste komórki bakteryjne minikomórek normalnie nie wytwarzają leku.

25
[0107] Zarówno leki hydrofilowe, jak i hydrofobowe mogą być pakowane do minikomórek przez tworzenie gradientu stężenia leku pomiędzy środowiskiem zewnątrzkomórkowym zawierającym minikomórki i cytoplazmą minikomórki. Gdy środowisko pozakomórkowe ma wyższe stężenie leku niż cytoplazma minikomórki, to lek naturalnie przesuwają się w dół tego gradientu stężenia, do cytoplazmy minikomórki. Jednak, gdy gradient stężenia jest odwrócony to lek nie wychodzi na zewnątrz z minikomórek.

30
35
[0108] W celu załadowania minikomórek lekami, które nie są zwykle rozpuszczalne w wodzie leki mogą być wstępnie rozpuszczane w odpowiednim rozpuszczalniku. Na przykład, paklitaksel może być rozpuszczany w mieszance 1:1 etanolu i kremoforu EL (polietoksyłowany olej rycynowy), a następnie przez rozcieńczenie w PBS w celu osiągnięcia roztworu paklitakselu, który jest częściowo rozpuszczony w mediach wodnych i nosi minimalne ilości rozpuszczalnika organicznego, dla zapewnienia, że lek pozostaje w roztworze. Minikomórki mogą być inkubowane w tym ostatecznym środowisku w celu obładowania lekiem. Zatem twórcy stwierdzili, że nawet leki hydrofobowe mogą dyfundować do cytoplazmy minikomórek, w celu osiągnięcia wysokiego i istotnego terapeutycznie obładowania lekiem cytoplazmy. Jest to nieoczekiwane, ponieważ błona minikomórki jest złożona z hydrofobowej dwuwarstwy fosfolipidowej, od której oczekiwano, że będzie ona zapobiegała dyfuzji cząsteczek hydrofobowych do cytoplazmy.

40
45
[0109] Inny sposób ładowania minikomórek lekiem obejmuje hodowanie rekombinowanych macierzystych komórek bakteryjnych w takich warunkach, że macierzysta komórka bakteryjna prowadzi transkrypcję i translację kwasu nukleinowego kodującego lek i lek jest uwalniany do cytoplazmy macierzystej komórki bakteryjnej. Na przykład, klastery genowy kodujący szlak biosyntezy komórkowej pożądanego leku może być klonowany i przenoszony do macierzystego szczepu bakterii, który jest zdolny do wytwarzania minikomórek. Transkrypcja genu i translacja klastru genowego skutkuje biosyntezą leku w obrębie cytoplazmy macierzystych komórek bakteryjnych, wypełniając lekiem cytoplazmę

bakteryjną. Gdy macierzysta komórka bakteryjna dzieli się i tworzy minikomórki potomne, to minikomórki również zawierają lek w swojej cytoplazmie. Wstępnie obciążone minikomórki mogą być oczyszczane dowolnym odpowiednim sposobem oczyszczania minikomórek, włączając metodologię opisaną powyżej.

- 5 **[0110]** Podobnie inny sposób obciążywania minikomórek lekiem obejmuje hodowanie rekombinowanej minikomórki, która zawiera plazmid do ekspresji kodujący lek w takich warunkach, że gen kodujący lek jest poddawany transkrypcji i translacji w obrębie minikomórki.

B. Leki

- 10 **[0111]** Leki użyteczne w wynalazku mogą oznaczać fizjologicznie lub farmakologicznie czynną substancję, która daje pożądane działanie miejscowe lub układowe u zwierząt, szczególnie ssaków i ludzi. Leki mogą oznaczać związki nieorganiczne lub organiczne, nieograniczająco, w tym peptydy, białka, kwasy nukleinowe i drobne cząsteczki, z których
15 w różnych postaciach, takich jak niezmienione cząsteczki, kompleksy cząsteczkowe, farmakologicznie dopuszczalne sole, takie jak chlorowodorek, bromowodorek, siarczan, laurynian, palmitynian, fosforan, azotyn, azotan, boran, octan, maleinian, winian, oleinian, salicylan i podobne. W przypadku leków kwasowych można stosować sole metali, aminy lub organiczne kationy, na przykład czwartorzędowe związki amoniowe. Można również sto-
20 sować pochodne leku, takie jak zasady, estry i amidy. Lek, który jest nierozpuszczalny w wodzie można stosować w postaci, która oznacza jej rozpuszczalną w wodzie pochodną, lub jako jej zasadową pochodną, która w którymkolwiek z przypadków, lub poprzez jej dostarczanie, jest konwertowana przez enzymy, hydrolizowana w pH organizmu, lub za pomocą innych procesów metabolicznych do wyjściowej terapeutycznie czynnej postaci.
- 25 **[0112]** Użyteczne leki obejmują środki chemoterapeutyczne, środki immunosupresyjne, cytokiny, środki cytotoksyczne, związki nukleolityczne, izotopy promieniotwórcze, receptory i enzymy aktywujące proleki, które mogą oznaczać występujące naturalnie lub produkowane sposobami rekombinacji.

- [0113]** Leki, na które oddziałuje klasyczna oporność wielolekowa mają szczególne zastosowanie w wynalazku, takie jak alkaloidy barwinka (np. winblastyna i winkrystyna), antracykliny (np. doksorubicyna i daunorubicyna), inhibitory transkrypcji RNA (np. aktynomycyna-D) i leki stabilizujące mikrotubule (np. paklitaksel). (Ambudkar et al., 1999)

- [0114]** Na ogół, środki do chemioterapii nowotworów oznaczają korzystnie leki. Użyteczne leki do chemioterapii nowotworów obejmują iperyty azotowe, nitrozomoczniki, etylenoiminy, alkanosulfoniary, tetrazynę, związki platyny, analogi pirymidyny, analogi puryny, antymetabolity, analogi kwasu foliowego, antracykliny, taksany, alkaloidy barwinka, inhibitory topoizomerazy i środki hormonalne. Przykładowe leki do chemioterapii to aktynomycyna-D, alkeran, Ara-C, anastrozol, asparaginaza, BiCNU, bikalutamid, bleomycyna,
35 busulfan, kapecytabina, karboplatyna, karboplatinum, karmustyna, CCNU, chlorambucil, cisplatyna, kladrybina, CPT-11, cyklofosfamid, cytarabina, arabinozyd cytozyny, cytoksan, dakarbazyna, daktynomycyna, daunorubicyna, deksrazoksan, docetaksel, doksorubicyna, DTIC, epirubicyna, etylenoimina, etopozyd, floksurydyna, fludarabina, fluorouracyl, flutamid, fotemustyna, gemcytabina, herceptin, heksametyloamina, hydroksymocznik, idarubicyna, ifosfamid, irynotekan, lomustyna, mechloretamina, melfalan, merkaptopuryna, metotreksat, mitomycyna, mitotan, mitoksantron, oksaliplatyna, paklitaksel, pamidronian,
45

pentostatyna, plikamycyna, prokarbazyna, rytuksymab, steroidy, streptozocyna, STI-571, streptozocyna, tamoksyfen, temozolomid, tenipozyd, tetrazyna, tioguanina, tiotepa, tomudeks, topotekan, treosulfan, trimetreksat, winblastyna, winkrystyna, windezyna, winorelbina, VP-16 i Xeloda.

- 5 **[0115]** Użyteczne leki do chemioterapii nowotworów obejmują również środki alkilujące takie jak tiotepa i cyklofosfamid; alkilosulfoniany, takie jak busulfan, improsulfan i piposulfan; azyrydiny, takie jak benzodopa, karbokwon, meturedopa i uredopa; etylenoiminy i metylamelaminy, w tym altretamina, trietylenomelamina, trietylenofosforamid, trietylenotiofosforoamid i trimetylolomelamina; pochodne iperytu azotowego, takie jak
- 10 chlorambucyl, chlornafazyna, cholofosfamid, estramustyna, ifosfamid, mechloretamina, chlorowodorek tlenu mechloretaminy, melfalan, Novembiehin, fenesteryna, prednimustyna, trofosfamid, iperyt uracylu; nitromoczniki, takie jak karmustyna, chlorozotocyna, fotemustyna, lomustyna, nimustyna i ranimustyna; antybiotyki, takie jak aklacynomizyny, aktynomycyna, autramycyna, azaseryna, bleomycyny, kaktynomycyna, kalicheamycyna,
- 15 karabicyna, karminomycyna, karzinofilina, chromomycyny, daktynomycyna, daunorubicyna, detorubicyna, 6-diazo-5-okso-L-norleucyna, doksorubicyna, epirubicyna, ezorubicyna, idarubicyna, marcellomycyna, mitomycyny, kwas mykofenolowy, nogalamycyna, oliwomycyny, peplomycyna, potfiromycyna, puromycyna, kwelamycyna, rodorubicyna, streptonigryna, streptozocyna, tubercydyna, ubenimeks, zynostatyna i zorubicyna; antymetabolity, takie jak metotrksat i 5-fluorouracyl (5-FU); analogi kwasu foliowego, takie jak denopteryna, metotreksat, pteropteryna i trimetrekstat, analogi puryny, takie jak fludarabina, 6-merkaptopuryna, tiamipryna i tioguanina; analogi pirymidyny, takie jak ancycytabina, azacytydyna, 6-azaurydyna, karmofur, cytarabina, dideoksyurydyna, doksyflurydyna, enocytabina, floksurydyna i 5-FU; androgeny, takie jak kalusteron, propionian dromostanolonu, epitiostanol, mepitiostan i testolakton; antagoniści hormonów kory nadnerczy, jak aminoglutetymid, mitotan i trilostan; środki uzupełniające kwas foliowy, takie jak kwas foliowy; aceglaton; glikozyd aldofosfamid, kwas aminolewulinowy; amsakryna; bestrabucyl; bisantren; edatraksat; defofamina; demekolcyna; diazykwon; elfomityna; octan eliptynium; etoglucyd; azotan galu; hydroksymocznik; lentinan; lonidamina; mitoguazon; mitoksantron; mopidamol; nitrakryna; pentostatyna; fenamet; pirarubicyna; kwas podofilinowy; 2-etylohydrazyd; prokarbazyna; PSK®; razoksan; sizofiran; spirogerman; kwas tenuazonowy; triazykwon; 2,2',2"-trichlorotrietyloamina; uretan; windezyna, dakarbazyna; mannomustyna; mitobronitol; mitolaktol; pipobroman; gacytozyna; arabinozyd („Ara-C”); cyklofosfamid; tiotepa; taksoidy, np. paklitaksel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ) i doksetaksel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer, Antony, Fran-
- 35 cja); chlorambucil; gemcytabina; 6-tioguanina; merkaptopuryna; metotreksat; analogi platyny, takie jak cisplatyna i karboplatyna; winblastyna; platyna; etopozyd (VP-16); ifosfamid; mitomycyna C; mitoksantron; winkrystyna; winorelbina; nawelbina; nowantron; tenipozyd; daunomycyna; aminopteryna; Xeloda; ibandronian; CPT-11; inhibitor topoizomazy RFS 2000; difluorometylornityna (DMFO); kwas retinowy; esperamicyny; kapecytabina; i farmaceutycznie dopuszczalne sole, kwasy lub pochodne którychkolwiek z powyższych. Uwzględniono również środki antyhormonalne, które działają w celu regulacji lub hamowania działania hormonu na nowotwory, takie jak anty-estrogeny, w tym na
- 40 przykład tamoksyfen, raloksyfen, inhibujące aromatazę 4(5)-imidazole, 4-hydroksytamoksyfen, trioksyfen, keoksyfen, onapriston i toremifen (Fareston); i antyandrogeny, takie jak flutamid, nilutamid, bikalutamid, leuprolid i goserelina; i farmaceutycznie dopuszczalne sole, kwasy lub pochodne którychkolwiek z powyższych.
- 45

[0116] Użyteczne leki obejmują również cytokiny. Przykładami takich cytokin są limfokiny, monokiny i tradycyjne hormony polipeptydowe. Pośród cytokin ujmuję się hormony wzrostu, takie jak ludzki hormon wzrostu, N-metionylowy ludzki hormon wzrostu i bydłęcy hormon wzrostu; hormon przytarczyc; tyroksynę; insulinę; proinsulinę; relaksynę; prorelaksynę; hormony glikoproteinowe, takie jak hormon folikulotropowy (FSH), tarczycowy hormon stymulujący (TSH) i hormon luteinizujący (LH); wątrobowy czynnik wzrostu; fibroblastowy czynnik wzrostu; prolaktynę; laktogen łożyskowy; czynnik martwicy nowotworów $-\alpha$ oraz $-\beta$; substancję hamującą funkcje przewodów Müllera; mysiej peptyd powiązany z gonadotropiną; inhibinę; aktywinę; naczyniowy śródbłonkowy czynnik wzrostu; integrynę; trombopoetynę (TPO); czynniki wzrostu nerwów, takie jak NGF- β ; płytkowy czynnik wzrostu; transformujące czynniki wzrostu (TGF) takie jak TGF- α i TGF- β ; insulinopodobne czynniki wzrostu $-I$ i $-II$; erytropoetynę (EPO); czynniki osteoinduktywne; interferony, takie jak interferon $-\alpha$, $-\beta$ i $-\gamma$; czynniki stymulujące wzrost hodowli (CSF) takie jak makrofag-CSF (M-CSF); granulocyt-makrofag-CSF (GM-CSF); i granulocyt-CSF (G-CSF); interleukiny (IL) takie jak IL-1, IL-1a, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12, IL-15; czynnik martwicy nowotworów taki jak TNF- α lub TNF- β ; i inne czynniki polipeptydowe, w tym LIF i ligand kit (KL). Według opisu, pojęcie cytokina obejmuje białka z naturalnych źródeł lub z rekombinowanej hodowli komórkowej i biologicznie czynne odpowiedniki natywnych sekwencji cytokin.

[0117] Leki mogą oznaczać proleki, aktywowane w dalszej kolejności przez enzym aktywujący prolek, który przekształca prolek, taki jak peptydylowy środek chemoterapeutyczny, do postaci czynnego leku przeciwnowotworowego. Zob. np. WO 88/07378, WO 81/01145; patent amerykański nr 4,975,278. Na ogół, składnik enzymatyczny obejmuje wszelkie enzymy zdolne do oddziaływania na prolek tak, aby podlegał konwersji do bardziej aktywnej, cytotoksycznej postaci.

IV. Kierowanie minikomórek do określonych komórek ssaczy

[0118] Według wynalazku, minikomórka jest kierowana do docelowej komórki ssacej za pośrednictwem dwuswoistego ligandu, jak opisano w WO 2005/056749. Dwuswoisty ligand, o swoistości zarówno dla składników minikomórki, jak i komórki ssacej, powoduje wiązanie minikomórki do komórki ssacej, tak, że minikomórka jest pochłaniana przez komórkę ssaczą, a komórka ssacza produkuje funkcjonalną cząsteczkę kwasu nukleinowego. Ten sposób ukierunkowanego dostarczania można realizować w warunkach *in vivo* lub *in vitro*, lub zarówno *in vivo*, jak i *in vitro*.

[0119] Kontakt pomiędzy dwuswoistym ligandem, minikomórką i komórką ssaczą może zachodzić na szereg różnych sposobów. W przypadku dostarczania *in vivo*, korzystne jest podawanie minikomórki, która ma już dołączony do niej dwuswoisty ligand. Stąd dochodzi do kontaktu wszystkich: minikomórki, dwuswoistego ligandu i komórki docelowej, gdy dwuswoisty ligand-ukierunkowana minikomórka osiąga komórkę docelową w warunkach *in vivo*. Alternatywnie, dwuswoisty ligand i minikomórka mogą być podawane oddzielnie *in vivo*.

[0120] Kontakt pomiędzy dwuswoistymi ligandami, minikomórkami i komórkami ssaczymi może również zachodzić podczas jednej lub więcej inkubacji *in vitro*. W jednym przykładzie wykonania trzy elementy są inkubowane ze sobą wszystkie naraz. Alternatywnie, można prowadzić inkubacje etapami. W jednym przykładzie podejścia etapowego, minikomórki i dwuswoiste ligandy są najpierw inkubowane razem, dla utworzenia dwu-

swoistego ligandu-ukierunkowanych minikomórek, które są następnie inkubowane z komórkami docelowymi. W kolejnym przykładzie dwuswoiste ligandy są najpierw inkubowane z komórkami docelowymi, z następczą inkubacją z minikomórkami. Kombinacja jednej lub więcej inkubacji *in vitro* i podawania *in vivo* również może doprowadzić do kontaktu dwuswoistych ligandów, minikomórek i ssących komórek docelowych.

[0121] Twórcy stwierdzili, że podejście ukierunkowanego dostarczania znajduje ogólne zastosowanie do komórek ssących, w tym komórek, które normalnie są odporne na swoistą adhezję i endocytozę minikomórek. Na przykład, dwuswoiste ligandy przeciwciała o swoistości anty-O-polisacharyd na jednym ramieniu i swoistości anty-receptor HER2 lub anty-receptor androgenu na drugim ramieniu skutecznie wiążą minikomórki do odnośnych receptorów na szeregu docelowych nefagocytykujących komórek. Te komórki obejmują komórki raka płuc, jajnika, mózgu, sutka, gruczołu krokowego i raka skóry. Ponadto, skuteczne wiązanie poprzedza szybką endocytozę minikomórek przez każdą z nefagocytykujących komórek.

[0122] Komórki docelowe według wynalazku obejmują wszelkie komórki, do których ma być wprowadzony funkcjonalny kwas nukleinowy. Pożądane komórki docelowe są scharakteryzowane przez ekspresję receptora powierzchniowego komórki, co — po związaniu ligandu — ułatwia endocytozę. Korzystne komórki docelowe są nefagocytykujące, co oznacza, że komórki nie są wyspecjalizowanymi fagocytami, takimi jak makrofagi, komórki dendrytyczne i komórki naturalnych zabójców (NK). Korzystne komórki docelowe również oznaczają komórki ssące.

[0123] Ligandy użyteczne w sposobach ukierunkowanego dostarczania według wynalazku obejmują wszelkie środki, które wiążą się do składnika powierzchniowego na komórce docelowej i do składnika powierzchniowego na minikomórce. Korzystnie, składnik powierzchniowy na komórce docelowej oznacza receptor, szczególnie receptor zdolny do pośredniczenia w endocytozie. Ligandy mogą zawierać polipeptyd i/lub składnik węglowodanu. Przeciwciała oznaczają korzystne ligandy. Na przykład, dwuswoiste przeciwciało, które niesie podwójne swoistości dla składnika powierzchniowego na nienaruszonych minikomórkach pochodzenia bakteryjnego i dla składnika powierzchniowego na docelowych komórkach ssących, można skutecznie stosować do nakierowywania minikomórek na komórki docelowe ssące *in vitro* i *in vivo*. Użyteczne ligandy obejmują również receptory, enzymy, peptydy wiążące, białka fuzyjne/chimeryczne i drobne cząsteczki.

[0124] Selekcję określonego ligandu prowadzi się na podstawie dwóch głównych kryteriów: (i) swoiste wiązanie do jednej lub więcej domen na powierzchni nienaruszonych minikomórek i (ii) swoiste wiązanie do jednej lub więcej domen na powierzchni komórek docelowych. Stąd ligandy korzystnie mają pierwsze ramię, które niesie swoistość dla struktury powierzchniowej nienaruszonej minikomórki pochodzenia bakteryjnego i drugie ramię, które niesie swoistość dla struktury powierzchniowej komórki ssącej. Każde z pierwszego i drugiego ramienia mogą być wielowartościowe. Korzystnie, każde ramię jest monoswoiste, nawet jeśli jest wielowartościowe.

[0125] Do celów wiązania do minikomórek pochodzenia bakteryjnego, pożądane jest, dla jednego ramienia ligandu, aby było swoiste dla składnika O-polisacharydowego lipopolisacharydu znajdowanego na macierzystej komórce bakteryjnej. Inne struktury powierzchniowe minikomórki, które można wykorzystać do wiązania ligandu obejmują polipeptydy eksponowane na powierzchni komórki i węglowodany na błonach zewnętrznych, eksponowane na powierzchni komórki segmenty peptydów pilli, fimbri i wici.

[0126] Do celów wiązania do komórek docelowych, jedno ramię ligandu jest swoiste dla składnika powierzchniowego komórki ssaczey. Takie składniki obejmują białka, peptydy i węglowodany powierzchni komórkowej, czy to scharakteryzowane czy niescharakteryzowane. Receptory powierzchniowe komórki, szczególnie te zdolne do aktywowania endocytozy za pośrednictwem receptora, są pożądanymi składnikami powierzchniowymi komórki do nakierowywania. Takie receptory, jeśli są nadeksprymowane na powierzchni komórki docelowej nadają dodatkową selektywność dla nakierowywania na komórki do leczenia, zmniejszając tym samym możliwość dostarczania do komórek innych niż docelowe.

[0127] W charakterze przykładu, można nakierowywać się na komórki nowotworowe, komórki przerzutowe, komórki układu naczyniowego, takie jak komórki śródbłónka i komórki mięśni gładkich, komórki płuc, komórki nerek, komórki krwi, komórki szpiku kostnego, komórki mózgu, komórki wątroby itd., lub prekursorzy wszelkich wybranych komórek, poprzez selekcję ligandu, który swoiście wiąże motyw receptora powierzchniowego komórki na pożądanym komórkach. Przykłady receptorów powierzchniowych komórki obejmują antygen karcynoembrionalny (CEA), który jest nadeksprymowany w większości nowotworów okrężnicy, odbytu, sutka, płuca, trzustki i przewodu pokarmowego (Marshall, 2003); receptory hereguliny (HER-2, *neu* lub *c-erbB-2*), które są często nadeksprymowane w rakach sutka, jajnika, okrężnicy, płuca, gruczołu krokowego i raka szyjki macicy (Hung *et al.*, 2000); receptor naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR), który podlega wysokiej ekspresji w wielu nowotworach litych, w tym tych sutka, głowy i szyi, niedrobnokomórkowego raka płuc i gruczołu krokowego (Salomon *et al.*, 1995); receptor asjaloglikoproteiny (Stockert, 1995); receptor transferyny (Singh, 1999); receptor kompleksu enzymatycznego serpiny, który jest eksprymowany na hepatocytach (Ziady *et al.*, 1997); receptor fibroblastowego czynnika wzrostu (FGFR), który jest nadeksprymowany na komórkach gruczolakoraka przewodowego trzustki (Kleeff *et al.*, 2002); receptor czynnika wzrostu śródbłónka naczyniowego (VEGFR), do terapii genowej przeciw angiogenezie (Becker *et al.*, 2002; Hoshida *et al.*, 2002); receptor folianu, który jest selektywnie nadeksprymowany w 90% raków nieszluzotwórczych jajnika (Gosselin i Lee, 2002); glikokalks powierzchni komórki (Batra *et al.*, 1994); receptory węglowodanów (Thurnher *et al.*, 1994); i polimeryczny receptor immunoglobulin, który jest użyteczny przy dostarczaniu genów do komórek nabłónka oddechowego i atrakcyjny do leczenia chorób płuc, takich jak zwłóknienie torbielowate (Kaetzel *et al.*, 1997).

[0128] Korzystne ligandy obejmują przeciwciała i/lub pochodne przeciwciała. Według opisu pojęcie „przeciwciało” obejmuje cząsteczkę immunoglobuliny uzyskaną na drodze generowania *in vitro* lub *in vivo* odpowiedzi immunogennej. Pojęcie „przeciwciało” obejmuje poliklonalne, monoswoiste i monoklonalne przeciwciała, jak również pochodne przeciwciał, takie jak pojedynczołańcuchowe fragmenty przeciwciał (scFv). Przeciwciała i pochodne przeciwciał użyteczne w wynalazku można również otrzymać technikami rekombinowanego DNA.

[0129] Przeciwciała typu dzikiego mają cztery polipeptydowe łańcuchy, dwa identyczne łańcuchy ciężkie i dwa identyczne łańcuchy lekkie. Oba typy polipeptydowych łańcuchów mają regiony stałe, które nie są zróżnicowane lub różnią się w minimalnym stopniu pomiędzy przeciwciałami z tej samej klasy, i regiony zmienne. Regiony zmienne są unikatowe dla określonego przeciwciała i zawierają domenę wiążącą antygen, która rozpoznaje swoisty epitop. Regiony domeny wiążącej antygen, które są najbardziej bezpośrednio zaangażowane w wiązanie przeciwciała to „regiony determinujące komplementarność”

(CDR).

[0130] Pojęcie „przeciwciała” obejmuje również pochodne przeciwciał, takie jak fragmenty przeciwciał, które zachowują zdolność wiązania się swoiście do antygenów. Takie fragmenty przeciwciał obejmują fragmenty Fab (fragment, który zawiera domenę wiążącą antygen i zawiera łańcuch lekki i część łańcucha ciężkiego, połączone mostkiem wiązania dwusiarczkowego), Fab' (fragment przeciwciała zawierający pojedynczą domenę wiążącą antygen zawierającą Fab i dodatkową część łańcucha ciężkiego, przez region zawiasowy, F(ab')₂ (dwie cząsteczki Fab' połączone przez wiązania dwusiarczkowe między łańcuchami w regionach zawiasowych łańcuchów ciężkich), dwuswoiste Fab (cząsteczka Fab mająca dwie domeny wiążące antygeny, z których każda może być skierowana na inny epitop) i scFv (zmienny, wiążący antygen determinujący region pojedynczego łańcucha lekkiego i ciężkiego przeciwciała, połączony łańcuchem aminokwasów).

[0131] Gdy przeciwciała, w tym fragmenty przeciwciał, stanowią część lub całość ligandów, są one korzystnie pochodzenia ludzkiego lub są modyfikowane, aby były odpowiednie do stosowania u ludzi. Tzw. „humanizowane przeciwciała” są dobrze znane ze stanu techniki. Zob. np. Osbourn et al., 2003. Modyfikowano je za pomocą manipulacji genetycznej i/lub traktowania *in vitro* dla zmniejszenia ich antygenowości u człowieka. Sposoby humanizowania przeciwciał są opisane, np. w amerykańskich patentach nr 6,639,055, nr 5,585,089 i nr 5,530,101. W najprostszym przypadku, humanizowane przeciwciała są tworzone przez przeszczepianie pętli wiążących antygen, znanych jako regiony determinujące komplementarność (CDR), z mysiego mAb na ludzkie IgG. Zob. Jones et al., 1986; Riechmann et al., 1988; Verhoeyen et al., 1988. Generowanie humanizowanych przeciwciał o wysokim powinowactwie wymaga jednak na ogół przeniesienia jednej lub więcej dodatkowych reszt z tzw. regionów zrębowych (FR) mysiego macierzystego mAb. Opracowano również kilka wariantów technologii humanizowania. Zob. Vaughan et al., 1998.

[0132] W wynalazku można również stosować ludzkie przeciwciała, raczej niż „humanizowane przeciwciała”. Mają one wysokie powinowactwo dla ich odnośnych antygenów i są rutynowo otrzymywane z bardzo dużych, pojedynczołańcuchowych fragmentów zmiennych (scFv) lub bibliotek Fab do prezentacji fagowej. Zob. Griffiths et al., 1994; Vaughan et al., 1996; Sheets et al., 1998; de Haard et al., 1999; i Knappik et al., 2000.

[0133] Użyteczne ligandy obejmują również dwuswoiste pojedynczołańcuchowe przeciwciała, które typowo oznaczają rekombinowane polipeptydy składające się z części zmiennej łańcucha lekkiego kowalencyjnie dołączonej przez cząsteczkę łącznika do odpowiadającej części zmiennej łańcucha ciężkiego. Zob. patenty amerykańskie nr 5,455,030, nr 5,260,203 i nr 4,496,778. Dwuswoiste przeciwciała można również otrzymywać innymi sposobami. Na przykład, można generować chemiczne heterokoniugaty, przez chemiczne łączenie nienaruszonych przeciwciał lub fragmentów przeciwciał o różnych swoistościach. Zob. Karpovsky et al., 1984. Jednak takie heterokoniugaty są trudne do otrzymania w powtarzalny sposób i są co najmniej dwukrotnie większe niż normalne monoklonalne przeciwciała. Dwuswoiste przeciwciała można również generować przez wymianę dwusiarczków, co jest powiązane z cięciem enzymatycznym i reasocjacją fragmentów przeciwciał. Zob. Glennie et al., 1987.

[0134] Ponieważ fragmenty Fab i scFv są jednowartościowe, mają one często niskie powinowactwo dla struktur docelowych. Tym samym, korzystne ligandy otrzymywane z tych składników są wprowadzane na drodze inżynierii do dimerycznych, trimerycznych lub tetramerycznych koniugatów, dla zwiększenia powinowactwa funkcjonalnego. Zob.

Tomlinson i Holliger, 2000; Carter, 2001; Hudson i Souriau, 2001; i Todorovska et al., 2001. Takie struktury koniugatów można generować za pomocą sieciowania chemicznego i/lub genetycznego.

5 [0135] Dwuswoiste ligandy według wynalazku korzystnie są monoswoiste na każdym z końców, tj. swoiste dla pojedynczego składnika na minikomórkach na jednym końcu i swoiste dla pojedynczego składnika na komórkach docelowych na drugim końcu. Ligandy mogą być wielowartościowe na jednym lub obu końcach, na przykład, w postaci tzw. diaciała, triciała i tetraciała. Zob. Hudson i Souriau, 2003. Diaciało oznacza dwuwartościowy dimer utworzony poprzez niekowalencyjne połączenie dwóch scFv, które daje dwa miejsca
10 wiążące Fv. Podobnie, triciało jest wynikiem utworzenia trójwartościowego trimeru trzech scFv, co daje trzy miejsca wiążące, a tetraciało jest wynikiem utworzenia czterowartościowego tetrameru czterech scFv, co daje cztery miejsca wiążące.

15 [0136] Kilka humanizowanych, ludzkich i mysich monoklonalnych przeciwciał i ich fragmentów, które mają swoistości dla receptorów na komórkach ssaczych zatwierdzono do użytku terapeutycznego u ludzi, a lista ta gwałtownie się rozrasta. Zob. Hudson i Souriau, 2003. Przykład takiego przeciwciała, które można stosować do utworzenia jednego ramienia dwuswoistego ligandu ma swoistość dla HER2: Herceptin™; Trastuzumab.

20 [0137] Regiony zmienne przeciwciała można również sprzęgać do szerokiej gamy białkowych domen. Fuzja z domenami ludzkiej immunoglobuliny, takimi jak CH3 IgG1 zarówno zwiększa masę, jak i stymuluje dimeryzację. Zob. Hu et al., 1996. Fuzja z ludzkimi regionami zawiasowymi Ig Fc może dodać funkcje efektorowe. Również, fuzja do heterologicznych domen białka z multimerowych białek stymuluje multimeryzację. Na przykład, stosowano fuzję krótkiego scFv do krótkich amfipatycznych helis, do celów produkcji mini-przeciwciał. Zob. Pack i Pluckthun, 1992. Domeny z białek, które tworzą heterodimery, 25 takich jak fos/jun, można stosować do produkcji dwuswoistych cząsteczek (Kostelny et al., 1992) oraz, alternatywnie, domeny homodimeryzacji można modyfikować na drodze inżynierii, dla utworzenia heterodimerów za pomocą strategii inżynierii takich jak „knobs-into-holes” [tworzenie wypukłości pasujących do otworów] (Ridgway et al., 1996). Wreszcie, można prowadzić selekcję partnerów białka fuzyjnego, która zapewni zarówno multimeryzację, jak również dodatkową funkcję, np. streptawidyna. Zob. Dubel et al., 1995.
30

V. Dostarczanie do komórek kompetentnych pod kątem fagocytozy lub endocytozy

35 [0138] Wynalazek zapewnia dodatkowo dostarczanie, poprzez doprowadzanie do kontaktu minikomórek pochodzenia bakteryjnego z komórkami ssaczymi, które są kompetentne pod kątem fagocytozy lub endocytozy. Takie komórki ssacze, które są zdolne do pochłonięcia macierzystych komórek bakteryjnych sposobem wewnątrzkomórkowych bakteryjnych patogenów, podobnie pochłaniają minikomórki, które uwalniają swoją zawartość w cytoplazmie komórek ssaczych. Takie podejście do dostarczania może być prowadzone bez użycia ukierunkowanych ligandów.

40 [0139] Szereg mechanizmów może być zaangażowanych w pochłanianie minikomórek przez dany typ komórki, a wynalazek nie jest pod tym względem zależny od żadnego określonego mechanizmu. Na przykład, fagocytoza jest dobrze udokumentowanym procesem, w którym makrofagi i inne komórki fagocytów, takie jak neutrofile, pochłaniają cząstki przez wydłużanie nibynózek nad powierzchnią cząstki, do momentu całkowitego pochłonięcia cząstki. Chociaż opisuje się to jako „nieswoistą” fagocytozę, wykazano udział swoi-
45 stych receptorów w procesie. Zob. Wright i Jong (1986); Speert et al., (1988).

[0140] Stąd jedna postać fagocytozy wymaga oddziaływań pomiędzy ligandami powierzchniowymi i receptorami ligandów znajdującymi się w błonach nibynózek (Shaw i Griffin, 1981). Ten etap przyłączenia, regulowany przez swoiste receptory, uważa się za zależny od bakteryjnych adhezyn powierzchniowych. W odniesieniu do mniej wirulentnych bakterii, takich jak nieenterotoksynogenne *E. coli*, fagocytoza może również zachodzić pod nieobecność ligandów powierzchniowych dla receptorów fagocytów. Zob. np. Pikaar et al. (1995). Stąd wynalazek obejmuje, nieograniczająco, stosowanie minikomórek, które mają — lub nie — adhezyny powierzchniowe, w zgodzie z naturą ich macierzystych komórek bakteryjnych, i są pochłaniane przez fagocyty (tj. „kompetentne pod kątem fagocytozy” komórki gospodarza), z których neutrofile i makrofagi są głównymi rodzajami u ssaków.

[0141] Kolejnym procesem pochłaniania jest endocytoza, za pomocą której wewnątrzkomórkowe patogeny, na przykładzie gatunków *Salmonella*, *Escherichia*, *Shigella*, *Helicobacter*, *Pseudomonas* i *Lactobacilli* uzyskują dostęp do ssaczych komórek nabłonkowych, gdzie podlegają replikacji. Dwa podstawowe mechanizmy w tym zakresie to endocytoza zależna od klatryny, regulowana przez receptor, znana również jako „endocytoza opłaszczonych jamek [klatrynowych]” (Riezman, 1993) i endocytoza niezależna od klatryny (Sandvig & Deurs, 1994). Jedna lub obie mogą być zaangażowane, gdy kompetentna pod kątem pochłaniania komórka, która działa na drodze endocytozy (tj. „kompetentna pod kątem endocytozy” komórka gospodarza) pochłania minikomórki zgodnie z wynalazkiem. Reprezentatywne kompetentne pod kątem endocytozy komórki oznaczają komórki nabłonkowe sutka, enterocyty w przewodzie pokarmowym, komórki nabłonkowe żołądka, komórki nabłonkowe płuc i komórki nabłonkowe przewodu moczowego i pęcherza moczowego.

[0142] Przy prowadzeniu dostarczania do kompetentnej pod kątem pochłaniania komórki ssaczej bez stosowania ukierunkowującego ligandu, charakter rozważanego zastosowania będzie wpływać na wybór bakteryjnego źródła użytych minikomórek. Na przykład, gatunki *Salmonella*, *Escherichia* i *Shigella* niosą adhezyny, które są rozpoznawane przez pośredniczące w endocytozie receptory na enterocytach w przewodzie pokarmowym, i mogą być odpowiednie do dostarczenia leku, który jest skuteczny wobec komórek raka okrężnicy. Podobnie, minikomórki pochodzące od *Helicobacter pylori*, niosące adhezyny swoiste dla komórek nabłonkowych żołądka, mogą być odpowiednie do dostarczania nakierowanego na komórki raka żołądka. Inhalacja lub insuflacja mogą być idealne do podawania nienaruszonych minikomórek pochodzących z gatunku *Pseudomonas*, który niesie adhezyny rozpoznawane przez receptory na komórkach nabłonka płuc. Minikomórki pochodzące z bakterii *Lactobacilli*, które niosą adhezyny swoiste dla komórek nabłonkowych układu moczowego i pęcherza moczowego, mogą być dobrze dostosowane do dostarczenia leku do cewki moczowej w przypadku raka dróg moczowych lub raka pęcherza moczowego.

VI. Formulacje

[0143] Wynalazek obejmuje zakresem kompozycje, lub formulacje jak zdefiniowano powyżej. Funkcjonalny kwas nukleinowy może oznaczać dowolny z przedstawionych w opisie siRNA, shRNA, rybozymów lub cząsteczek antysensownych. Funkcjonalny kwas nukleinowy może również być kodowany przez inny kwas nukleinowy, taki jak plazmid, jak przedstawiono w opisie. Kwas nukleinowy kodujący funkcjonalny kwas nukleinowy może mieć dowolne z elementów regulatorowych lub elementów reporterowych, jak przedstawiono w opisie.

[0144] Formulacja opcjonalnie zawiera lek, jak przedstawiono w opisie. Korzystnie, minikomórka z formulacji zawiera lek. Alternatywnie, minikomórka może zawierać cząsteczkę kwasu nukleinowego, taką jak plazmid, który koduje lek.

5 [0145] Stąd formulacje zawierające minikomórkę korzystnie zawierają mniej niż około 1 zanieczyszczającą macierzystą komórkę bakteryjną na 10^7 minikomórek, bardziej korzystnie zawierają mniej niż około 1 zanieczyszczającą macierzystą komórkę bakteryjną na 10^8 minikomórek, nawet bardziej korzystnie zawierają mniej niż około 1 zanieczyszczającą macierzystą komórkę bakteryjną na 10^9 minikomórek, jeszcze bardziej korzystnie zawierają mniej niż około 1 zanieczyszczającą macierzystą komórkę bakteryjną na 10^{10} minikomórek i najbardziej korzystnie zawierają mniej niż około 1 zanieczyszczającą macierzystą komórkę bakteryjną na 10^{11} minikomórek.

15 [0146] Jak zdefiniowano powyżej, formulacje również zawierają dwuswoisty ligand do ukierunkowywania minikomórki na komórkę docelową. Minikomórka i ligand mogą oznaczać dowolne z tych przedstawionych w opisie. Stąd minikomórka zawiera kwas nukleinowy kodujący funkcjonalny kwas nukleinowy i dwuswoisty ligand jest zdolny do wiązania się do składnika powierzchniowego minikomórki i do składnika powierzchniowego docelowej komórki ssacej.

20 [0147] Można otrzymywać formulację składającą się zasadniczo z minikomórek oraz, opcjonalnie leków, według wynalazku (to jest, formulacja, która obejmuje takie minikomórki, leki i ligandy z innymi składowymi, które nie interferują nadmiernie z kwasem nukleinowym lub właściwościami dostarczania leku dla kompozycji), w konwencjonalny sposób, przy użyciu jednego lub więcej farmaceutycznie dopuszczalnych nośników lub rozczynników.

25 [0148] Formulacje można prezentować w jednostkowej postaci dawkowania, np. w ampułkach lub fiolkach, lub w pojemnikach z wieloma dawkami, z dodanym konserwantem lub bez. Formulacja może występować w postaci roztworu, zawiesiny lub emulsji w olejowych lub wodnych zaróbkach, i może zawierać środki do formułowania, takie jak środki zawieszające, stabilizujące i/lub dyspergujące. Odpowiedni roztwór jest izotoniczny z krwią biorcy i ilustrują go roztwór soli fizjologicznej, roztwór Ringera i roztwór dekstrozy. Alternatywnie, formulacje mogą mieć postać liofilizowanego proszku, do odtworzenia z odpowiednią zaróbką, np. jałową wodą wolną od pirogenów lub roztworem soli fizjologicznej. Formulacje mogą również mieć postać preparatu do umieszczenia w tkankach. Takie formulacje o długotrwałym działaniu można podawać przez wszczepienie (na przykład podskórnym lub domięśniowo) lub przez wstrzyknięcie domięśniowe.

35 A. Drogi podawania

[0149] Formulacje według wynalazku mogą być podawane różnymi drogami i do różnych miejsc w organizmie ssaka, dla osiągnięcia pożądanego działania terapeutycznego, miejscowo lub układowo. Dostarczenie można osiągnąć, na przykład, przez podawanie doustne, przez podanie formulacji do jamy ciała, przez inhalację lub insuflację, lub przez podawanie pozajelitowe, domięśniowe, dożylnie, do żyły wrotnej, wewnątrzwartrobowe, otrzewnowe, podskórne, dorakowe lub śródskórne. Tryb i miejsce podawania zależą od lokalizacji komórek docelowych. Na przykład, komórki torbielowate z włóknieniem mogą być skutecznym celem dla dostarczania w drodze inhalacji ukierunkowanych minikomórek. Podobnie, przerzut nowotworu można skuteczniej leczyć poprzez dożylnie dostarczanie ukierunkowanych minikomórek. Pierwotny rak jajnika można leczyć na drodze podawania śródtrzewnowego ukierunkowanych minikomórek.

B. Czystość

[0150] Minikomórki według wynalazku są zasadniczo wolne od zanieczyszczających macierzystych komórek bakteryjnych. Stąd formułacje zawierające minikomórkę według wynalazku korzystnie zawierają mniej niż około 1 zanieczyszczającą macierzystą komórkę bakteryjną na 10^7 minikomórek, bardziej korzystnie zawierają mniej niż około 1 zanieczyszczającą macierzystą komórkę bakteryjną na 10^8 minikomórek, nawet bardziej korzystnie zawierają mniej niż około 1 zanieczyszczającą macierzystą komórkę bakteryjną na 10^9 minikomórek, jeszcze bardziej korzystnie zawierają mniej niż około 1 zanieczyszczającą macierzystą komórkę bakteryjną na 10^{10} minikomórek i najbardziej korzystnie zawierają mniej niż około 1 zanieczyszczającą macierzystą komórkę bakteryjną na 10^{11} minikomórek.

[0151] Sposoby oczyszczania minikomórek są znane ze stanu techniki i opisane w WO 03/033519. Jeden taki sposób łączy filtrację w przepływie krzyżowym (przepływ nadawy jest równoległy do powierzchni membrany; Forbes, 1987) i filtrację typu dead-end [z przepływem jednokierunkowym] (przepływ nadawy jest prostopadły do powierzchni membrany). Opcjonalnie, kombinację filtracji może poprzedzać wirowanie różnicowe, przy niskiej sile odśrodkowej, dla usunięcia pewnej części komórek bakteryjnych i w konsekwencji wzbogacenia supernatantu w minikomórki.

[0152] Kolejny sposób oczyszczania wykorzystuje wirowanie w gradiencie gęstości w ośrodku biologicznie kompatybilnym. Po wirowaniu pasmo minikomórek zbiera się z gradientu, oraz, opcjonalnie, minikomórki są poddawane kolejnym rundom wirowania w gradiencie gęstości, dla zwiększenia czystości. Sposób może dodatkowo obejmować wstępny etap prowadzenia wirowania różnicowego na próbce zawierającej minikomórki. Przy prowadzeniu w niskiej sile odśrodkowej, wirowanie różnicowe usunie pewną część macierzystych komórek bakteryjnych, wzbogacając tym samym supernatant w minikomórki.

[0153] Szczególnie skuteczne sposoby oczyszczania wykorzystują włókienka bakteryjne do zwiększenia czystości minikomórek. Stąd, sposób oczyszczania minikomórek może obejmować etapy (a) poddawania próbki zawierającej minikomórki na działanie stanu, który indukuje w macierzystych komórkach bakteryjnych przybieranie postaci włókienkowej, z następczym (b) filtrowaniem próbki, do uzyskania oczyszczonego preparatu minikomórek.

[0154] Znane sposoby oczyszczania minikomórek można również łączyć. Jedną wysoce skuteczną kombinacją sposobów jest jak następuje:

35 Krok A: Różnicowe wirowanie produkującej minikomórki hodowli komórek bakteryjnych. Ten etap, który można prowadzić przy 2000 g przez około 20 minut, usuwa większość macierzystych komórek bakteryjnych, pozostawiając równocześnie minikomórki w supernatancie.

40 Krok B: Wirowanie w gradiencie gęstości przy użyciu izotonicznego i nietoksycznego ośrodka na potrzeby wykonania gradientu gęstości. Ten etap oddziela minikomórki od wielu zanieczyszczeń, w tym macierzystych komórek bakteryjnych, z minimalną utratą minikomórek. Korzystnie, etap ten jest powtarzany w ramach metody oczyszczania.

45 Krok C: Filtracja w przepływie krzyżowym przez filtr $0,45\ \mu\text{m}$ dla dalszego zmniejszenia zanieczyszczenia macierzystymi komórkami bakteryjnymi.

Krok D: Indukowane stresem tworzenie włókienek w pozostałych macierzystych komórkach bakteryjnych. Można tego dokonać przez poddawanie zawiesiny minikomórek działaniu dowolnego z kilku stresogennych warunków środowiskowych.

5 Krok E: Traktowanie antybiotykiem w celu zabicia macierzystych komórek bakteryjnych.

10 Krok F: Filtracja w przepływie krzyżowym, w celu usunięcia drobnych zanieczyszczeń, takich jak pęcherzyki błonowe, fragmenty błon, pozostałości bakteryjne, kwasy nukleinowe, składniki pożywek itd., i dla zateżenia minikomórek. Można zastosować filtr 0,2 μm do oddzielenia minikomórek od drobnych zanieczyszczeń, a filtr 0,1 μm można stosować do zateżenia minikomórek.

Krok G: Filtracja typu dead-end, dla usunięcia włóknikowych martwych komórek bakteryjnych. Można zastosować filtr 0,45 μm w tym etapie.

Krok H: Usuwanie endotoksyn z preparatu minikomórek. Można stosować kulki magnetyczne pokryte anty-lipidem A w tym etapie.

15 C. Schematy podawania

20 **[0155]** Na ogół, formułacje ujawnione w opisie można stosować w odpowiednich dawkowaniach, zdefiniowanych w rutynowych testach, dla otrzymania optymalnego efektu fizjologicznego, z równoczesnym minimalizowaniem wszelkiej potencjalnej toksyczności. Schemat dawkowania można dobrać zgodnie z szeregiem czynników, w tym takich jak

25 **[0156]** Optymalna precyzja w osiągnięciu stężeń minikomórek i leku w zakresie, który daje maksymalną skuteczność z minimalnymi działaniami niepożądanymi może wymagać schematu opartego na kinetyce minikomórki i dostępności leku dla miejsc docelowych i komórek docelowych. Dystrybucję, równowagę i usuwanie minikomórek lub leku można rozważyć przy określaniu optymalnego stężenia na potrzeby schematu leczenia. Dawkowanie minikomórek i leków można dostosowywać, przy stosowaniu w kombinacji, dla osiągnięcia pożądanego efektu.

30 **[0157]** Ponadto, podawanie dawek formułacji można optymalizować stosując system modelowania farmakokinetycznego/farmakodynamicznego. Na przykład, można wybrać jeden lub więcej schematów dawkowania, a model farmakokinetyczny/farmakodynamiczny można stosować do określenia profilu farmakokinetycznego/farmakodynamicznego jednego lub więcej schematów dawkowania. Następnie można wybrać jeden schemat dawkowania do podawania, dla którego osiąga się pożądaną odpowiedź farmakokinetyczną/ farmakodynamiczną na podstawie określonego profilu farmakokinetycznego/ farmakodynamicznego. Zob. np. WO 00/67776.

[0158] Swoiście, formułacje mogą być podawane co najmniej raz na tydzień w ciągu kilku tygodni. W jednym przykładzie wykonania, formułacje są podawane co najmniej raz w tygodniu przez kilka tygodni do kilku miesięcy.

40 **[0159]** Dokładniej, formułacje mogą być podawane co najmniej raz dziennie przez około 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 lub 31 dni. Alternatywnie, formułacje mogą być podawane około raz dziennie, około raz na 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 lub 31 dni lub więcej.

[0160] Formulacje mogą alternatywnie być podawane około raz na tydzień, około raz na 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 lub 20 tygodni lub więcej. Alternatywnie, formulacje mogą być podawane co najmniej raz na tydzień przez około 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 lub 20 tygodni lub więcej.

- 5 [0161] Alternatywnie, formulacje mogą być podawane około raz na miesiąc, około raz na 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 lub 12 miesięcy lub więcej.

[0162] Formulacje można podawać w pojedynczej dawce dziennej, lub całkowite dawkowanie dzienne można podawać w dawkach podzielonych dwa, trzy lub cztery razy dziennie.

- 10 [0163] W sposobie, w którym minikomórki są podawane przed lekiem, podawanie leku może zachodzić w dowolnym czasie, od kilku minut do kilku godzin po podaniu minikomórek. Lek można alternatywnie podawać w dowolnym czasie, od kilku godzin do kilku dni, potencjalnie kilka tygodni aż do kilku miesięcy po minikomórkach.

- 15 [0164] Dokładniej, minikomórki można podawać co najmniej około 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 lub 24 godziny przed lekiem. Ponadto, minikomórki mogą być podawane co najmniej około 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 lub 31 dni przed podaniem leku. Minikomórki mogą być podawane co najmniej około 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 lub 20 tygodni lub więcej przed lekiem. Minikomórki mogą
20 być podawane co najmniej około 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 lub 12 miesięcy przed lekiem.

- [0165] W innym przykładzie wykonania minikomórka jest podawana po leku. Podawanie minikomórek może zachodzić w dowolnym czasie, od kilku minut do kilku godzin po podaniu leku. Minikomórki można alternatywnie podawać w dowolnym czasie, od kilku godzin do kilku dni, potencjalnie kilka tygodni aż do kilku miesięcy po leku.
25

- [0166] Poniższe przykłady mają wyłącznie charakter ilustrujący, a nieograniczający, i zapewniają pełniejsze zrozumienie wynalazku. Przykłady demonstrują, że lekooporne komórki nowotworowe można skutecznie leczyć *in vivo* poprzez (1) podawanie ukierunkowanych rekombinowanych minikomórek niosących sekwencje RNAi zaprojektowane do zmniejszania lub eliminowania ekspresji genu (genów) kodujących lekooporność i (2) podawanie ukierunkowanych, wypakowanych lekiem minikomórek niosących lek, na który
30 uwrażliwiono komórki rakowe.

Przykład 1. Plazmidy do ekspresji anty-MDR1 i anty-bcl-2 shRNA i oczyszczanie rekombinowanych minikomórek.

- 35 [0167] Rekombinowane minikomórki niosące plazmidy kodujące sekwencje shRNA (Mdr1 lub bcl-2) generowano jak następuje. Sekwencja Mdr1 shRNA zastosowana w tym badaniu była opisana przez Wu et al., 2003 (5'-TCGA AAGAAACCAACTGTCAGTGTA gactactg TACTACTGACAGTTGGTTTCTT TTTT-3') (SEQ ID NO: 1) a użyta sekwencja snRNA bcl-2 była jak opisano w Wacheck et al., 2003 (5'-
40 TCGATGTGGATGACTGAGTACCTGA gactactg TCAGGTACTCAGTCATCCA-CATTTT-3') (SEQ ID NO: 2). Odnosne sekwencje shRNA syntetyzowano i indywidualnie podklonowywano do plazmidu IMG-800 (Imgenex Corp., San Diego, CA, USA) tak, że sekwencje mogły być eksprymowane z plazmidowego promotora U6. Plazmid niesie miejsce inicjacji replikacji pUC, które umożliwia osiągnięcie dużej liczby kopii plazmidu w
45 komórkach bakteryjnych. Rekombinowane plazmidy sekwencjonowano, dla zapewnienia,

że sekwencje shRNA były poprawne i w ramce odczytu do ekspresji z promotora U6. Rekombinowanymi plazmidami transformowano zmutowany szczep *S. typhimurium* minCDE, a minikomórki niosące plazmidy oczyszczano jak opisano w U.S.7611885. Rekombinowane minikomórki oznaczano odpowiednio jako minikomórki_{shRNA-MDR1} i mini-
5 komórki_{shRNA-bcl2}.

Przykład 2. Zademonstrowanie kierowanego receptorem rekombinowanego dostarczenia plazmidu shRNA za pośrednictwem minikomórek do lekoopornych komórek rakowych i odwracanie lekooporności w warunkach *in vitro*.

[0168] Gdy wykazano, że siRNA skierowane przeciwko szeregowi różnych kodujących lekooporność transkryptów odwracają lekooporność w komórkach rakowych *in vitro*, krytyczną przeszkodą jest ukierunkowane dostarczanie siRNA do komórek rakowych, szczególnie *in vivo*. Rekombinowane minikomórki niosące plazmid anty-MDR1 shRNA (minikomórki_{shRNA-MDR1}) i kontrola shRNA przeciwko nonsensownej sekwencji RNA (minikomórki_{shRNA-nonsense}) oczyszczano i otrzymywano dwuswoiste przeciwciało niosące swoistośći przeciwko antygenowi O *S. typhimurium* i przeciwko ludzkiemu EGFR i dołączano do rekombinowanych minikomórek, jak opisano w zgłoszeniu patentowym WO 2005/056749. Ukierunkowane rekombinowane minikomórki oznaczano jako ^{EGFR}minikomórki_{shRNA-MDR-1} i ^{EGFR}minikomórki_{shRNA-nonsense}. Otrzymywano również minikomórki upakowane chemoterapeutykami 5-FU i irynotekaniem, ukierunkowane jak powyżej i oznaczano odpowiednio
20 jako ^{EGFR}minikomórki_{5-FU} i ^{EGFR}minikomórki_{Iryno}.

[0169] Wybrano linię komórkową ludzkiego raka okrężnicy Caco-2 (ATCC), która jest wysoce oporna na irynotekan i 5-FU, na potrzeby tego badania *in vitro* przede wszystkim, aby określić, czy ukierunkowane na EGFR rekombinowane minikomórki mogą z powodzeniem dostarczać plazmidy shRNA do komórek rakowych i po drugie, czy ekspresja anty-MDR-1 siRNA może odwracać lekooporność i uczynić komórki Caco-2 wrażliwymi na ukierunkowane na EGFR i wypakowane lekiem minikomórki. Komórki Caco-2 zaszczepiano po 3 x 10⁶ komórek na kolbę z pożywką Minimum Essential Medium, z 10% surowicą typu cosmic calf i inkubowano przez 3 godziny w 37°C, 5% CO₂.
25

[0170] Komórki traktowano (a) ^{EGFR}minikomórkami_{shRNA-MDR-1}, oraz (b) ^{EGFR}minikomórkami_{shRNA-nonsense}. Uwzględniono kontrolną kolbę, bez żadnego traktowania. Minikomórki dodawano w stężeniu 10¹⁰ na kolbę, i inkubowano wszystkie kolby przez 72 godz. Komórki z każdego traktowania trypsynizowano i zaszczepiano po 1x10⁴ komórek/ml/studzienkę w 24-studzienkowych płytkach i inkubowano przez 3 godz. w 37°C, 5% CO₂. Kontrolę z nietraktowanych komórek następnie inkubowano z (6 studzienek/traktowanie) (a) wolnym irynotekaniem (25 μM), (b) wolnym 5-FU (25 μM), (c) ^{EGFR}minikomórkami_{Iryno}, i (d) ^{EGFR}minikomórkami_{5-FU}.
30
35

[0171] Traktowane ^{EGFR}minikomórkami_{shRNA-MDR-1} komórki Caco-2 inkubowano z (6 studzienek/traktowanie) (a) ^{CMV}minikomórkami_{5-FU} (nieswoiście ukierunkowane jako że dwuswoiste przeciwciało jest ukierunkowane na powierzchniowe białko na cytomegalowirusie), (b) wolnym irynotekaniem, (c) wolnym 5-FU, (d) ^{EGFR}minikomórkami_{Iryno}, i (e) ^{ERFR}minikomórkami_{5-FU}. Traktowane ^{EGFR}minikomórkami_{shRNA-nonsense} komórki Caco-2 traktowano następnie ^{EGFR}minikomórkami_{5-FU}.
40

[0172] Wszystkie komórki inkubowano przez kolejne 72 godz., a następnie wykonywano kolorymetryczne oznaczenie MTT proliferacji komórek (Cory et al., 1991) przy użyciu oznaczenia proliferacji komórek CellTiter 96 AQueous One Solution (Promega Corp., Madison, WI, USA), według instrukcji producenta. Pomiar kolorymetryczne odczytywano
45

przy 490 nm.

[0173] Wyniki pokazały, że (fig. 1) komórki Caco-2 były wysoce odporne na leki pierwszego rzutu do chemioterapii, dla raka okrężnicy, tj. irynotekan i 5-FU. Ponadto, komórki pozostały odporne po traktowaniu EGFR minikomórkami_{iryno}, EGFR minikomórkami_{5-FU} i EGFR minikomórkami_{shRNA-MDR-1}. Komórki, które otrzymały podwójne leczenie, tj. EGFR minikomórki_{shRNA-MDR-1} a następnie EGFR minikomórki_{iryno} lub EGFR minikomórki_{5-FU} pokazały, że to leczenie było wysoce skuteczne w odwracaniu lekooporności, i po pojedynczej kombinacji leczenia obserwowano śmierć >50% komórek. Kontrastowo, a podwójne traktowanie EGFR minikomórkami_{shRNA-nonsense} a następnie EGFR minikomórkami_{5-FU} nie miało wpływu na lekooporność, co sugeruje, że ekspresja anty-MDR-1 shRNA w komórkach Caco-2 była swoiście odpowiedzialna za odwrócenie lekooporności. Kombinacja traktowania EGFR minikomórkami_{shRNA-MDR-1} a następnie wolnym irynotekaniem lub 5-FU była również skuteczna w odwracaniu lekooporności, ale w mniejszym stopniu co dało ~30% zmniejszenie przeżywalności komórek. Te dane również sugerują, że dostarczanie chemoterapeutyku za pośrednictwem kierowanych receptorem i wypakowanych lekiem minikomórek może dostarczać większe stężenie leku wewnątrzkomórkowo w porównaniu do wolnego leku zapewnionego w środowisku pozakomórkowym.

[0174] Wynik ten wykazał, że (a) shRNA mogą być skutecznie dostarczane do niefagocytujących komórek ssaczych za pośrednictwem kierowanych receptorem rekombinowanych minikomórek, (b) funkcjonalny kwas nukleinowy (shRNA) kodujący plazmidy ucieka od wewnątrzkomórkowych organelli, w których minikomórki są rozkładane, (c) plazmid jest transportowany do jądra komórki ssaczej, w którym shRNA jest ekspymowany, (d) shRNA jest skuteczny w degradowaniu mRNA kodującego białko oporności wielolekowej, MDR-1, (e) te same komórki ssacze są wrażliwe na kolejną falę kierowanych receptorem minikomórek, które niosą teraz lek zamiast plazmidu, (f) protokół podwójnego traktowania, tj. dostarczania shRNA za pośrednictwem kierowanych receptorem minikomórek, a następnie dostarczania chemoterapeutyku za pośrednictwem kierowanych receptorem minikomórek jest wysoce skuteczne w odwracaniu lekooporności w niefagocytujących komórkach ssaczych.

Przykład 3. Zademonstrowanie w warunkach *in vivo* regresji nowotworu osiągnięte sposobem według wynalazku tj. podwójnego traktowania za pośrednictwem kierowanych receptorem dostarczających shRNA minikomórek, a następnie dostarczanie leku za pośrednictwem minikomórek.

[0175] Ten przykład demonstruje, że kierowane receptorem minikomórki można stosować do odwracania lekooporności w komórkach rakowych w warunkach *in vivo*.

[0176] Pochodzące od *S. typhimurium* minikomórki minCDE oczyszczano i upakowywano chemoterapeutykami — irynotekaniem. 7×10^9 minikomórek w roztworze BSG wirowano, supernatant odrzucano, i minikomórki zawieszano ponownie w 940 μ l BSG i 60 μ l roztworu irynotekanu (1 mg/ml; rozpuszczony w sterylnej wodzie destylowanej). Zawiesinę inkubowano przez noc w 37°C z obracaniem, aby umożliwić irynotekaniowi dyfuzję do cytoplazmy minikomórki. Nadmiar irynotekanu nieswoiście wiązał się do zewnętrznej powierzchni minikomórek, i był następnie odmywany za pomocą ultrafiltracji komórek z mieszaniem, jak następuje. Składano komorę Amicon do ultrafiltracji z mieszaniem, model 8010 (Millipore, Billerica, MA, USA) według instrukcji producenta, z dyskiem membrany ultrafiltracyjnej (polieterosulfon; odcięcie przy masie cząsteczkowej 300 kDa; Millipore). Komórki przemywano trzykrotnie sterylną wodą destylowaną, a następnie kolejno

- trzy razy BSG. Komorę wypełniano następnie 9 ml świeżego BSG i dodawano 1 ml roztworu upakowanych irynotekaniem minikomórek. Komorę trzymano pod ciśnieniem 10 psi, mieszano do momentu zmniejszenia objętości do 5 ml i przykrywano 5 ml BSG. Ultrafiltrację kontynuowano do momentu, gdy objętość ponownie spadła do 5 ml. Procedurę przykrywania/ultrafiltracji wykonywano 6 krotnie, aby umożliwić dokładne odmycie zewnętrznych powierzchni minikomórek upakowanych irynotekaniem. Podczas ostatniej ultrafiltracji, objętość zmniejszono do 1 ml, a próbkę przeniesiono do sterylnej próbówki Eppendorf, a następnie wirowano przy 13,200 rpm przez 10 minut, osadzić wypakowane irynotekaniem minikomórki.
- 5
- 10 **[0177]** Dwuswoiste przeciwciało konstruowano jak opisano powyżej i w opublikowanym amerykańskim zgłoszeniu patentowym nr 2004-0265994. Pokróćce, lipopolisacharyd anty-*S. typhimurium* (Biodesign, Saco, Maine, USA) i anty-ludzki receptor naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR) mysich monoklonalnych przeciwciał (Oncogene Research Products, Cambridge, MA, USA) łączono z oczyszczonym rekombinowanym białkiem A/G za pośrednictwem fragmentów Fc każdego monoklonalnego przeciwciała. Wybrano monoklonalne przeciwciało anty-EGFR, ponieważ komórkami heteroprzeszczepu były komórki rakowe ludzkiego raka okrężnicy (Caco-2) które są znane z nadekspresji EGFR na powierzchni komórki (Nyati et al., 2004).
- 15
- 20 **[0178]** Oczyszczone rekombinowane białko A/G (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA) rozcieńczano do stężenia końcowego 100 µg/ml w buforze wiążącym Immunopure (Pierce Biotechnology) i 0,5 ml roztworu inkubowano przez noc w 4°C ze wstępnie zmieszonym roztworem zawierającym 20 µg/ml każdego z monoklonalnych przeciwciał anty-*S. typhimurium* LPS i anty-human EGFR. Nadmiar przeciwciała niezwiązany do białka A/G usuwano następnie jak następuje. Roztwór białka G Dynabeads® (Dynabeads® [2,8 µm] powlekany rekombinowanym Białkiem G kowalencyjnie sprzęganym do powierzchni kulek magnetycznych; Dynal Biotech, Oslo, Norwegia) delikatnie mieszano i przenoszono 100 µl roztworu do próbówki Eppendorf do wirowania. Probówkę umieszczano w Dynal MPC-S (urządzenie do zatężania cząstek magnetycznych, typ S) dla immobilizacji kulek, i odrzucano supernatant. Kulki zawieszano ponownie w 0,5 ml roztworu odmywającego 30 zawierającego 0,1M bufor Na-fosforanowy (pH 5,0). Etapy immobilizacji kulek i odmywania powtarzano trzykrotnie. Roztwór zawierający mieszaninę białka A/G-dwuswoistego przeciwciała dodawano do kulek i inkubowano z łagodnym mieszaniem w temperaturze pokojowej przez 40 min. Probówkę umieszczano na stojaku MPC-S dla immobilizacji kulek i pipetą usuwano białko A/G-dwuswoiste przeciwciało. Ten etap eliminował niezwiązany nadmiar monoklonalnych przeciwciał i zapewniał roztwór, który niósł dwuswoiste przeciwciało połączone z białkiem A/G za pośrednictwem ich fragmentów Fc. Rekombinowane minikomórki inkubowano z białkiem A/G-dwuswoistym przeciwciałem przez 1 godz. w temperaturze pokojowej, aby pokryć minikomórki przeciwciałem za pośrednictwem jego regionu Fab anty-LPS.
- 35
- 40 **[0179]** Myszy stosowane w tym przykładzie zakupiono od Animal Resources Centre (Perth, WA, Australia), i wszystkie doświadczenia na zwierzętach prowadzono zgodnie z wytycznymi opieki nad i stosowania zwierząt laboratoryjnych, po uzyskaniu akceptacji Animal Ethics Committee. Doświadczenia prowadzono w małej placówce dla zwierząt, z akredytacją NSW Agriculture w EnGeneIC Pty Ltd (Sydney, New South Wales, Australia).
- 45
- Ludzkie komórki raka okrężnicy (Caco-2, ATCC) hodowano w hodowli tkankowej w pożywce RPMI 1640 z dodatkiem 5% bydlęcej surowicy cielęcej (GIBCO-BRL Life Technologies, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA), i glutaminy (Invitrogen)

w atmosferze z nawilżaniem, z 95% powietrza i 5% CO₂ w 37°C. 1 x 10⁶ komórek w 50 µl pożywki wolnej od surowicy mieszano z 50 µl czynnika wzrostu ze zredukowanym matrycelem (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) i wstrzykiwano podskórnie pomiędzy łopatki każdej myszy, przy użyciu igły o rozmiarze 23G. Nowotwory mierzono dwa razy w tygodniu, przy użyciu elektronicznej suwmiarki cyfrowej (Mitutoyo, Japonia, dokładność do 0,001) i wyliczano średnią objętość nowotworu przy użyciu wzoru, długość (mm) x szerokość² (mm) X 0,5 = objętość (mm³). Rozpoczynano różne terapie po tym, jak nowotwory osiągnęły objętości pomiędzy 50 mm³ i 80 mm³, i randomizowano myszy do ośmiu różnych grup po 11 na grupę.

[0180] Różne grupy otrzymywały poniższe leczenie: **Grupa 1 (kontrola)** nie otrzymywała żadnego leczenia. **Grupa 2 (kontrola)**, wolny irynotekan (1,2 x 10⁴ ng/g masy ciała myszy ~2,4 x 10⁵ ng na mysz), dożylnie. Tę kontrolę uwzględniono dla potwierdzenia wyników *in vitro*, że komórki nowotworowe były odporne na lek. **Grupa 3 (kontrola)**, ukierunkowane EGFR, wypakowane irynotekaniem minikomórki (oznaczone jako EGFR⁺minikomórki_{Iryno}). **Grupa 4 (kontrola)**, EGFR⁺minikomórki_{shRNA-MDR-1}. **Grupa 5 (kontrola)**, EGFR⁺minikomórki_{shRNA-bcl-2}. **Grupa 6 (kontrola)**, EGFR⁺minikomórki_{shRNA-MDR-1}, a następnie wolny irynotekan. **Grupa 7 (doświadczalna)**, EGFR⁺minikomórki_{shRNA-MDR-1}, a następnie EGFR⁺minikomórki_{Iryno}. **Grupa 8 (expt.)**, EGFR⁺minikomórki_{shRNA-bcl-2}, a następnie EGFR⁺minikomórki_{Iryno}. Badania ilościowe irynotekanu za pomocą HPLC pokazały, że 5 x 10⁸ minikomórek upakowało ~80 ng leku. Wszystkie traktowania minikomórkami obejmowały 5 x 10⁸ minikomórek, a traktowanie shRNA podawano w dniach 9 i 23. Wszystkie traktowania lekiem podawano w dniach 15, 18, 29 i 32. Zapewniło to sześciodniową przerwę pomiędzy traktowaniem shRNA i lekiem, dla zapewnienia, że upłynęło wystarczająco dużo czasu na wewnątrzkomórkowe i jądrowe dostarczanie shRNA, ekspresję genu i supresję ekspresji białka regulującego lekooporność, tj. MDR-1 lub bcl-2.

[0181] Wyniki ujawniły (fig. 2) uderzający kontrast pomiędzy średnimi objętościami nowotworu w grupach kontrolnych (G 1 do 6) i grupach doświadczalnych (G 7 i 8). Objętości nowotworu w grupach doświadczalnych ulegały szybkiej stabilizacji i wykazywały znaczną stabilizację u większości z 11 zwierząt w każdej grupie. Dla kontrastu, średnie objętości nowotworu we wszystkich innych grupach kontrolnych ciągle wzrastały, i do dnia 36 po ustanowieniu heteroprzeszczepu zakończono doświadczenie, gdyż zwierzęta kontrolne były zbyt obciążone chorobą. Doświadczalne zwierzęta, z drugiej strony, były zdrowe i nie wykazywały żadnych toksycznych działań niepożądanych leczenia. Analiza statystyczna danych przy użyciu jednokierunkowej analizy ANOVA wykazała, że grupy doświadczalne (7 i 8) były wysoce istotne w porównaniu do grup kontrolnych 1 do 6 ($p = 0,0004$). Wynik ten jest pierwszym zademonstrowaniem ukierunkowanego dostarczania *in vivo* shRNA, dla zaradzenia poważnemu problemowi lekooporności w raku. Wynik zademonstrował również, że wynalazek ma zastosowanie ogólne, ponieważ dwa mechanistycznie różne sposoby lekooporności, tj. nadeksprymowane powiązane z błoną białko pompy (MDR-1) i cytoplazmatyczne białko anty-apoptotyczne (bcl-2), mogą ulegać obniżeniu ekspresji w lekoopornych komórkach rakowych w warunkach *in vivo*. Traktowanie tych samych komórek kolejną falą kierowanych receptorem, wypakowanych chemoterapeutykami minikomórek mogłoby skutecznie leczyć takie nowotwory.

Przykład 4. Drugie zademonstrowanie w warunkach *in vivo* skuteczności regresji nowotworu osiąganego sposobem według wynalazku tj. podwójnego traktowania za pośrednictwem minikomórek dostarczających shRNA, a następnie za pośrednictwem minikomórek dostarczających lek.

[0182] Komórki rakowe jelita grubego są również znane z tego, że są wysoce odporne na inny chemoterapeutyk pierwszego rzutu, 5-fluorouracyl (5-FU), a ten przykład pokazuje, że sposoby według wynalazku umożliwiają nie tylko odwrócenie lekooporności w warunkach *in vivo*, ale również umożliwiają osiągnięcie stabilizacji/ regresji nowotworu.

5 [0183] Jak opisano powyżej, minikomórki otrzymywano ze zmutowanego szczepu *S. typhimurium minCDE* i oczyszczano przy użyciu wirowania gradientowe-
go/filamentacji/ filtracji/procedury usuwania endotoksyn. Podobnie otrzymywano rekombinowane minikomórki niosące plazmidy shRNA, shRNA-MDR-1, shRNA-bcl-2 i
10 shRNA-nonsens i oczyszczono z odnośnych rekombinowanych szczepów *S. typhimurium minCDE*. Oczyszczone puste minikomórki wypakowywano chemoterapeutykami 5-FU jak opisano dla irynotekanu w Przykładzie 3. Stosowano analizę HPLC do określenia stężenia 5-FU upakowanego w minikomórkach.

[0184] Dwuswoiste przeciwciało zawierające podwójne swoistości anty-ludzki EGFR i anty-antygen O *S. typhimurium* konstruowano jak opisano w Przykładzie 3. Rekombinowane
15 minikomórki (10^{10}) inkubowano z dwuswoistym przeciwciałem przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej, aby pokryć minikomórki przeciwciałem za pośrednictwem jego regionu Fab anty-antygeny O.

[0185] Heteroprzeszczepy linii komórkowej Caco-2 ustanowiono u myszy rasy Balb/c nude i po tym, jak nowotwory osiągnęły objętość pomiędzy 50 mm^3 i 80 mm^3 , myszy randomizowano do 10 grup ($n = 11$ myszy na grupę). Dożylne leczenie obejmowało: (a) **G1** — jedynie kontrola — nowotwór. **G2 (kontrola)**, wolny 5-FU ($5 \times 10^4 \text{ ng/g}$ masy ciała myszy $\sim 1 \times 10^6 \text{ ng}$ na mysz). Tę kontrolę uwzględniono dla potwierdzenia wyników *in vitro*, że komórki nowotworowe były odporne na lek. **G3 (kontrola)**, ukierunkowane EGFR, wypakowane 5-FU minikomórki (oznaczone jako $^{\text{EGFR}}$ minikomórki_{5-FU}). **G4 (kontrola)**,
25 $^{\text{EGFR}}$ minikomórki_{shRNA-MDR-1}. **G5 (kontrola)**, $^{\text{EGFR}}$ minikomórki_{shRNA-bcl-2}. **G6 (kontrola)**, $^{\text{EGFR}}$ minikomórki_{shRNA-MDR-1}, a następnie $^{\text{CMV}}$ minikomórki_{5-FU}. Przeciwciało CMV jest ukierunkowane na białko powierzchniowe na cytomegalowirusie i służy to jako nieswoiście ukierunkowana kontrola. **G7 (kontrola)**, $^{\text{EGFR}}$ minikomórki_{shRNA-nonsens}, a następnie $^{\text{EGFR}}$ minikomórki_{5-FU}. **G8 (kontrola)**, $^{\text{EGFR}}$ minikomórki_{shRNA-MDR-1}, a następnie wolny 5-FU.
30 **G9 (expt)**, $^{\text{EGFR}}$ minikomórki_{shRNA-MDR-1}, a następnie $^{\text{EGFR}}$ minikomórki_{5-FU}. **G10 (expt)**, $^{\text{EGFR}}$ minikomórki_{shRNA-bcl-2}, a następnie $^{\text{EGFR}}$ minikomórki_{5-FU}. Wszystkie traktowania shRNA podawano w dniach 9 i 23, a traktowanie lekiem podawano w dniach 15, 18, 29 i 32. Zapewniło to sześciodniową przerwę pomiędzy traktowaniem shRNA i lekiem, dla zapewnienia, że upłynęło wystarczająco dużo czasu na wewnątrzkomórkowe i jądrowe dostarczanie shRNA, ekspresję genu i supresję ekspresji białka regulującego lekooporność,
35 tj. MDR-1 lub bcl-2.

[0186] Wyniki ujawniły (fig. 3) uderzający kontrast pomiędzy średnimi objętościami nowotworu w grupach kontrolnych (G 1 do 8) i grupach doświadczalnych (G 9 i 10). Objętości nowotworu w grupach doświadczalnych ulegały szybkiej stabilizacji u większości z 11
40 zwierząt w każdej grupie. Kontrastowo, średnie objętości nowotworu we wszystkich innych grupach kontrolnych ciągle wzrastały, i do dnia 36 po ustanowieniu heteroprzeszczepu zakończono doświadczenie, gdyż zwierzęta kontrolne były zbyt obciążone chorobą. Doświadczalne zwierzęta, z drugiej strony, były zdrowe i nie wykazywały żadnych toksycznych niepożądanych działań leczenia. Analiza statystyczna danych przy użyciu jednokierunkowej analizy ANOVA wykazała, że grupy doświadczalne (9 i 10) były wysoce istotne w porównaniu do grup kontrolnych 1 do 8 ($p = 0,0008$).

Przykład 5. Zademonstrowanie regresji nowotworu w warunkach *in vivo* osiągniętego w opornych na doksoorubicynę komórkach ludzkiego raka sutka sposobem według wynalazku.

[0187] Twórcy wykazali, że ludzka linia komórkowa gruczolakoraka sutka, MDA-MB-468 jest wysoce wrażliwa na doksoorubicynę, i że mysie heteroprzeszczepy traktowane dożylnie EGFR minikomórkami_{Dox} ulegają stabilizacji/regresji.

[0188] W tym przykładzie, komórki MDA-MB-468 hodowano w hodowli tkankowej i traktowano wzrastającymi stężeniami Dox, aby uzyskać klon oporny na Dox. Jest dobrze ugruntowanym, że takie traktowanie lekiem w warunkach *in vitro* i *in vivo* podwyższa ekspresję białek oporności wielolekowej, takich jak MDR-1 i bcl-2. Otrzymano kilka klonów opornych wobec Dox, i użyto jednego do ustanowienia heteroprzeszczepu u myszy rasy Balb/c nude. Grupy traktowane dożylnie ($n = 11$ myszy na grupę) obejmowały **G2** — EGFR minikomórki_{Dox} i **G3** — EGFR minikomórki_{shRNA-MDR-1}, a następnie EGFR minikomórki_{Dox}. **G1** myszy stanowiły jedynie kontrolę nowotworu. Traktowanie shRNA podawano w dniu 15 21, a traktowanie lekiem podawano w dniach 27, 34 i 41.

[0189] Wyniki pokazały (fig. 4), że traktowanie EGFR minikomórkami_{shRNA-MDR-1}, a następnie EGFR minikomórkami_{Dox} u myszy G3 było wysoce skuteczne w odwracaniu oporności na Dox w komórkach rakowych, i że nowotwory uległy stabilizacji. Traktowanie kontrolne EGFR minikomórkami_{Dox} (G2) pokazało, że komórki nowotworowe były wysoce odporne na Dox i nowotwory szybko wzrastały.

Przykład 6. Zademonstrowanie w warunkach *in vivo* wpływu schematów dawkowania na odwracanie lekooporności i efekt terapeutyczny.

[0190] Ten przykład demonstruje wpływ schematów dawkowania na odwracanie lekooporności i efekt terapeutyczny. Zapewnienie wystarczającego czasu na skuteczne dostarczenie shRNA do komórek nowotworowych przed podaniem kierowanych receptorem, wypakowanych lekiem minikomórek poprawia wyniki. Wykonano doświadczenie przebiegu czasowego, przy czym EGFR minikomórki_{shRNA-MDR-1} podawano dożylnie u myszy nude niosących heteroprzeszczep komórek Caco-2. W oddzielnych grupach ($n = 11$ myszy na grupę), myszom podawano EGFR minikomórki_{Iryno} po 96 godz. (**G3**), 120 godz. (**G4**) lub 144 godz. (**G5**) po traktowaniu EGFR minikomórkami_{shRNA-MDR-1}. **G1** i **G2** oznaczały jedynie kontrole nowotworu i wolnego irynotekanu ($\sim 2,4 \times 10^5$ ng/dawkę). Minikomórki podawano po 5×10^8 na dawkę i każda dawka miała ~ 80 ng irynotekanu upakowanego w minikomórkach, co stanowi dawkę 3,000-krotnie niższą niż ta podawana jako wolny lek. Wyniki pokazały (fig. 5) wyraźną korelację pomiędzy czasem zapewnionym na ekspresję shRNA i późniejszym podawaniem EGFR minikomórek_{Iryno} przy czym 144 godz. (**G5**) były najbardziej skuteczne w odwracaniu lekooporności i osiągnięciu istotnego efektu terapeutycznego.

Przykład 7. Drugie zademonstrowanie w warunkach *in vivo* wpływu schematów dawkowania na odwracanie lekooporności i efekt terapeutyczny.

[0191] Ten przykład demonstruje, że wpływ schematu dawkowania obserwowany w przykładzie 6 ma szerokie zastosowanie.

[0192] Doświadczenie opisane w przykładzie 6 powtarzano z tymi samymi kontrolami i grupami doświadczalnymi, za wyjątkiem tego, że G2 otrzymywała wolny 5-FU (1×10^6 ng /dawkę) i w G3, G4 i G5, drugie traktowanie prowadzono za pomocą EGFR minikomórek_{5-FU}. Minikomórki podawano po 1×10^9 na dawkę i każda dawka miała ~ 80 ng 5-

FU, tj. ~12,500-krotnie mniej niż wolny lek podawany w G2 myszom.

[0193] Wyniki pokazały (fig. 6) że podawanie ^{EGFR}minikomórek_{5-FU} po 144 godz. po podaniu ^{EGFR}minikomórek_{shRNA-MDR-1} (G5) skutkowało maksymalną skutecznością w odwracaniu lekooporności i terapeutyczną skutecznością. Potencjał wynalazku jest ewidentny, wobec stężenia leku wymaganego do skutecznego leczenia tych wysoce opornych nowotworów, jako że minikomórki niosły 3,000-krotnie i 12,500-krotnie mniej leku w porównaniu odpowiednio do traktowania wolnym irynotekaniem i 5-FU. Wolne leki nie miały wpływu na wzrost nowotworu, jak obserwowano na fig. 5 i 6.

Literatura

10 [0194]

- Ambudkar, et al., *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39: 361 (1999).
- Antoku, et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 286: 1003 (2001).
- Ayesh et al., *Anticancer Drugs*, 7(6): 678-86 (1996)
- Ayesh et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 1316(1): 8-18 (1996)
- 15 Bakhshi, et al., *Cell*, 41: 899 (1985).
- Bargou, et al., *Int. J. Cancer*, 60: 854 (1995).
- Batra et al., *Gene Ther.* 1(4): 255-60 (1994).
- Becker et al., *Cancer Biol Ther.*, 1(5):548-53 (2002).
- Bredel, *Brain Res. Rev.*, 35: 161 (2001).
- 20 Britton et al., *Genes Dev.*, 12: 1254 (1998).
- Broxterman et al., *Cancer Lett.*, 35(1): 87-95 (1987).
- Brummelkamp, et al., *Science* 296:550 (2002).
- Caplen, *Expert Opin. Biol. Ther.*, 3(4): 575-86 (2003).
- Caplen and Mousses, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1002: 5 56-62 (2003).
- 25 Carter, P. *Nat Rev Cancer*, 1(2): 118-29 (2001).
- Chen, et al., *Int. J. Cancer*, 93: 107 (2001).
- Ciliberto et al., *Cell*. 41: 531 (1985).
- Cole et al., *Science* 258:1650-1654 (1992).
- Collins & Olive, *Biochem.* 2795-99 (1993).
- 30 Cory et al., *Cancer Commun.* 3: 207-212 (1991).
- Cory, S. *Annu. Rev. Immunol.*, 13: 513-543 (1995).
- de Boer et al., *J. Bacteriol.* 174: 63 (1992).
- de Haard, H. J. et al. *J. Biol. Chem.* 274, 15 18218-18230 (1999).
- Doige et al., *Ann. Rev. Microbiol.*, 47: 291-319 (1993).
- 35 Dubel et al., *J. Immunol. Methods*, 178: 201-209 (1995).
- Duan et al., *Mol. Cancer Therapeutics*, 3(7): 833-38 (2004).

- Duxbury et al., *J. Am. Coll. Surg.*, 198: 953-59 (2004).
- Elbashir et al., *Genes Dev.*, 15(2):188-200 (2001).
- Elbashir et al., *Nature*, 411(6836):494-8 (2001).
- Endicott et al., *Ann. Rev. Biochem.*, 58 : 137-71 (1989).
- 5 Fardel et al., *Gen Pharmacol.*, 27(8):1283-1291 (1996).
- Forbes, *Australian J. Biotechnology* 1: 30 (1987).
- Frain et al., *Mol. Cell Biol.*, 10: 991 (1990).
- Frankel et al., *Leukemia*, 14: 576-585 (2000).
- Gariboldi et al., *Int. J. Oncology*, 22: 1057-64 (2003).
- 10 Glennie et al., *J. Immunol.*, 139(7):2367-75 (1987).
- Gosselin et al., *Biotechnol. Annu. Rev.*, 8:103-31 (2002).
- Gottesman, et al., *Nat. Rev. Cancer* 2: 48 (2002).
- Griffiths et al., *EMBO J.* 13: 3245-3260 (1994).
- Guerrier-Takada et al., *Cell*, 35: 849 (1983).
- 15 Hampel and Tritz, *Biochem.*, 28: 4929 (1989).
- Hampel et al., *Nucleic Acids Research*: 299 (1990)
- Hanada, et al., *J. Biol. Chem.*, 270: 11962 (1995).
- Hanahan, *Nature*, 315: 115 (1985).
- Hannon, *Nature (Lond.)*, 418: 244 (2002).
- 20 Harry, *Mol. Microbiol.*, 40: 795 (2001).
- Hart, *Semin. Oncol.*, 23: 154 (1996).
- Heim et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 12501 (1994).
- Hiraga et al., *J. Bacteriol.*, 171: 1496 (1989).
- Hoshida et al., *Pancreas*, 25(2):111-21 (2002).
- 25 Hu et al., *Cancer Res.*, 56: 3055-3061 (1996).
- Hu et al., *Mol. Microbiol.*, 34:82-90 (1999).
- Hunter et al., *Mol. Cell. Biol.*, 16: 877 (1996).
- Hudson & Souriau, *Expert Opin. Biol. Ther.* 1: 845-855 (2001).
- Hudson & Souriau, *Nat. Med.*, 9 (1):129-34 (2003).
- 30 Hung et al., *Adv. Exp. Med. Biol.*, 465:171-80 (2000).
- Hutvagner & Zamore, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 12: 225 (2002).
- Ireton et al., *J. Bacteriol.* 176: 5320 (1994).
- Jones et al., *Nature* 321: 522-525 (1986).
- Juliano & Ling, *Biochimica et Biophysica Acta*, 455:152 (1976).

- Kaetzel et al., *Biochem. Soc. Trans.* 25:475-480 (1997).
- Karpovsky et al., *J. Exp. Med.*, 160(6):1686-701 (1984).
- Katabi et al., *Human Gene Therapy* 10: 155 (1999).
- Kelsey et al., *Genes and Devel.* 1: 161 (1987).
- 5 Kleeff et al., *Cancer Gene Ther.*, 9(6):522-32 (2002).
- Knappik et al., *J. Mol. Biol.* 296: 57-86 (2000).
- Kostelny et al., *J. Immunol.* 148(5):1547-53 (1992).
- Kroemer, *Nat. Med.*, 3: 614 (1997).
- Kurane et al., *Jpn. J. Cancer Res.* 89: 1212 (1998).
- 10 Leder et al., *Cell* 45: 485 (1986).
- Lehnert, *Eur. J. Cancer*, A(6): 912-20 (1996).
- Levin et al., *J. Bacteriol.* 174: 6717 (1992).
- List, *Oncology*, 7(10): 23-8, 32, 35-38 (1993).
- List et al., *J. Clin. Oncol.*, 11(9): 1652-60 (1993).
- 15 Litman, et al., *J. Cell Sci.*, 113: 2011 (2000).
- Litman et al., *Cell Mol. Life Sci.*, 58(7): 931-59 (2001).
- MacDonald et al., *Hepatology* 7: 425 (1987).
- Mason et al., *Science* 234: 1372 (1986).
- McCubrey, et al., *Cell Cycle Checkpoints and Cancer*, pp. 17-53. Georgetown, TX:
 20 Landes Bioscience, (2001a).
- McCubrey, et al., *Leukemia*, 15: 1203 (2001).
- Miller et al., *J. Clin. Oncol.*, 9(1): 17-24 (1991).
- Morton & Potter, *J. Pharmacology & Exper. Therapeutics* 286: 1066 (1998).
- Nieth et al., *FEBS Letters*, 545: 144-50 (2003).
- 25 Nyati et al., *Clin Cancer Res.* 10; 691-700 (2004).
- Okada et al., *Sci. Prog.* 77: 253 (1993-94).
- Okada et al., *J. Bacteriol.* 176: 917 (1994).
- Osbourn et al., *Drug Delivery Tech.*, 8: 845-851 (2003).
- Pack et al., *Biochemistry*, 31(6):1579-84 (1992).
- 30 Perrotta and Been, *Biochem.*, 31: 16 (1992)
- Pikaar et al., *J. Infect. Dis.* 172: 481 (1995).
- Pinkert et al., *Genes and Devel.* 1: 268 (1987).
- Prasher et al., *Trends in Genetics* 11: 320 (1995).
- Raskin & de Boer, *J. Bacteriol.* 181: 6419 (1999).
- 35 Readhead et al., *Cell* 48: 703 (1987).

- Reeve & Cornett, *J. Virol.* 15: 1308 (1975).
- Ridgway et al., *Protein Eng.*, 9(7): 617-21 (1996).
- Riezman, *Trends in Cell Biology*, 3: 330 (1993).
- Rossi et al., *Aids Research and Human Retroviruses*, 8: 183 (1992)
- 5 Salomon et al., *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 19: 183-232 (1995).
- Salveson et al., *Cell*, 91: 443 (1997).
- Sandvig & Deurs, *Trends in Cell Biology*, 4: 275 (1994).
- Sato, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 9238 (1994).
- Sattler, et al., *Science (Wash. DC)*, 275: 983 (1997).
- 10 Saville & Collins, *Cell*, 61: 685-96 (1990).
- Saville & Collins, *PNAS (USA)*, 88: 8826-30 (1991).
- Scheffer, et al., *Curr. Opin. Oncol.*, 12: 550 (2000).
- Sellers & Fisher, *J. Clin. Invest.*, 104: 1655 (1999).
- Sharp, *Genes Dev.*, 15: 485 (2001).
- 15 Shaw & Griffen, *Nature* 289: 409 (1981).
- Sheets et al., *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 95: 6157-6162 (1998).
- Siould, „Therapeutic siRNAs,” *Trends in Pharmacological Sciences*, 25(1): 22-28 (2004).
- Speert et al., *J. Clin. Invest.*, 82: 872 (1988).
- 20 Stewart & D'Ari, *J. Bacteriol.*, 174: 4513 (1992).
- Sun, et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 280: 788 (2001).
- Swift et al., *Cell*, 38: 639 (1984).
- Thurnher et al., *Glycobiology*, 4(4):429-35 (1994).
- Todorovska et al., *J. Immunol. Methods*, 248: 47-66 (2001).
- 25 Tomlinson & Holliger, *Methods Enzymol.*, 326: 461-479 (2000).
- Patent amerykański nr 3,817,837
- Patent amerykański nr 3,850,752
- Patent amerykański nr 3,939,350
- Patent amerykański nr 3,996,345
- 30 Patent amerykański nr 4,275,149
- Patent amerykański nr 4,277,437
- Patent amerykański nr 4,366,241
- Patent amerykański nr 4,496,778
- Patent amerykański nr 4,987,071
- 35 Patent amerykański nr 4,975,278

- Patent amerykański nr 5,037,743
 Patent amerykański nr 5,143,830
 Patent amerykański nr 5,260,203
 Patent amerykański nr 5,455,030
 5 Patent amerykański nr 5,530,101
 Patent amerykański nr 5,585,089
 Patent amerykański nr 6,025,197
 Patent amerykański nr 6,639,055
- 10 Amerykańskie opublikowane zgłoszenie patentowe nr 2004-0265994 Van Bam-
 beke, et al., *Biochem. Pharmacol.*, 60: 457 (2000).
 Vaughan, et al., *Nature Biotechnol.*, 14: 309-314 (1996).
 Vaughan et al., *Nature Biotechnol.*, 16: 535-539 (1998).
 Wachi et al., *J. Bacteriol.*, 171: 6511 (1989).
 Wang, et al., *Nat. Med.*, 5: 412 (1999).
 15 Wang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 7063-7068 (1996).
 White & McCubrey, *Leukemia*, 15: 1011-1021 (2001).
 WO 81/01145
 WO 88/07378
 WO 95/21191
 20 WO 00/67776
 WO 05/056749
 Wu, et al., *Cancer Res.*, 63: 1515-19 (2003).
 Wacheck, et al., *Oligonucleotides*, 13: 393 (2003).
 Wright & Jong, *Experimental Medi.*, 163: 1245 (1986).
 25 Yague et al., *Gene Therapy*, 11: 1170-74 (2004).
 Ziady et al., *Am. J. Physiol.*, 273(2 Pt 1):G545-52 (1997).

LISTA SEKWENCJI

[0195]

- <110> ENGENEIC MOLECULAR DELIVERY PTY LTD.
 30 <120> DOSTARCZANIE FUNKCJONALNYCH KWASÓW NUKLEINOWYCH
 DO KOMÓREK SSACZYCH ZA POŚREDNICTWEM NIENARUSZONYCH
 MINIKOMÓREK POCHODZENIA BAKTERYJNEGO
 <130> 060348-0121
 <140> PCT/US05/30181
 35 <141> 2005-08-25

<150> 60/604,433 <151> 2004-08-26

<160>2

<170> PatentIn wersja 3,3

<210> 1

5 <211> 59

<212> DNA

<213> Sekwencja wytworzona sztucznie

<220>

<223> Opis sekwencji wytworzonej sztucznie: syntetyczny oligonukleotyd

10 <400> 1

tcgaaagaaa ccaactgtca gtgtagagta ctgta_actg acagttggtt tctttttt 59

<210>2

<211> 59

<212> DNA

15 <213> Sekwencja wytworzona sztucznie

<220>

<223> Opis sekwencji wytworzonej sztucznie: syntetyczny oligonukleotyd

<400> 2

tcgatgtgga tgactgagta cctgagagta ctgtcagga ctcagtcac cacatttt 59

Zastrzeżenia patentowe

- 20 **1.** Kompozycja zawierająca (a) nienaruszoną minikomórkę pochodzenia bakteryjnego, która zawiera funkcjonalną cząsteczkę kwasu nukleinowego lub plazmid zawierający segment, który koduje funkcjonalną cząsteczkę kwasu nukleinowego, minikomórka zawierająca dodatkowo dwuswoisty ligand, dwuswoisty ligand mający swoistość zarówno dla składnika powierzchniowego na minikomórce, jak i składnika powierzchniowego na niefagocytyzującej komórce ssaczek; i (b) farmaceutycznie dopuszczalny nośnik, przy czym funkcjonalna cząsteczka kwasu nukleinowego jest nakierowana na gen lub transkrypt białka, które przyczyniają się do oporności na chemoterapeutyk.
- 25 **2.** Kompozycja według zastrzeżenia 1, zawierająca dodatkowo chemoterapeutyk, względem którego funkcjonalny kwas nukleinowy zmniejsza lekooporność.
- 30 **3.** Nienaruszona minikomórka pochodzenia bakteryjnego zawierająca funkcjonalną cząsteczkę kwasu nukleinowego lub plazmid zawierający segment, który koduje funkcjonalną cząsteczkę kwasu nukleinowego, przy czym funkcjonalna cząsteczka kwasu nukleinowego jest nakierowana na gen lub transkrypt białka, który stymuluje oporność na chemoterapeutyk, minikomórka zawierająca dodatkowo dwuswoisty ligand, dwuswoisty ligand mający swoistość zarówno dla składnika powierzchniowego na mini-
- 35

komórce, jak i składnika powierzchniowego na nefagocyтуjącej komórce ssaczej; do stosowania jako lek.

4. Nienaruszona minikomórka pochodzenia bakteryjnego zawierająca funkcjonalną cząsteczkę kwasu nukleinowego lub plazmid zawierający segment, który koduje funkcjonalną cząsteczkę kwasu nukleinowego, przy czym funkcjonalna cząsteczka kwasu nukleinowego jest nakierowana na gen lub transkrypt białka, który stymuluje oporność na chemoterapeutyk, minikomórka zawierająca dodatkowo dwuswoisty ligand, dwuswoisty ligand mający swoistość zarówno dla składnika powierzchniowego na minikomórce, jak i składnika powierzchniowego na nefagocyтуjącej komórce ssaczej; do stosowania w leczeniu choroby odpornej na chemoterapeutyk, przy czym nienaruszona minikomórka jest podawana równocześnie lub kolejno z chemoterapeutykiem, aby umożliwić funkcjonalnemu kwasowi nukleinowemu zmniejszenie oporności na chemoterapeutyk.
5. Nienaruszona minikomórka pochodzenia bakteryjnego według zastrzeżenia 4 do stosowania w leczeniu choroby według zastrzeżenia 4, przy czym chemoterapeutyk i minikomórka są podawane kolejno, w dowolnej kolejności.
6. Nienaruszona minikomórka pochodzenia bakteryjnego według zastrzeżenia 4 do stosowania w leczeniu choroby według zastrzeżenia 4, przy czym chemoterapeutyk jest podawany po minikomórce.
7. Nienaruszona minikomórka pochodzenia bakteryjnego według zastrzeżenia 4 do stosowania w leczeniu choroby według zastrzeżenia 4, przy czym chemoterapeutyk i minikomórka są podawane równocześnie.
8. Nienaruszona minikomórka pochodzenia bakteryjnego według zastrzeżenia 4 do stosowania w leczeniu choroby według zastrzeżenia 4, przy czym choroba oporna na chemoterapeutyk jest wybrana z listy składającej się z raka, AIDS i gruźlicy.
9. Nienaruszona minikomórka pochodzenia bakteryjnego do stosowania według dowolnego z zastrzeżeń 3–8, przy czym dwuswoisty ligand jest wybrany z listy składającej się z receptorów, enzymów, peptydów wiążących, białek fuzyjnych/chimerycznych i drobnych cząsteczek.
10. Nienaruszona minikomórka pochodzenia bakteryjnego do stosowania według dowolnego z zastrzeżeń 3–9 do podawania co najmniej raz w tygodniu przez kilka tygodni do kilku miesięcy.
11. Chemoterapeutyk do stosowania w leczeniu lekoopornego nowotworu złośliwego, przy czym nienaruszona minikomórka pochodzenia bakteryjnego zawierająca cząsteczkę funkcjonalnego kwasu nukleinowego lub plazmid zawierający segment, który koduje cząsteczkę funkcjonalnego kwasu nukleinowego, przy czym cząsteczka funkcjonalnego kwasu nukleinowego jest nakierowana na gen lub transkrypt białka, które stymuluje oporność na chemoterapeutyk, minikomórka zawierająca dodatkowo dwuswoisty ligand, dwuswoisty ligand mający swoistość zarówno dla składnika powierzchniowego na minikomórce, jak i składnika powierzchniowego na nefagocyтуjącej komórce ssaczej, są podawane równocześnie lub kolejno z chemoterapeutykiem, aby umożliwić funkcjonalnemu kwasowi nukleinowemu zmniejszenie oporności na chemoterapeutyk.
12. Chemoterapeutyk według zastrzeżenia 11 do stosowania w leczeniu choroby według

zastrzeżenia 11, przy czym chemoterapeutyk i minikomórka są podawane kolejno, w dowolnej kolejności.

13. Chemoterapeutyk według zastrzeżenia 11 do stosowania w leczeniu choroby według zastrzeżenia 11, przy czym chemoterapeutyk jest podawany po minikomórce.
- 5 14. Chemoterapeutyk według zastrzeżenia 11 do stosowania w leczeniu choroby według zastrzeżenia 11, przy czym chemoterapeutyk i minikomórka są podawane równocześnie.
- 15 15. Chemoterapeutyk według zastrzeżenia 11 do stosowania w leczeniu choroby według zastrzeżenia 11, przy czym choroba oporna na chemoterapeutyk jest wybrana z listy składającej się z raka, AIDS i gruźlicy.
- 10 16. Chemoterapeutyk według dowolnego z zastrzeżeń 11–15 do stosowania w leczeniu choroby według wynalazku 11, przy czym dwuswoisty ligand jest wybrany z listy składającej się z receptorów, enzymów, peptydów wiążących, białek fuzyjnych/ chimerycznych i drobnych cząsteczek.
- 15 17. Chemoterapeutyk według dowolnego z zastrzeżeń 11–16 do stosowania w leczeniu choroby według wynalazku 11, do podawania, co najmniej raz w tygodniu przez kilka tygodni do kilku miesięcy.

Uprawniony: EnGeneIC Molecular Delivery Pty Ltd

Pełnomocnik:

mgr Katarzyna Rudnicka
Rzecznik patentowy

Figura 1

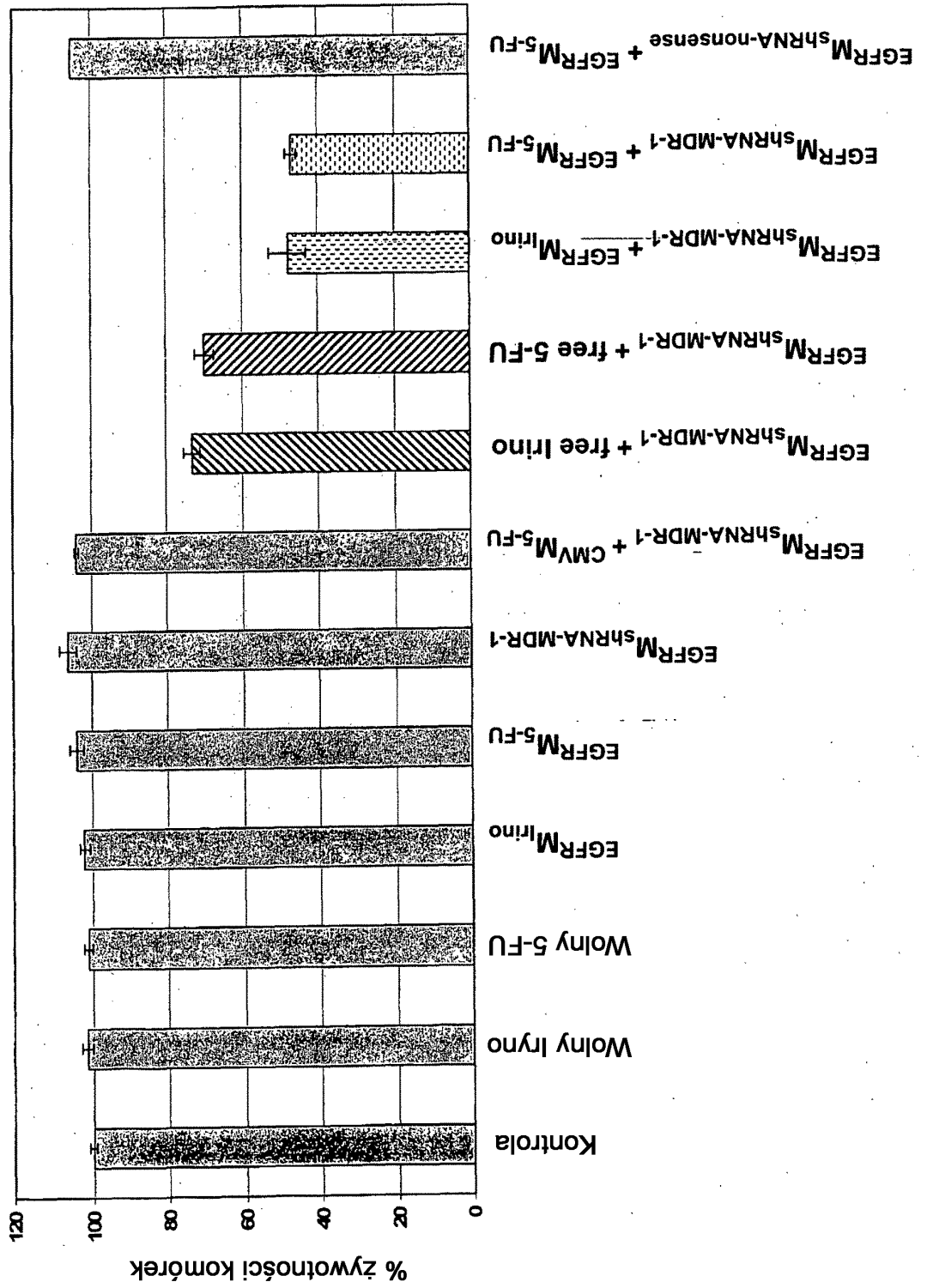


Figura 2

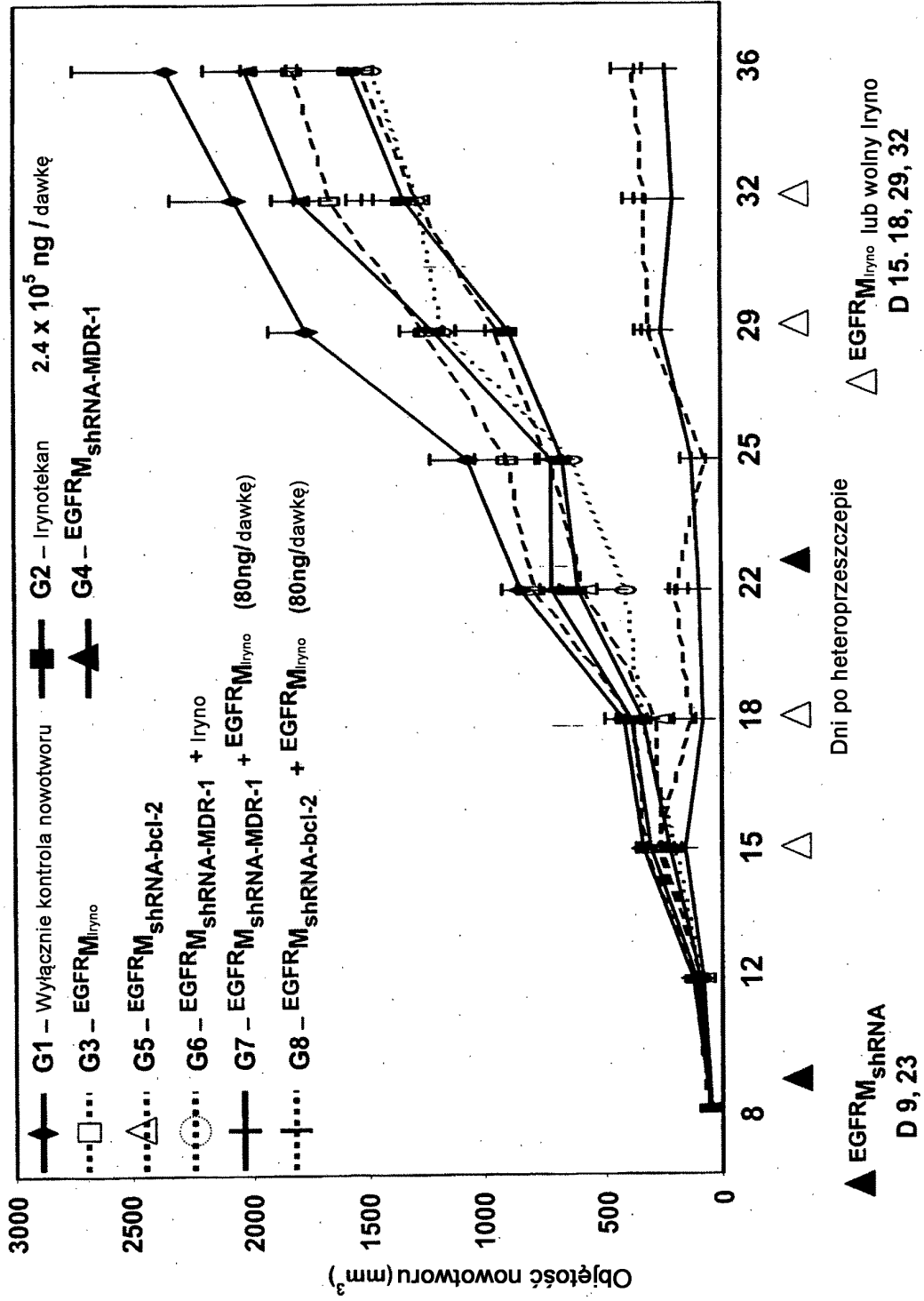


Figura 4

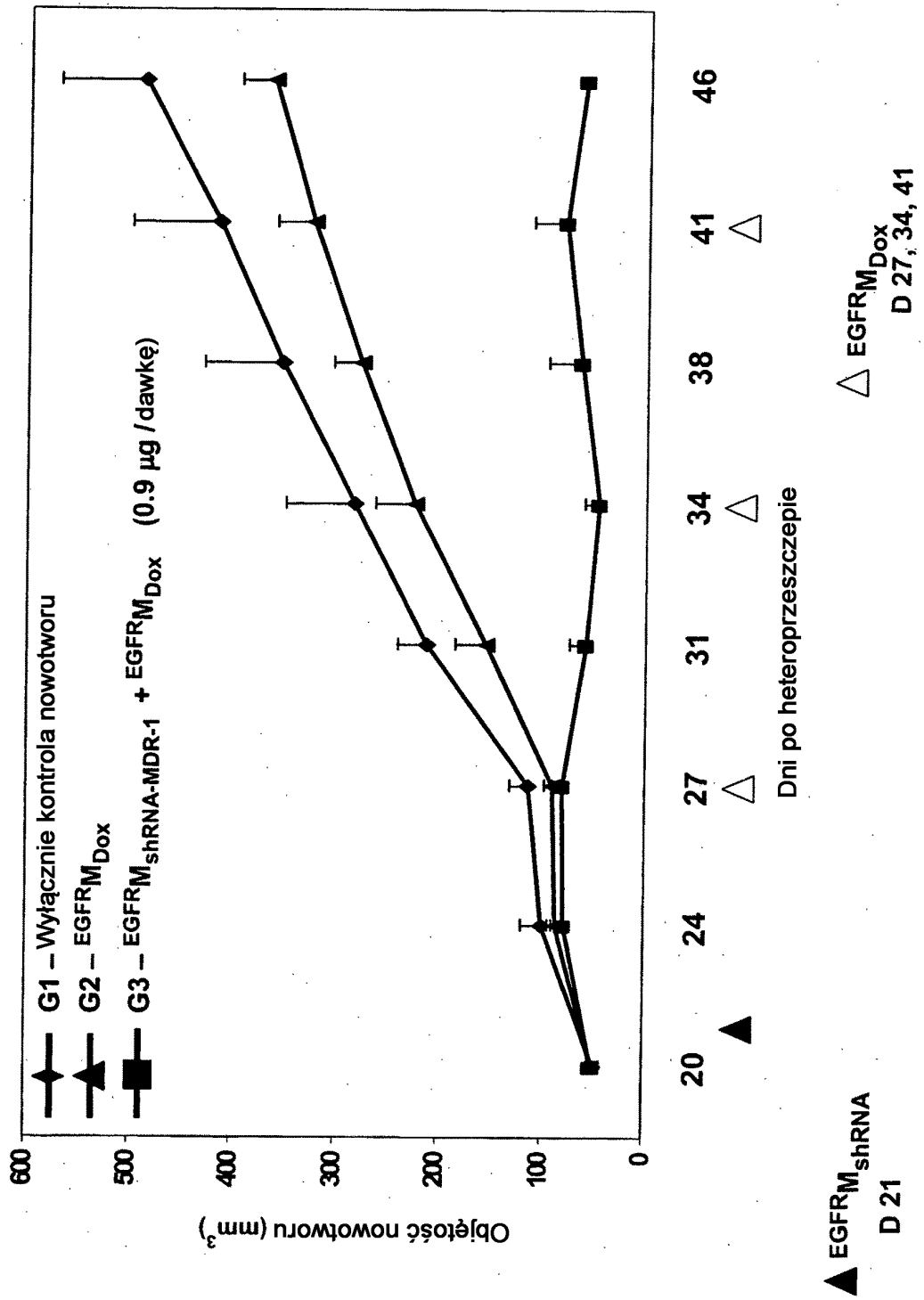


Figura 5

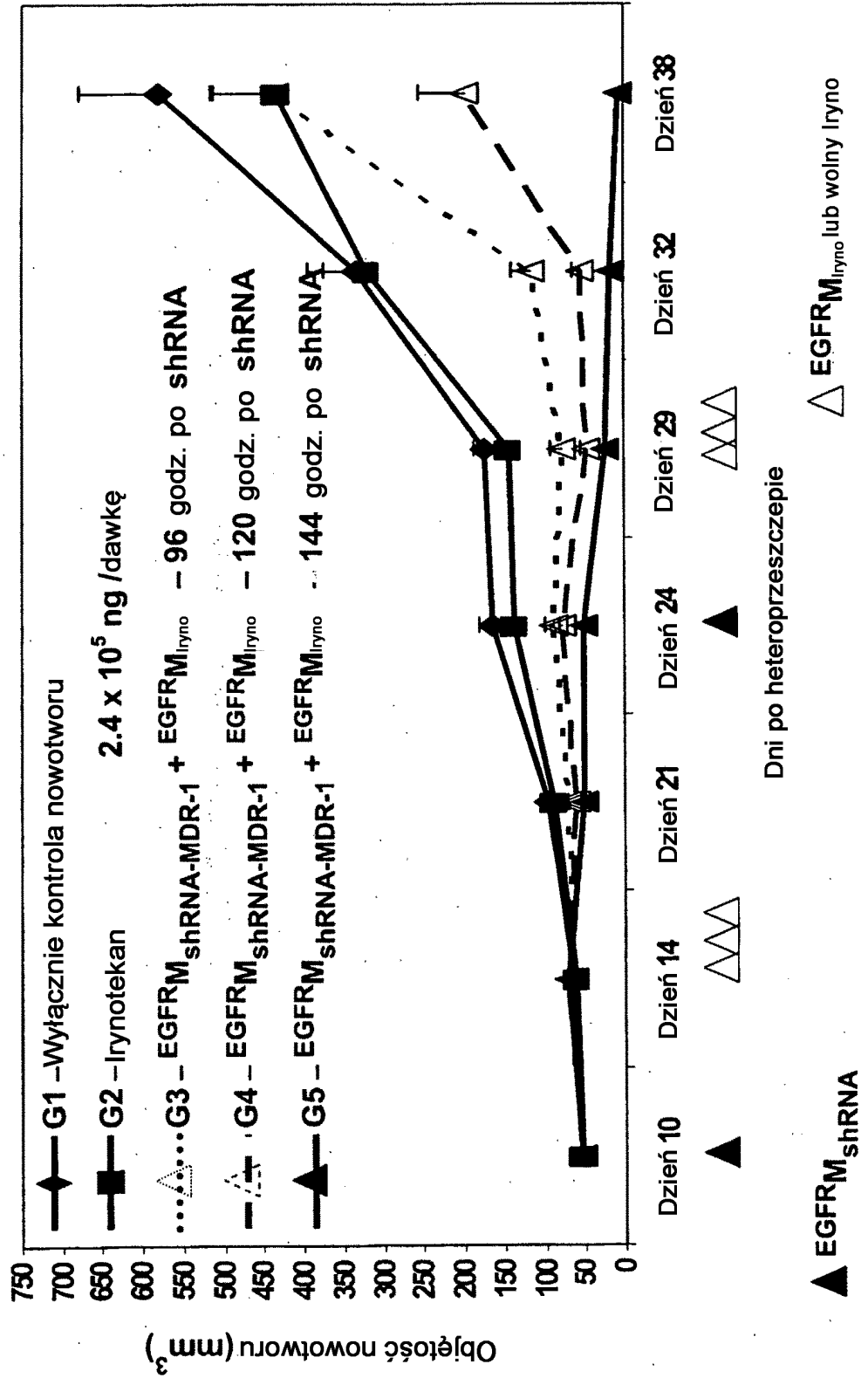


Figura 6

