

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 384 736**

51 Int. Cl.:
A01N 63/00 (2006.01)
A61K 39/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07776311 .8**
96 Fecha de presentación: **26.04.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **2048954**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **22.04.2009**

54 Título: **Un fragmento aislado de ADN del promotor humano de SPARC y su uso**

30 Prioridad:
28.04.2006 AR P060101724

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
11.07.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
11.07.2012

73 Titular/es:
INIS BIOTECH LLC
203 NE FRONT STREET, SUITE 101
MILFORD, KENT COUNTY, DE 19963, US y
INIS BIOTECH SA

72 Inventor/es:
PODHAJECER, Osvaldo Luis;
CAFFERATA, Eduardo Gustavo Alfredo;
LOPEZ, Maria Veronica y
VIALE, Diego Luis

74 Agente/Representante:
Zea Checa, Bernabé

ES 2 384 736 T3

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

DESCRIPCION

Un fragmento aislado de adn del promotor humano de sparc y su uso

Area de la invención

5 [0001] La presente invención se relaciona con el campo de la terapia génica. En particular la presente invención se refiere a una secuencia de ADN, aislada, con actividad promotora, capaz de dirigir la expresión de un gen de interés, particularmente en una célula tumoral. Más particularmente, la presente invención se refiere a vectores que contienen un fragmento de ADN aislado del promotor de SPARC asociado a un gen de interés, a composiciones farmacéuticas y su uso en terapia del cáncer.

Antecedentes de la invención

10 [0002] La proteína SPARC (del inglés *secreted protein, acidic and cystein-rich*, es decir, proteína secretada, ácida y rica en cisteína.) también conocida como osteonectina o como BM40, es una glicoproteína secretada, ampliamente distribuida en tejidos humanos y no humanos, cuyas funciones y efectos son amplios y diversos. Se ha encontrado que interactúa con componentes de la matriz extracelular, con factores de crecimiento, con citoquinas y con la expresión de metaloproteinasas de matriz.

15 [0003] La proteína SPARC ha sido inicialmente descrita por Ledda, M.F. y col (Ledda, M.F., Adris, S., Bravo, A.I., Kairiyama, C., Bover, L., Chernajovsky, Y., Mordoh, J., y Podhajcer, O.L., *Suppression of SPARC expression by antisense RNA abrogates the tumorigenicity of human melanoma cells*. Nat Med, 3: 171-176, 1997) como poseedora de un rol central en la malignidad del melanoma humano. Estudios posteriores demostraron que la sobreexpresión de SPARC está asociada a la progresión maligna de diversos tipos de tumores (Porte, H., Triboulet, J.P., Kotelevets, L., Carrat, F., Prevot, S., Nordlinger, B., DiGioia, Y., Wurtz, A., Comoglio, P., Gespach, C., y Chastre, E. *Overexpression of stromelysin-3, BM-40/SPARC, and MET genes in human esophageal carcinoma: implications for prognosis*. Clin Cancer Res, 4: 1375-1382, 1998). La proteína SPARC se encuentra expresada en forma muy elevada tanto en endotelio como en fibroblastos activados de tumores *in vivo* (Lane, T.F. y Sage, E.H. *The biology of SPARC, a protein that modulates cell-matrix interactions*. Faseb J, 8: 163-173, 1994).

25 [0004] Los promotores de SPARC humano (Hafner, M., Zimmermann, K., Pottgiesser, J., Krieg, T., y Nischt, R. *A purine-rich sequence in the human BM-40 gene promoter region is a prerequisite for maximum transcription*. Matrix Biol, 14: 733-741, 1995), promotores de SPARC murino (McVey, J.H., Nomura, S., Kelly, P., Mason, I.J., y Hogan, B.L. *Characterization of the mouse SPARC/osteonectin gene. Intron/exon organization and an unusual promoter region*. J Biol Chem, 263: 11111-11116, 1988) y promotores de SPARC bovino (Young, M. F., Findlay, D. M., Dominguez, P., Burbelo, P. D., McQuillan, C., Kopp, J. B., Robey, P. G., and Termine, J. D. *Osteonectin promoter. DNA sequence analysis and S1 endonuclease site potentially associated with transcriptional control in bone cells*. J Biol Chem, 264: 450-456, 1989) han sido clonados y caracterizados. La comparación entre estos promotores muestra que, al igual a lo observado a nivel del gen, existe una alta homología de secuencia.

35 [0005] En la **Figura 1** se muestra la estructura del promotor SPARC humano, donde se esquematizan el primer exón, las cajas GGA1 y GGA2, la región Inter-GGA de 10 nucleótidos que las separa y la secuencia TATA no consenso. El promotor de SPARC humano carece de una caja TATA consenso (Breathnach, R. y col., *Organization and expression of eucaryotic split genes coding for proteins*, Annu Rev Biochem, 50: 349-383, 1981) pero contiene un elemento denominado TATA-like dado que comparte algunas bases con la secuencia convencional. El promotor contiene dos cajas GGA1 y GGA2, de las cuales la caja GGA1 exhibe una gran similitud entre las especies humana y bovina.

40 [0006] Hafner y colaboradores observaron que la caja GGA1 es necesaria y suficiente para obtener una máxima actividad transcripcional, mientras que el elemento espaciador que separa las dos cajas GGA posee un efecto negativo sobre su expresión (Hafner M. y col., 1995). Es importante destacar que este grupo ha demostrado que en humanos la región promotora que contiene sólo las cajas GGA no es suficiente por sí sola para conferir especificidad de expresión en diferentes líneas celulares. Domínguez y colaboradores describieron la región comprendida entre las bases -504 a +11 del promotor bovino como un elemento positivo para la transcripción de SPARC en células fetales bovinas. Este fragmento también confiere expresión específica, mostrando mayor actividad en células con mayor nivel de expresión de ARNm de SPARC (Dominguez, P., Ibaraki, K., Robey, P.G., Hefferan, T.E., Termine, J.D., y Young, M.F. *Expression of the osteonectin gene potentially controlled by multiple cis- and trans-acting factors in cultured bone cells*. J Bone Miner Res, 6: 1127-1136, 1991). Observaron también que sólo las cajas GC (también llamado GC box, que es un elemento común de muchas regiones promotoras; su secuencia consenso es GGGCGG. Puede estar presente en más de una copia.

Se localiza entre los -40 a -100 pb) y GGA1 no son suficientes para la máxima expresión de SPARC en células de hueso bovinas, y que la región localizada entre las bases -927 a -504 produce una dramática inhibición de la transcripción.

5 **[0007]** La terapia génica representa potencialmente uno de los más importantes desarrollos que están teniendo lugar en medicina. A fin de modificar un tipo de célula o tejido específicos, los genes terapéuticos deben ser suministrados eficientemente a la célula de modo que el gen se exprese en el nivel apropiado y durante una suficiente duración de tiempo. Dos tipos de estrategias se están aplicando para el suministro de ADN a células, esto es mediante vectores virales y no-virales. Si bien se ha desarrollado un gran número de virus destinados a la transferencia de genes, el mayor interés se ha centrado en retrovirus, adenovirus, virus adeno-asociados y virus de herpes simplex tipo 1. Los adenovirus de primera generación son defectivos en la proteína E1A, por lo tanto no se replican. La proteína temprana E1A es la primera proteína que produce el ADN viral dentro de la célula. E1A tiene muchas funciones como la de ayudar a que se produzcan las demás proteínas virales y estimular el crecimiento celular (se une y suprime un inhibidor del crecimiento celular p53), facilitando la transcripción y replicación viral. Si bien aquellos adenovirus defectivos en la proteína E1A fueron utilizados con éxito como vectores en modelos preclínicos de cáncer, no se lograron los mismos resultados cuando fueron utilizados en ensayos clínicos, siendo uno de los mayores problemas su baja capacidad de transducción *in vivo* (Vile, R. *Cancer gene therapy-new approaches to tumour cell killing*. J Gene Med, 2: 141-143, 2000).

20 **[0008]** Una de las formas de superar este obstáculo ha sido mediante la creación de una nueva generación de vectores capaces de replicarse en forma condicional en el ambiente tumoral; a estos vectores se los denomina CRAds u oncolíticos (del inglés *Conditionally Replicative Adenovirus* u *oncolytic adenoviruses*, es decir adenovirus oncolíticos de replicación condicionada). Los CRAds se construyen modificando el genoma adenoviral de tal forma de regular la expresión de la proteína E1A con un promotor que resulte específicamente activo en el tejido o tipo celular requerido, de modo de evitar el daño de los tejidos vecinos.

25 **[0009]** En los últimos años distintos grupos de investigación se han dedicado al armado de adenovirus recombinantes. De esta manera algunos de los genes virales que fueron eliminados en un pasado son reinsertados nuevamente dado que mejoran la replicación viral. Tal es el caso de la región E3. E3 es un fragmento de ADN del virus que codifica para 9 proteínas cuya función principal es la de inhibir la muerte celular inducida por la respuesta inmune del huésped. Entre las 9 proteínas se destaca la ADP (*Adenoviral Death Protein*) que tiene una función contradictoria a sus compañeras E3 porque promueve la lisis celular tardía en el ciclo de infección viral para permitir la liberación de los viriones maduros al microambiente celular. Se ha visto que las células que fueron infectadas con un adenovirus que no expresa ADP permanecen mucho más tiempo viables que las células infectadas con el adenovirus *wild type* (Tollefson, A.E. y col. *The E3-11.6-kDa adenovirus death protein (ADP) is required for efficient cell death: characterization of cells infected with adp mutants*, *Virology*, 220: 152-162, 1996; Tollefson, A.E y col., *The adenovirus death protein (E3-11.6K) is required at very late stages of infection for efficient cell lysis and release of adenovirus from infected cells*, *J Virol*, 70: 2296-2306, 1996; Kruyt, F.A. y col., *A new generation of conditionally replicating adenoviruses: pairing tumor selectivity with maximal oncolysis*, *Hum Gene Ther*, 13: 485-495, 2002.).

40 **[0010]** Una de las modalidades más atractivas de terapia génica es el uso de genes suicidas. La base del sistema consiste en introducir un gen codificante para una enzima con capacidad para metabolizar una pro-droga no tóxica, convirtiéndola en tóxica. Uno de los genes más utilizados es el de la timidina quinasa del virus herpes simplex o HSV-TK (*Herpes simplex virus thymidine kinase*) que codifica para una enzima que es capaz de fosforilar a la pro-droga aciclovir / ganciclovir (antiviral de uso cotidiano en infecciones virales), un análogo de la guanosina. Bajo la forma fosforilada, el antiherpético se incorpora a la molécula de ADN, evitando su duplicación y provocando la muerte celular (Moolten, F. L., *Drug sensitivity ("suicide") genes for selective cancer chemotherapy*, *Cancer Gene Ther*, 1: 279-287, 1994). Las células tumorales vecinas no transducidas también pueden ser eliminadas por el denominado efecto *bystander* (en inglés, espectador) el cual permite que los metabolitos tóxicos se transfieran de una célula afectada a una no afectada.

50 **[0011]** Un tumor está formado por células tumorales, fibroblastos y células endoteliales. Es por ello que una terapia efectiva con vectores virales, requiere que el virus se pueda replicar en estos tres tipos celulares, que son los responsables de la progresión tumoral. Dado que SPARC se sobreexpresa en todos estos tipos celulares resulta un buen candidato para la construcción de un CRAd de tal forma que el promotor de SPARC dirija un gen de interés tal como un gen E1A y eventualmente otro gen terapéutico. En este sentido las células tumorales serían eliminadas por la replicación del propio virus o por la acción de una droga tóxica que es producida en el ambiente tumoral.

55

Breve descripción de la invención

[0012] Es por lo tanto un objeto de la presente invención proveer una secuencia de ADN, aislada, con actividad promotora capaz de dirigir la expresión de un gen de interés, particularmente en una célula tumoral.

5 [0013] La invención provee una secuencia de ADN aislada que comprende un promotor de ácido nucleico que tiene una secuencia que consiste de SEQ ID NO 1 que corresponde a una región del promotor del gen SPARC humano desde -513 pares de bases hasta +35 pares de bases.

[0014] De acuerdo con un aspecto adicional, se provee un constructo de expresión recombinante de ADN aislado que comprende la secuencia promotora de la invención operablemente ligada a un gen de interés.

10 [0015] De acuerdo con otro aspecto adicional, la secuencia polinucleotídica SEQ ID NO 1 que corresponde a una región del promotor humano del gen SPARC de acuerdo con la presente invención, puede estar además asociada a cualquier otra secuencia promotora/reguladora, tal como secuencias de respuesta a irradiación, a hipoxia, a radicales libres, etc.

15 [0016] De acuerdo con aún otro aspecto relevante de la presente invención se provee un vector viral recombinante de expresión, que contiene la secuencia de ADN promotora de la invención, definida anteriormente y/o el constructo de la invención definido anteriormente, donde la secuencia de ADN promotora se encuentra operablemente ligada a un gen de interés terapéutico.

20 [0017] La invención provee además un método para expresar ADN foráneo en una célula huésped que comprende introducir en la célula huésped un constructo de expresión recombinante de ADN o un vector viral recombinante de expresión de la invención que comprende la molécula de ADN promotora de secuencia polinucleotídica SEQ ID NO.1 operablemente ligada a un ADN foráneo que codifica un polipéptido o ARN deseado, en donde se expresa dicho ADN foráneo.

25 [0018] La presente solicitud describe un método para tratar un tumor en un paciente que sufre del mismo, que comprende administrar al paciente una cantidad efectiva de una composición farmacéutica que comprende un constructo de expresión recombinante de ADN o un vector viral recombinante de expresión, que comprenden la secuencia promotora de la invención capaz de dirigir la expresión de un gen terapéutico y/o la replicación viral, operablemente ligado a la misma.

Breve descripción de las figuras

[0019]

30 La Figura 1 muestra un esquema de la estructura del promotor de SPARC humano, HSBM40DNA (Genbank # X88259).

La Figura 2 muestra una evaluación comparativa de los niveles de expresión de ARNm de SPARC en diferentes líneas tumorales y normales.

La Figura 3 muestra dos esquemas de la región promotora de SPARC, de donde derivan los distintos fragmentos.

35 La Figura 4 A, muestra la actividad promotora de 11 fragmentos del promotor de SPARC, por medida de la actividad enzimática del gen reportero luciferasa, en las líneas celulares A375N (melanoma), HeLa (cérvix) y T-47D (mama), etc.

La Figura 4 B compara la actividad promotora de los fragmentos -513/+35 (F512) y -1175/+71Δ10 (Spdel) del promotor de SPARC, por medida de la actividad enzimática del gen reportero luciferasa, en diversas líneas celulares normales y tumorales.

40 La Figura 5 A muestra esquemas de los adenovirus Ad-F512, Ad(I)-F512-TK y Ad(I)-F512(E3), construidos de acuerdo con la presente invención.

La Figura 5 B muestra el perfil de restricción con la enzima *HindIII*, de los adenovirus Ad(I)-F512-TK y Ad(I)-F512(E3), de la presente invención.

- La Figura 6 muestra el efecto citopático en monocapa en distintas líneas tumorales de los adenovirus Ad-F512, Ad(l)-F512-TK y Ad(l)-F512(E3), construidos de acuerdo con la presente invención, utilizando Ad5-wt como control.
- 5 Las Figuras 7 A, 7 B, 7 C y 7 D muestran el efecto lítico en monocapa (ensayo MTT) de los adenovirus Ad-F512 y Ad(l)-F512(E3), de la presente invención, a diferentes MOIs luego de 10 días de infección; A- Melanoma, células SB2; B- Melanoma, células MleJ; C- células de colon; D- células de mama.
- La Figura 8 muestra la producción de los adenovirus Ad-F512 y Ad(l)-F512(E3) de la presente invención en distintas líneas tumorales humanas.
- 10 La Figura 9 muestra el efecto cooperativo del gen E1A aportado por Ad-F512 en la replicación del adenovirus Ad- β -gal.
- Las Figuras 10 A a 10 F muestran resultados de ensayos *in vivo*. La Figura 10 A muestra la curva de crecimiento tumoral para el ensayo con Ad(l)F512-TK. La Figura 10B muestra la curva de crecimiento tumoral de los animales del primer ensayo con Ad-F512. La Figura 10 C muestra tumores tratados con Ad- β -gal y con Ad-F512. La Figura 10 D muestra fotos histológicas a los 14 días de la región mostrada en 10 C. La Figura 10 E muestra la curva de Kaplan-Meier para el ensayo B. La Figura 10 F muestra la curva de Kaplan-Meier del segundo ensayo con Ad-F512.
- 15 La Figura 11 muestra el efecto citopático en monocapa de CRAds de Ad-F512, Ad(l)-F512-TK y Ad(l)-F512 (E3) de la invención. Se muestra el efecto lítico (tinción con cristal violeta) de los CRAds en monocapas de células en concentraciones diferentes luego de 10 días post-infección.
- 20 Las Figuras 12A a 12E muestran el efecto citopático de CRAds de Ad-F512, Ad(l)-F512-TK y Ad(l)-F512 (E3) de la invención en células normales; la Figura 12A muestra fotografías de CRAds tomadas 10 días pos-infección en melanocitos normales; se incluyen fotografías de AD-wt y controles de no-tratamiento (PBS); la Figura 12B muestra el efecto citopático sobre células normales de colon CCD841; la Figura 12C muestra el efecto citopático sobre células de mama normales MCF12A; la Figura 12D muestra el efecto lítico sobre células microendoteliales; la Figura 12E muestra el efecto viral sobre queratinocitos y fibroblastos (CCD1140 y Malme-3).
- 25 Las Figuras 13A a 13C muestran el efecto citopático en monocapa de Ad(l)-F512-TK; el efecto lítico (teñido con cristal violeta o sobrevida medida mediante MTT) de Ad(l)-F512-TK sobre monocapas de células a diferentes concentraciones virales después de 10 días pos-infección en presencia o ausencia de la prodroga GCV. La Figura 13A muestra el ensayo con células de melanoma SB2; la Figura 13B muestra la sobrevida de células hMEC-1 en presencia de GCV y GCV + virus; la Figura 13C muestra el efecto citopático sobre células BAEC.
- 30 Las Figuras 14A a 14D muestran ensayos *in vivo* con tumores de melanoma; la Figura 14A muestra ensayos con tumores SB2/WI-38/hMEC-1 tratados con Ad-F512; la Figura 14B muestra tumores SB2/WI-38 tratados Ad-F512; La Figura 14C muestra tumores SB2/hMEC-1 tratados con Ad-F512; La Figura 14D muestra tumores SB2/WI-38 tratados con Ad(l)-F512-TK + GCV, n=5 o PBS+GCV, n = 4, donde n es el número de animales tratados.
- 35 Las Figuras 15A a 15D muestran ensayos *in vivo* con tumores de colon y páncreas; la Figura 15A muestra ensayos sobre tumores LoVo tratados con Ad-F512 (n=7), Ad(l)-F512-TK (n=6) o PBS (n=7); la Figura 15B muestra el promedio de tumores LoVo/hMEC-1 tratados con Ad-F512 (n=6), Ad(l)-F512-TK + GCV (n=6) o PBS + GCV (n=6); la Figura 15C muestra el crecimiento tumoral de Mia-PaCa/hMEC-1 tratado con Ad-F512 (n=6), Ad(l)-F512-TK + GCV (n=6) o PBS + GCV (n=5). En todos los casos n indica el número de animales tratados.
- 40 **Descripción detallada de la invención**
- [0020]** Como se definió anteriormente, en un aspecto principal, la presente la invención provee una secuencia aislada de ADN que comprende un promotor de ácido nucleico que tiene una secuencia que consiste de SEQ ID NO 1, que corresponde a una región del promotor del gen SPARC humano desde -513 pares de bases hasta +35 pares de bases.
- 45 **[0021]** El término "aislada", como se lo utiliza en la presente, significa sustancialmente separada o purificada respecto de secuencias contaminantes en la célula u organismo en los que está presente naturalmente el ácido nucleico e incluye ácidos nucleicos purificados mediante técnicas de purificación estándar así como ácidos nucleicos preparados mediante tecnología recombinante así como de síntesis química.

- 5 **[0022]** El término “variante” como se utiliza en la presente se refiere a una molécula de ADN en donde la secuencia de nucleótidos es sustancialmente idéntica a la secuencia establecida como SEQ ID NO 1. La variante se puede lograr mediante modificaciones tales como por inserción, sustitución o delección de uno o más nucleótidos, si tales modificaciones son mutaciones neutras y no afectan el funcionamiento de la molécula de ADN.
- 10 **[0023]** Un “fragmento” de secuencia de ácido nucleico de acuerdo a la presente invención, es una porción de secuencia de ácidos nucleico que es menor que la longitud completa y comprende al menos una longitud mínima capaz de hibridizarse específicamente con la secuencia de ácido nucleico de la presente invención bajo condiciones de astringencia, conservando dicho fragmento las condiciones biológicas requeridas en la presente invención.
- 15 **[0024]** La presente invención provee también un constructo de expresión recombinante efectivo para dirigir la transcripción de una secuencia codificante seleccionada que comprende: (a) una secuencia de ADN que corresponde al promotor humano de SPARC; y (b) una secuencia codificante de un gen de interés, operablemente ligada al promotor de (a) de modo que la secuencia del gen de interés pueda ser transcripta y traducida en una célula huésped.
- 20 **[0025]** De acuerdo con una realización la secuencia de ADN que corresponde al promotor humano de SPARC preferida desde -513 pares de bases hasta +35 pares de bases de acuerdo a la secuencia mostrada en SEQ ID NO 1 del Listado de Secuencias.
- 25 **[0026]** Un gen “heterólogo” tal como utilizado en la presente, significa una secuencia de ADN que codifica una secuencia de aminoácidos o proteína de interés, en asociación con otra secuencia de ADN, tal que dicha asociación no se encuentra en la naturaleza.
- 30 **[0027]** En general tal como utilizado en la presente “un gen terapéutico” significa una secuencia de ADN que codifica una secuencia de aminoácidos o proteína, capaz de ejercer un efecto terapéutico sobre las células huésped. Preferiblemente, de acuerdo con una realización de la presente invención las células huésped son células tumorales, más particularmente la células tumorales son células de melanoma, células de mama, células de colon, células de cervix.
- 35 **[0028]** De acuerdo con una realización preferida, el gen de interés puede ser seleccionado de: el gen de E1A, un gen suicida tal como el gen *hsv-TK*, la región genómica adenoviral denominada E3, el gen de una interleuquina tal como IL-10, IL-12 o IL-23, etc
- 40 **[0029]** De acuerdo con realizaciones particulares, la secuencia polinucleotídica SEQ ID NO 1 que corresponde a una región del promotor humano del gen SPARC, de acuerdo con la presente invención puede dirigir genes solos o puede estar asociada con secuencias de respuesta a irradiación, hipoxia, radicales libres, etc. Estas son secuencias de ADN definidas, las cuales suelen estar posicionadas río arriba de dicho promotor. Uno de los ejemplos característicos de este tipo de combinaciones es el del uso del elemento de respuesta a hipoxia (HRE) que ya ha sido utilizado para potenciar la actividad transcripcional de un promotor o elemento respondedor en condiciones de baja tensión de oxígeno. Hernandez-Alcoceba y colaboradores han utilizado los elementos de respuesta a hipoxia (HRE) para potenciar la respuesta de un promotor conteniendo elementos de respuesta a estrógeno (ERE) en tumores de mama (Hernandez-Alcoceba R, Pihalja M, Nunez G, Clarke MF, *Evaluation of a new dual-specificity promoter for selective induction of apoptosis in breast cancer cells* Cancer Gene Ther. 2001 Apr;8(4):298-307). Estos mismos elementos de respuesta a hipoxia han sido combinados con elementos de respuesta a radiación (Greco O y col., *Novel chimeric gene promoters responsive to hypoxia and ionizing radiation*. Gene Ther 2002; 9: 1403-1411). Pueden estar formando parte de un adenovirus replicativo o no replicativo, (Ito A, Uto H, Moriuchi A, Nagata K, Onaga Y, Onaga M, Hori T, Hirono S, Hayashi K, Tamaoki T, Tsubouchi H., *Gene therapy targeting for hepatocellular carcinoma: selective and enhanced suicide gene expression regulated by a hypoxia-inducible enhancer linked to a human alpha-fetoprotein promoter*, Cancer Res. 2001 Apr 1;61(7):3016-21; Park JO, Lopez CA, Gupta VK, Brown CK, Mauceri HJ, Darga TE, Manan A, Hellman S, Posner MC, Kufe DW, Weichselbaum RR., *Transcriptional control of viral gene therapy by cisplatin*. J Clin Invest. 2002 Aug;110(3):403-10.; Cowen RL, Williams KJ, Chinje EC, Jaffar M, Sheppard FC, Telfer BA, Wind NS, Stratford IJ, *Hypoxia targeted gene therapy to increase the efficacy of tirapazamine as an adjuvant to radiotherapy: reversing tumor radioresistance and effecting cure*. Cancer Res. 2004 Feb 15;64(4):1396-402).
- 45 **[0030]** De acuerdo con la invención, se provee además un método para expresar ADN foráneo en una célula huésped que comprende introducir en la célula huésped un constructo de expresión recombinante de ADN o un vector viral recombinante de expresión de la invención que comprende la molécula promotora de secuencia

polinucleotídica SEQ ID NO.1 operablemente ligada a un ADN foráneo que codifica un polipéptido o ARN deseado, en donde se expresa dicho ADN foráneo.

5 **[0031]** La introducción de ADN en las células huésped podrá llevarse a cabo mediante cualquier constructo e incluye plásmidos, virus de ADN, retrovirus, así como moléculas de nucleótidos aisladas. También puede utilizarse transferencia mediada por liposomas.

10 **[0032]** Un ejemplo de tales virus de ADN que pueden ser empleados en la presente invención son los adenovirus. Son bien conocidos más de 40 diferentes serotipos de adenovirus humano, siendo el adenovirus Ad5 especialmente preferido como vector viral en la presente invención, aunque no se descartan adenovirus Ad5 de cápside y/o fibra modificados, tales como con la cápside del adenovirus 3 o la modificación de la fibra con un motivo RGD.

15 **[0033]** La construcción de los vectores adecuados que contienen la secuencia promotora y la secuencia de gen terapéutico deseado puede ser realizada mediante técnicas de ligación y restricción estándar, que son bien conocidas en el arte. Los cortes de ADN en sitio específico se realizaron mediante tratamiento con enzimas de restricción apropiadas, en las condiciones indicadas por el proveedor, durante aproximadamente 3-16 horas. En general los resultados de la restricción se pueden verificar por separación electroforética en geles de agarosa (0,8-1,6%) en solución TAE (40 mM de triacetato, 2mM de Na₂EDTA.2H₂O, pH 8,5), utilizando bromuro de etidio y visualizados con luz UV en trans-iluminador (Ultraviolet Products Inc., Upland, CA). Las ligaciones se realizan mediante la ADN ligasa del bacteriófago T4, siguiendo los protocolos del proveedor (New England Biolabs Inc., Beverly, MA). Se utilizaron relaciones inserto:vector de 1:1 hasta 3:1, calculando la razón entre los fragmentos por la siguiente fórmula:

$$\left[\frac{\text{ng vector} * \text{Kb inserto}}{\text{Kb vector}} \right] * \left[\text{relación} \frac{\text{inserto}}{\text{vector}} \right] = \text{ng inserto}$$

25 **[0034]** En la construcción de un vector, es ventajoso poder distinguir el vector que incorpora ADN foráneo de vectores no modificados mediante un rápido ensayo. Se conocen sistemas marcadores que comprenden en general un gen cuya expresión confiere un fenotipo identificable a las células transformadas cuando las células se hacen crecer en un medio apropiado. El gen β-galactosidasa es por ejemplo un gen detectable en clones que exhiben un fenotipo azul en placas con X-gal.

[0035] Esta invención involucra dirigir un gen de interés hacia una célula tumoral de modo que la proteína codificada por el gen se exprese y, directa o indirectamente mejore el estado de enfermedad.

30 **[0036]** De acuerdo con una realización particular de la invención, se prepara un vector CRAd u oncolítico (Adenovirus Oncolítico de Replicación Condicionada) sobre la base de un adenovirus, que comprende un gen de la proteína E1A, bajo la regulación de un fragmento de la secuencia de ADN del promotor de SPARC. Ventajosamente, los CRAds de la invención dirigen la expresión de E1A en distintos tipos de células tumorales (melanoma, mama, colon, cervix) ocasionando la lisis y eliminación por la replicación del propio virus. También ventajosamente, los CRAds de la invención conteniendo el gen de E1A, tal como se ejemplifica más adelante, tienen actividad lítica atenuada en células normales (mesenquimales, endotelio y fibroblastos) dado que su expresión está dirigida por un promotor que se expresa principalmente en células tumorales.

40 **[0037]** Asimismo, de acuerdo a otra realización particular se preparan vectores CRAds que comprenden además, un gen suicida tal como por ejemplo timidina quinasa del virus del herpes simplex (*hsv-TK*) que codifica para una enzima que es capaz de fosforilar a las pro-drogas aciclovir/ganciclovir. Bajo la forma fosforilada, el agente antiherpético se incorpora a la molécula de ADN, evitando su duplicación y provocando la muerte celular. Los CRAds preparados de acuerdo con esta realización particular, dirigen la expresión de *hsv-TK* en los distintos tipos de células tumorales, completando la acción lítica y al tiempo que tiene una actividad atenuada en células normales dado que su expresión está dirigida por un promotor que se expresa principalmente en células tumorales.

45 **[0038]** Asimismo, de acuerdo con otra realización particular se preparan vectores CRAds que comprenden además, una región genómica adenoviral denominada E3 que codifica para 9 proteínas. Entre ellas se destaca la ADP (*Adenoviral Death Protein*) que promueve la lisis celular tardía en el ciclo de infección viral para permitir la liberación de los viriones maduros al microambiente celular. Los CRAds conteniendo la región E3 potencian la actividad lítica de E1A, al tiempo que tiene una actividad lítica atenuada en células normales dado que su expresión está dirigida por un promotor que se expresa principalmente en células tumorales

[0039] Los constructos o vectores de la presente invención pueden ser administrados a un paciente en necesidad de ellos, mediante inyección, administración oral o tópica, vehiculizados en un portador adecuado. Portadores adecuados pueden ser de tipo acuoso, lipídico, liposomal, etc.

5 [0040] Se utilizó análisis de varianza (ANOVA) seguido del test de Tukey para el análisis de los datos de los estudios de luciferasa, esferoides y los experimentos *in vivo*. Un valor *P* menor a 0,05 fue considerado significativo. Asimismo, las curvas de supervivencia fueron realizadas según el método de Kaplan-Meier y las comparaciones estadísticas entre los diferentes grupos se realizó aplicando *log-rank test*.

10 [0041] Esta invención se ilustra a continuación mediante ejemplos experimentales detallados. Dichos ejemplos están destinados a proporcionar un mejor entendimiento de la invención, sin que deba considerarse a los mismos como limitando de ningún modo la invención, cuyo alcance se establece en las reivindicaciones adjuntas.

EJEMPLOS

Ejemplo 1.- Evaluación de la expresión de ARNm de SPARC en diferentes líneas tumorales y normales

15 [0042] Se evaluaron los niveles producidos de ARN mensajero (ARNm) de la proteína SPARC por Real-Time PCR en líneas celulares tumorales y en líneas celulares normales.

20 [0043] Las líneas humanas HeLa (cáncer de cervix, ATCC N° CCL-2), T-47D (cáncer de mama, ATCC N° HTB-133), WI-38 (fibroblastos fetales pulmonares, ATCC N° CCL-75), WI-38 VA (fibroblastos fetales pulmonares transformados, ATCC N° CCL-75.1), HFL-1 (fibroblastos, ATCC N° CCL-153), 293 (embrionales de riñón, ATCC N° CRL-1573), LoVo (cáncer de colon, ATCC N° CCL-229), HCT-116 (cáncer de colon, ATCC N° CCL-247), CaCO2 (cáncer de colon, ATCC N° HTB-37), HT-29 (cáncer de colon, ATCC N° HTB-38), T84 (cáncer de colon, ATCC N° CCL-248) y las células endoteliales de aorta (Bovine Aortic Endothelial Cells, BAEC ATCC N° CRL1395) fueron obtenidas de ATCC (American Tissue Culture Collection, Rockville, MD, USA). Las líneas celulares humanas de melanoma IIB-MEL-LES y IIB-MEL-J-N fueron previamente descritas por Ledda y col., 1997; las líneas humanas de melanoma SB2, A375N y MEL-888 fueron gentilmente cedidas por Dr. Estela Medrano (Houston, Texas). Todas las células fueron cultivadas en el medio recomendado suplementado con suero fetal bovino 10% (Natocor, Carlos Paz, Argentina), 2,5 U/ml de penicilina (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO) y 2,5 µg/ml de estreptomina (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO) y mantenidas a 37°C con una atmósfera de CO₂ 5%. Mientras que las células BAEC fueron suplementadas con SFB 5%.

30 [0044] La cuantificación relativa de los niveles de ARNm de SPARC fue llevada a cabo según lo descrito por Pfaffl, M.W. *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR*. Nucleic Acids Res, 29: e45, 2001. El ARN total fue extraído usando Tri Reagent (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO). 5 µg de ARN se retrotranscribieron con 200U de SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA) usando 500 ng de cebadores Oligo(dT). La reacción de Real-Time PCR del ADNc fue llevada a cabo en un termociclador iCycler iQ System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). La reacción se llevó a cabo en un volumen de 25 µl conteniendo 1 unidad de Platinum® Taq DNA polimerasa (Invitrogen), 1X PCR Reaction Buffer (20 mM Tris-HCl, pH 8,4, y 50 mM KCl), 1,5 mM Mg₂Cl, 2,5 µg BSA, 0,01% glicerol, 0,4 µM de cada cebador específico: SPARC (SRTse; AACCGAAGAGGAGGTGGTG, SEQ ID NO 2 /SRTas; GCAAAGAAGTGGCAGGAAGA, SEQ ID NO 3) y β-actina (Acse; AGAAAATCTGGCACCACACC, SEQ ID NO 4 /Acas; CAGAGGCGTACAGGGATAGC, SEQ ID NO 5) 200 µM de dNTPs y 0,3 X de la solución de SYBR Green. Las condiciones de la reacción fueron 90 segundos a 94°C y luego 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 60°C y 30 segundos a 72°C. Cada reacción se realizó por triplicado y los resultados obtenidos para SPARC fueron normalizados con los resultados obtenidos simultáneamente para β-actina.

45 [0045] Los resultados se muestran en la **Figura 2**, donde se observa que las células de melanoma A375N expresan los mayores niveles de ARNm de SPARC. El resto de las líneas de melanoma expresan niveles bajos a moderados de ARNm comparados con A375N. Se observó que las líneas de cáncer de mama (T-47D), cervix (HeLa) y colon (LoVo, HCT-116, CaCO2, HT-29 y T84) expresan niveles despreciables de SPARC. En la línea de riñón se han observado niveles bajos de expresión de SPARC, mientras que las líneas de fibroblastos presentan valores moderados de expresión y una línea de endotelio aórtico bovino (BAEC) expresa niveles de ARNm más altos que A375N.

Ejemplo 2.- Clonado de 11 fragmentos del promotor humano de SPARC en los plásmidos pGEM y TOPO

[0046] Un análisis de la secuencia del promotor humano de SPARC realizada por los inventores de la presente, reveló además de los 2 posibles sitios de inicio de transcripción que ya habían sido descritos, INR1 e INR2 (ver la anteriormente citada **Figura 1**), una secuencia DPE (*Downstream Promoter Elements*) presente entre las bases +29-+33. La secuencia DPE fue descrita en promotores de *Drosophila* y se le atribuye un rol en el armado del transcriptosoma en los promotores que no contienen secuencias TATA (Kadonaga, J.T. *The DPE, a core promoter element for transcription by RNA polymerase II*. *Exp Mol Med*, 34: 259-264, 2002). A partir de este análisis se decidió hacer una mutación dirigida del promotor. Para ello se trabajó con los extremos 5': -1175 (con el propósito de clonar el promotor completo), -513 (por analogía con el promotor bovino) y -120 (que incluye exactamente la secuencia GGA1). Las mutaciones del extremo 3' incluyen el exón 1 entero y diversas deleciones que incluyen o no a la secuencia DPE (+24, +28, +35, +71). En la **Figura 3** se muestran dos esquemas del promotor de SPARC de donde derivan distintos fragmentos. Se indican las ubicaciones de las cajas GGA, de la secuencia TATA-like, de los posibles sitios de inicio de transcripción (INR) y la secuencia DPE. Se señalan las distintas cotas que fueron utilizadas para construir los fragmentos promotores de SPARC. En el extremo 5' se clonaron hasta las bases -1175, -513 y -120; mientras que desde el extremo 3' se clonaron hasta las bases +24, +28, +35 y +71. Se indica además, la región delecionada entre las cajas GGA, esta deleción da origen al fragmento -1175/+71 Δ 10.

[0047] Se amplificó por PCR un fragmento de 1246 pb de la región promotora humana de SPARC (-1175 a +71 pb relativo al sitio de inicio de la transcripción) a partir de ADN genómico de linfocitos humanos, con los oligonucleótidos Spfse y SPP3'2 (ver Tabla 1). Este producto de PCR, -1175/+71 fue clonado en el vector pGEM-T-easy (Promega Corp., Madison, WI) para obtener pGEM (-1175/+71). Este plásmido se usó como templado de las variantes del promotor, cuyos fragmentos fueron amplificados a su vez por PCR, utilizando los cebadores tal como se detalla en la Tabla 1 siguiente:

Tabla 1

| Fragmento | Cebador | Enzima | T mel | Secuencia 5'-3' | SEQ NO | ID |
|-----------------------|--------------|--------|---------|---|--------|----|
| -1175/+71 | SPfSE | NheI | Tm=64.3 | CTAGCTAGCAGCTGGGTGTTGTGGCAT | 6 | |
| | SPP3'2 | SaI | Tm=70.2 | ACGCGTCGACCTCAGTGCCAGGCA | 7 | |
| -1175/+71 Δ 10 | SPfSE | NheI | Tm=64.3 | CTAGCTAGCAGCTGGGTGTTGTGGCAT | 6 | |
| | Δ 10r | - | Tm=75.4 | CGGCCTCCTCCTTCTCCCCTGTC TCTGTCTTTCATTC | 8 | |
| | Δ 10f | - | Tm=65.2 | CTAGCTAGCGGAGAAGGAGGAGGCC | 9 | |
| | R71 | BglII | Tm=59.8 | GCAGATCTCCTCAGTGGCAGGC | 10 | |
| -1175/+35 | F1175 | MluI | Tm=65.2 | GCACGCGTAGCTGGGTGTTGTGG | 11 | |
| | R35 | BglII | Tm=60.8 | CGAGATCTGCTCTCCGGGCAG | 12 | |
| -1175/+28 | F1175 | MluI | Tm=65.2 | GCACGCGTAGCTGGGTGTTGTGG | 11 | |
| | R28 | BglII | Tm=63.1 | CGAGATCTGGGCAGTCTGAAGGACC | 13 | |
| -513/+71 | F512 | MluI | Tm=63.7 | CGACGCGTGCAGCTTGTCTTGTC | 14 | |
| | R71 | BglII | Tm=59.8 | GCAGATCTCCTCAGTGGCAGGC | 10 | |
| -513/+35 | F512 | MluI | Tm=63.7 | CGACGCGTGCAGCTTGTCTTGTC | 14 | |
| | R35 | BglII | Tm=60.8 | CGAGATCTGCTCTCCGGGCAG | 12 | |

| | | | | | |
|----------|------|-------|---------|---------------------------|----|
| -513/+28 | F512 | MluI | Tm=63.7 | CGACGCGTGCAGCTTGTCTTGTC | 14 |
| | R28 | BglII | Tm=63.1 | CGAGATCTGGGCAGTCTGAAGGACC | 13 |
| -513/+24 | F512 | MluI | Tm=63.7 | CGACGCGTGCAGCTTGTCTTGTC | 14 |
| | R24 | BglII | Tm=60.2 | GCAGATCTAGTCTGAAGGACCGCG | 15 |
| -120/+71 | F120 | MluI | Tm=60.9 | GAACGCGTGGGAGAAGGAGGAG | 16 |
| | R71 | BglII | Tm=59.8 | GCAGATCTCCTCAGTGGCAGGC | 10 |
| -120/+35 | F120 | MluI | Tm=60.9 | GAACGCGTGGGAGAAGGAGGAG | 16 |
| | R35 | BglII | Tm=60.8 | CGAGATCTGCTCTCCGGGCAG | 12 |
| -120/+28 | F120 | MluI | Tm=60.9 | GAACGCGTGGGAGAAGGAGGAG | 16 |
| | R28 | BglII | Tm=63.1 | CGAGATCTGGGCAGTCTGAAGGACC | 13 |

5 **[0048]** El ciclo de amplificación corresponde a una desnaturalización inicial de 94 °C durante 3 minutos, seguida de 35 ciclos de amplificación: 94 °C, 1 minuto, T annealing (variable depende de cada producto, Tabla I), 1 minuto, y 72 °C 2 minutos, seguido de una extensión final a 72 °C de 10 minutos. Las PCRs fueron llevadas a cabo en el termociclador PTC-200 (MJ Research Inc.,Whaltam, MA).

[0049] Los productos de PCR fueron clonados en una primera instancia en los vectores pGEM-t-easy (Promega Corp., Madison, WI) ó TOPO-pCR4 (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA), obteniéndose los vectores:

- a-pGEM(-1175/+71), (SEQ ID NO 17), promotor completo. La secuencia +1- +70, incluye el primer exon que no se traduce.
- 10 b-pGEM(-1175/+71Δ10) (SEQ ID NO 18). Este promotor es una modificación del promotor completo de SPARC -1175/+71, en el cual se delecionó una secuencia de 10 pb que es considerada inhibidora de la transcripción que está comprendida entre las dos cajas GGA (Hafner, M. y col., 1995). Para ello se aplicó la técnica de extensión por solapamiento (PCR SOE), y se utilizaron dos fragmentos del promotor de SPARC que habían sido clonados previamente en el laboratorio: Spde1.1Kb de 1084 pares de bases y GGA1 de 209 pares de bases. El producto final de PCR se clonó en el vector pGEM y la delección fue confirmada por secuenciación.
- 15 c-TOPO(-1175/+35), (SEQ ID NO 19), incluye la secuencia DPE
- d-TOPO(-1175/+28), (SEQ ID NO 20), excluye la secuencia DPE
- e-TOPO(-513/+71), (SEQ ID NO 21), incluye el primer exón completo.
- 20 f-TOPO(-513/+35), (SEQ ID NO. 1), incluye la secuencia DPE
- e-TOPO(-513/+28), (SEQ ID NO. 22), excluye la secuencia DPE
- h-TOPO(-513/+24), (SEQ ID NO 23), incluye hasta la secuencia INR2
- i-TOPO(-120/+71), (SEQ ID NO 24), incluye el primer exón completo
- j-TOPO(-120/+35), (SEQ ID NO 25), incluye la secuencia DPE
- 25 k-TOPO(-120/+28), (SEQ ID NO 26), excluye la secuencia DPE

Ejemplo 3A.- Selección de un fragmento del promotor humano de SPARC

5 **[0050]** Los promotores obtenidos de acuerdo con el Ejemplo 2 fueron subclonados en los sitios *MluI/BglII*, *MluI/XhoI* o *NheI/XhoI* del plásmido pGL3-Basic (Promega Corp., Madison, WI, USA) aguas arriba del gen reportero luciferasa. Todas las clonaciones fueron comprobadas por perfiles de restricción y mediante la

10 **[0051]** El plásmido pGL3-Basic contiene el gen reportero luciferasa de *Firefly* modificado (*luc+*) para evitar la unión de factores reguladores génicos, eliminar sitios de restricción, evitar el transporte proteico a peroxisomas y la presencia de una secuencia de Kozak en el extremo 5' del gen luciferasa para optimizar la eficiencia de traducción. La presencia del gen reportero luciferasa permitió cuantificar la actividad promotora de SPARC de los 11 fragmentos obtenidos en el Ejemplo 2, mediante la medición de la actividad de la enzima luciferasa. El ensayo se realizó en tres líneas celulares, utilizando como modelo la línea A375N (melanoma) que expresa altos niveles de SPARC y las líneas HeLa (cervix) y T-47D (mama), que no expresan SPARC, de acuerdo a las enseñanzas del anterior Ejemplo 1.

15 **[0052]** Las células fueron sembradas en placas de 24 pocillos con una densidad de 4×10^4 células/pocillo. A las 24 horas fueron transfectadas utilizando Lipofectamine2000 (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) según las condiciones indicadas por el proveedor. Cada tratamiento se realizó al menos por duplicado en cada línea celular, incubando 0,8 µg de plásmido de tratamiento con 0,1 µg de plásmido pRL-CMV durante 5 minutos con 50 µl de medio DMEM sin antibiótico y, simultáneamente, 1 µl de Lipofectamine2000 con 50 µl del mismo medio. Se mezclaron estas dos preparaciones y se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se removió el medio con suero de las células, se lavó con PBS y agregó 200 µl de DMEM alta glucosa sin suero y sin antibióticos; posteriormente se agregó 100 µl de medio conteniendo la mezcla de lipofección y a las 4 horas se agregaron 800 µl de medio de cultivo correspondiente a cada línea celular, suplementado con SFB. Las células utilizadas fueron mantenidas durante 46 horas en estufa a 37°C con 5% CO₂. Se utilizó el kit Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega Corp., Madison, WI) para el ensayo de luciferasa. Este sistema implica la expresión simultánea de dos enzimas reporteras individuales en un mismo sistema, pudiéndose evaluar la actividad producida por las enzimas luciferasa de la luciérnaga *Firefly* (*Photinus pyralis*) y del celenterado *Renilla* (*Renilla reniformis*) en un sólo ensayo secuencial (Sherf, B.A. y col., *Dual Luciferase Reporter Assay: An Advanced Co-Reporter Technology Integrating Firefly and Renilla Luciferase Assays*. Promega Notes Magazine: 2-9, 1996). Los datos se normalizaron de la siguiente manera:

$$\frac{\text{Unidades Luciferasa Firefly}}{\text{Unidades Luciferasa Renilla}} = \text{Unidades Luciferasa Relativas (RLU)}$$

35 **[0053]** Los datos se expresan como cantidad de inducción relativa a la actividad obtenida con el plásmido control pGL3-Basic (sin promotor). Los resultados se muestran en la **Figura 4A**. Como control de transfección se utilizó el plásmido pGL3-promoter (pGL3-prom, Promega Corp., Madison, WI) en el cual el promotor viral de SV40 dirige la expresión de la enzima luciferasa.

40 **[0054]** La menor actividad promotora en líneas de melanoma se observó con el promotor completo de SPARC (-1175/+71). La mayor inespecificidad fue observada con el fragmento -120/+71 y el fragmento que mostró mayor especificidad y mayor actividad en la línea que expresa SPARC resultó ser -513/+35 (Figura 4A). A través de este análisis se seleccionó el promotor **-513/+35** (de ahora en más, **F512**) para continuar con su caracterización en comparación con el promotor **-1175/+71Δ10** denominado **Spdel** dado que tenía la misma actividad en la línea de melanoma A375N que F512.

Ejemplo 3B.- Selección de un fragmento del promotor humano de SPARC

45 **[0055]** Se ensayaron los dos promotores **F512** y **Spdel** con similar actividad promotora identificados a través del anterior Ejemplo 3A, en distintas líneas celulares tumorales y normales (ver referencias en Ejemplo 1). Los resultados se muestran en la **Figura 4B**.

[0056] A partir de los resultados comparativos, se observa que Spdel presenta en promedio 140 veces mayor actividad, con respecto al vector vacío pGL3-Basic, tanto en las líneas tumorales como en las normales, con la excepción de la línea de melanoma MEL888 en donde su actividad es de 430 veces (Figura 4B). La actividad de Spdel resulta por lo tanto independiente de la expresión de SPARC de la línea celular utilizada.

5 **[0057]** El promotor F512 resultó ser activo en las líneas de melanoma y en la línea de endotelio BAEC que tiene la mayor expresión de SPARC. La línea SB2 tiene la menor actividad del promotor, aproximadamente 1/3 de la actividad observada en A375N, coincidiendo este resultado con la relación de expresión de ARNm de SPARC (Figuras 2 y 4B). Sorprendentemente, en dos líneas de melanoma Mel888 y MelJ la actividad es 3,5 a 4 veces mayor que para A375N. Estos resultados muestran que el fragmento F512 es activo en las líneas de melanoma pero que su comportamiento no siempre es coincidente con la expresión de ARNm de SPARC. A diferencia de Spdel que tiene la misma actividad en todas las líneas, F512 tiene menor actividad en las líneas con escasa o nula expresión de SPARC como las de colon (T84, LoVo), glioma (U87) o cervix (HeLa) (Figura 4B). Sin embargo, esta actividad no es despreciable sino que por el contrario en algunos casos como T84 llega a la mitad de la actividad observada para las líneas de melanoma. Por otra parte, el promotor también es activo en la línea de fibroblasto utilizada (WI-38 VA).

[0058] Estos resultados permitieron seleccionar al promotor **F512** para dirigir la expresión de genes de interés en un adenovector.

Ejemplo 4.- Construcción de un plásmido *shuttle* conteniendo F512 aguas arribas del gen E1A.

20 **[0059]** La construcción de un plásmido *shuttle* conteniendo los genes de interés se llevó a cabo a partir del vector *shuttle* pADPSY, que contiene el extremo izquierdo del adenovirus humano tipo 5 al que se le han delecionado los genes de las regiones E1 (necesarios para su replicación) y E3. A su vez, en la región $\Delta E1$ se ha insertado el promotor del virus del sarcoma de Rous (RSV) y la señal de poliadenilación del virus SV40 (Mariano J. Alvarez, Federico Prada, Edgardo Salvatierra, Alicia I. Bravo, Viviana P. Lutzky, Cecilia Carbone, Fernando J. Pitossi, H. Eduardo Chuluyan y Osvaldo L. Podhajcer; *Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine Produced by Human Melanoma Cells Modulates Polymorphonuclear Leukocyte Recruitment and Antitumor Cytotoxic Capacity*; Cancer Research 65, 5123-5132, June 15, 2005). Con el propósito de mejorar este vector de tal manera de aumentar la variedad de sitios únicos de clonado se diseñó e incluyó un sitio de clonado múltiple (SCM) en reemplazo del promotor RSV, obteniéndose el plásmido pAd-Xp (SEQ. ID. NO 32); este vector fue secuenciado para verificar la presencia del sitio de múltiple clonado.

30 **[0060]** En los últimos años muchos trabajos demostraron que los promotores que resultaban específicos de determinado tipo celular, no se comportaban como tales cuando se los introducía en el genoma viral (Steinwaerder, D. S. y Lieber, A. *Insulation from viral transcriptional regulatory elements improves inducible transgene expression from adenovirus vectors in vitro and in vivo*. Gene Ther, 7: 556-567, 2000.). Esto se debe a que las secuencias de ITR (repeticiones terminales invertidas) y la señal de encapsulación del genoma del adenovirus presentan *enhancers* que influyen en la actividad de los promotores modificando su especificidad (Hearing, P. y Shenk, T. *The adenovirus type 5 E1A enhancer contains two functionally distinct domains: one is specific for E1A and the other modulates all early units in cis*. Cell, 45: 229-236, 1986.). Este problema se puede evitar en parte mediante la utilización de secuencias llamadas *insulators* que aíslan la actividad del promotor y le permitan ejercer su especificidad (Steinwaerder, D. S. y col., 2000; Martin-Duque, P., Jezzard, S., Kaftansis, L., y Vassaux, G. *Direct comparison of the insulating properties of two genetic elements in an adenoviral vector containing two different expression cassettes*. Hum Gene Ther, 15: 995-1002, 2004.). A partir de estos hallazgos se decidió clonar, en el SCM del vector *shuttle* pAd-Xp, una secuencia *insulator* (la señal de stop de la hormona de crecimiento bovina (Martin-Duque, P. y col., 2004)) dando lugar al nuevo vector *shuttle* pAd(I)-Xp (SEQ. ID. NO 33). La secuencia *insulator* fue amplificada por PCR utilizando los cebadores INSU-F-SpeI (CCACTAGTGCTAGAGCTCGCTGATCAGC; SEQ. ID. NO 34) y INSU-R-KpnI (CGGTACCATCCCCAGCATGCCTGC; SEQ. ID. NO 35). EL producto de esta reacción fue clonado en TOPO-pCR4 (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) y posteriormente subclonado en los sitios *SpeI* y *KpnI* de pAd-Xp, dando lugar a pAd(I)-Xp.

45 **[0061]** El ADNc de la proteína E1A fue clonada por PCR a partir de ADN genómico de células embrionarias de riñón humano 293 (ATCC N° CRL-1573) que la expresan constitutivamente. Se amplificó por PCR un fragmento correspondiente a los nucleótidos 560-1632 del genoma del virus. Este fragmento fue clonado en el vector TOPO-pCR4 (SEQ ID NO 36 y SEQ ID NO 37) y secuenciado para verificar la identidad de la secuencia. Las construcciones fueron subclonadas en el vector de expresión pcDNA3 y expresadas en células HeLa. Se realizó un *Western Blot* del lisado completo de las proteínas y se pudieron identificar con el anticuerpo anti-E1A (BD Pharmigen, #554155).

[0062] En una primera etapa se clonó el gen de la proteína E1A en los vectores pAd(l)-Xp y pAd-Xp. Para ello se extrajo el ADNc de la proteína E1A del vector TOPO-pCR4-E1A (SEQ IND NO 36) con las enzimas *Bgl*II y *Bam*HI y se insertó en el sitio *Bgl*II de pAd(l)-Xp y pAd-Xp dando lugar a pAd(l)-Xp-E1A (SEQ. ID. NO 38) y pAd-Xp-E1A (SEQ. ID. NO 39). En una segunda etapa se extrajo F512 de pGL3(-513/+35) con *Mlu*I y *Bgl*II y se lo clonó en los sitios *Mlu*I y *Bgl*II de pAd(l)-Xp-E1A y pAd-Xp-E1A, dejando el ADNc de la proteína E1A aguas abajo de F512. De esta manera se obtuvieron los vectores **pAd(l)-F512** (SEQ. ID. NO 40) y **pAd-F512** (SEQ. ID. NO 41); las secuencias de ambos vectores fueron confirmadas mediante la secuenciación con el cebador pAd-sense (TGTTTTTCTCAGGTGTTTTCCG; SEQ. ID. NO 42).

Ejemplo 5.- Construcción de un plásmido *shuttle* conteniendo F512 aguas arribas del gen suicida *hsv*-TK.

[0063] El ADNc que codifica para *hsv*-TK fue amplificado por PCR usando como molde el ADN del plásmido pAGO (Berenstein, M., Adris, S., Ledda, F., Wolfmann, C., Medina, J., Bravo, A., Mordoh, J., Chernajovsky, Y. y Podhajcer, O. L. *Different efficacy of in vivo herpes simplex virus thymidine kinase gene transduction and ganciclovir treatment on the inhibition of tumor growth of murine and human melanoma cells and rat glioblastoma cells*. Cancer Gene Ther, 6: 358-366, 1999) y los cebadores FTK/RTK (GCCCATGGCTTCGTACCCCGGCC; SEQ. ID. NO 43 /GCGTCTGACTCAGTTAGCTCCCCATCTC; SEQ. ID. NO 44). El producto de esta reacción de PCR se clonó en el vector TOPO-pCR4. El plásmido TK-TOPO-pCR4 (SEQ. ID. NO 45) fue confirmado por digestión con enzimas de restricción y por secuenciación usando los cebadores universales T3 (ATTAACCCCTCACTAAAGGGA; SEQ. ID. NO 29) y T7 (TAATACGACTCACTATAGGG; SEQ. ID. NO 27).

[0064] El ADNc de la enzima *hsv*-TK fue extraído del plásmido TK-TOPO-pCR4 (SEQ ID NO 45) mediante digestión enzimática con *Nco*I y *Sal*I. Este fragmento *Nco*I-TK-*Sal*I fue clonado en el vector pCITE (Invitrogen, Carlsbad, CA) aguas abajo de un sitio interno de inserción ribosomal (IRES) que permite una mayor eficiencia de traducción en ausencia de "capping". El vector resultante pCITE-TK fue confirmado por digestión con enzimas de restricción. Posteriormente se extrajo el fragmento IRES-TK del vector pCITE-TK digiriendo con las enzimas *Eco*RI y *Sal*I. El sitio *Eco*RI fue rellenado con la enzima Klenow y el fragmento IRES-TK-*Sal*I fue subclonado en el vector pAd(l)-F512 obtenido en el Ejemplo 4, digerido previamente con las enzimas *Eco*RV y *Sal*I. La obtención del vector resultante de esa clonación, **pAd(l)-F512-TK** (SEQ ID NO 46 Y SEQ ID NO 47), fue confirmada por digestión con enzimas de restricción y secuenciación con los cebadores pAd-sense (TGTTTTTCTCAGGTGTTTTCCG; SEQ. ID. NO 42) y pAd-antisense (CACAAATTTACAAATAAAGCATTT; SEQ. ID. N° 48).

Ejemplo 6.- Construcción de un plásmido *shuttle* conteniendo F512 aguas arribas del gen codificante para la proteína verde EGFP.

[0065] El ADNc de la proteína EGFP unido a una secuencia IRES en su extremo 5' fue extraído del plásmido pDC315-iGFP (plásmido modificado del plásmido comercial pDC315 de Microbix Biosystems Inc., Toronto, Ontario, Canada) mediante digestión con las enzimas *Eco*RI y *Sal*I. El sitio *Eco*RI fue rellenado con la enzima Klenow y el fragmento IRES-EGFP-*Sal*I fue subclonado en el vector pAd(l)-F512 obtenido conforme lo descrito en el Ejemplo 4, digerido previamente con las enzimas *Eco*RV y *Sal*I. La obtención del vector resultante de esa clonación, **pAd(l)-F512-EGFP** (SEQ ID NO 49 y SEQ ID NO 50), fue confirmada por digestión con enzimas de restricción y secuenciación con los cebadores pAd-sense (TGTTTTTCTCAGGTGTTTTCCG; SEQ ID NO 42) y pAd-antisense (CACAAATTTACAAATAAAGCATTT; SEQ ID NO 48).

Ejemplo 7.- Obtención del virus recombinante Ad-F512.

[0066] El plásmido pAd-F512 (SEQ ID NO 41) obtenido de acuerdo a lo descrito en el Ejemplo 4, fue linearizado con la enzima *Fsp*I y cotransfectado junto a un fragmento del adenovirus tipo 5, previamente restringido con la enzima *Cl*al, que incluye desde mu 2.6 a mu 100 con delección en la región E3. La cotransfección se realizó en células 293por el método de fosfato de calcio (Ferrari, C. C., Depino, A. M., Prada, F., Muraro, N., Campbell, S., Podhajcer, O., Perry, V. H., Anthony, D. C., y Pitossi, F. J. *Reversible demyelination, blood-brain barrier breakdown, and pronounced neutrophil recruitment induced by chronic IL-1 expression in the brain*. Am J Pathol, 165: 1827-1837, 2004) y según el protocolo de Nevins y col. en células 293 (Nevins, J. R. *Definition and mapping of adenovirus 2 nuclear transcription*. Methods Enzymol, 65: 768-785, 1980). Por recombinación homóloga entre las regiones adenovirales de los dos fragmentos cotransfectados se obtuvo el adenovirus recombinante Ad-F512 (SEQ ID NO 51 y SEQ ID NO 52). Un esquema del adenovirus Ad-F512 construido se muestra en la Fig. 5A.

[0067] Una vez obtenido, el adenovirus recombinante Ad-F512 se clonó y se hizo una purificación de stock mediante un doble gradiente de cloruro de cesio (Lieber, A., He, C. Y., Kirillova, I., y Kay, M. A. *Recombinant*

adenoviruses with large deletions generated by Cre-mediated excision exhibit different biological properties compared with first-generation vectors *in vitro* and *in vivo*. J Virol, 70: 8944-8960, 1996). La preparación de adenovirus se tituló mediante DICT50 (Lieber, A. y col., 1996) en células 293 obteniéndose 10^{12} pv/ml para Ad-F512. Como control positivo de replicación en el ensayo se incluyó Ad5-wt del que se obtuvo una preparación cuyo título fue $6,8 \times 10^{11}$ pv/ml.

[0068] Asimismo, para confirmar la identidad del stock viral se realizó una preparación de ADN viral, la cual se utilizó para digerir con enzimas de restricción y para secuenciar usando los cebadores internos pAd-sense (TGTTTTCTCAGGTGTTTTCCG; SEQ ID NO 42) y pAd-antisense (CACAAATTTTACAAATAAAGCATTT; SEQ ID N 48), (ver Figura 5B).

10 **Ejemplo 8.- Obtención del virus recombinante Ad(I)-F512-TK.**

[0069] En forma análoga a lo descrito en el Ejemplo 4, el plásmido pAd(I)-F512-TK (SEQ ID NO 46 y SEQ ID NO 47) obtenido en el Ejemplo 5, fue linearizado con la enzima *FspI* y cotransfectado junto a un fragmento del Ad5, previamente restringido con la enzima *ClaI*, que incluye desde μ 2.6 a μ 100, con delección en la región E3. La cotransfección se realizó en células 293 por el método de fosfato de calcio (Ferrari, C. C. y col.; 2004) y según el protocolo de Nevins en células 293 (Nevins, J. R.; 1980). Por recombinación homóloga entre las regiones adenovirales de los dos fragmentos cotransfectados se obtuvo el adenovirus recombinante Ad(I)-F512-TK (SEQ ID NO 53 y SEQ ID NO 54). Un esquema del mismo se muestra en la Fig. 5A.

[0070] Una vez obtenido, el adenovirus Ad(I)-F512-TK se clonó y se hizo una purificación del stock mediante un doble gradiente de cloruro de cesio (Lieber, A. y col.; 1996). La preparación de adenovirus se tituló mediante DICT50 (Lieber, A. y col., 1996) en células 293 obteniéndose un título de 10^{12} pv/ml. Como control positivo de replicación en el ensayo se incluyó Ad5-wt del que se obtuvo una preparación cuyo título fue $6,8 \times 10^{11}$ pv/ml.

[0071] Asimismo, para confirmar la identidad del stock viral se realizó una preparación de ADN viral, la cual se utilizó para digerir con enzimas de restricción y para secuenciar usando los cebadores internos pAd-sense (TGTTTTCTCAGGTGTTTTCCG; SEQ ID NO 42) y pAd-antisense (CACAAATTTTACAAATAAAGCATTT; SEQ ID NO 48), (Ver Figura 5B).

15 **Ejemplo 9.- Obtención del virus recombinante Ad(I)-F512(E3).**

[0072] El plásmido pAd(I)-F512-EGFP (SEQ ID NO 49 y SEQ ID NO 50) obtenido en el Ejemplo 6, fue linearizado con la enzima *FspI*, tal como en los Ejemplos 7 y 8, pero en este caso la cotransfección se realizó junto a otro plásmido JM17 (Microbix Biosystems Inc., Toronto, Ontario, Canada) que contiene el genoma entero del Ad5, con la excepción de la región E1, pero conteniendo la región E3. La cotransfección se realizó en células 293 por el método de fosfato de calcio (Ferrari, C. C. y col.; 2004) y según el protocolo de Nevins en células 293 (Nevins, J. R.; 1980). Por recombinación homóloga entre las regiones adenovirales de los dos fragmentos cotransfectados se obtuvo el adenovirus recombinante Ad(I)-F512(E3) (SEQ ID NO 55 y SEQ ID NO 56), cuyo esquema se muestra en la Fig. 5A, y que contiene la región E3 del virus original (Ad5).

[0073] Una vez obtenido, el adenovirus recombinante que contiene la región E3 se clonó y se hizo la purificación del stock mediante un doble gradiente de cloruro de cesio (Lieber, A. y col., 1996). La preparación de adenovirus se tituló mediante DICT50 (Lieber, A. y col., 1996) en células 293 obteniéndose un título de $1,5 \times 10^{12}$ pv/ml. Como control positivo de replicación en el ensayo se incluyó Ad5-wt del que se obtuvo una preparación cuyo título fue $6,8 \times 10^{11}$ pv/ml.

[0074] Asimismo, para confirmar la identidad del stock viral se realizó una preparación de ADN viral, la cual se utilizó para digerir con enzimas de restricción y para secuenciar usando los cebadores internos pAd-sense (TGTTTTCTCAGGTGTTTTCCG; SEQ ID NO 42) y pAd-antisense (CACAAATTTTACAAATAAAGCATTT; SEQ ID NO 48), (ver Fig. 5B).

20 **Ejemplo 10.- Ensayos *in vitro* con los adenovirus Ad-F512, Ad(I)-F512-TK y Ad(I)-F512(E3) para la determinación de infectividad celular.**

[0075] Para los ensayos *in vitro* se utilizaron los adenovirus obtenidos en los Ejemplos 7, 8 y 9. Las líneas celulares empleadas ya han sido descritas en el Ejemplo 1.

[0076] Los virus utilizados en la presente invención están basados en el Ad5, cuya vía de entrada en las células es a través del receptor CAR (*coxsackie-adenovirus receptor*) e integrinas (Kanerva, A. y Hemminki, A. Adenoviruses for treatment of cancer. Ann Med, 37: 33-43, 2005). Dado que la expresión de CAR es

heterogénea, se realizaron ensayos de transducción en diferentes líneas celulares con un adenovirus no replicativo que expresa la enzima β -galactosidasa (Ad- β -gal).

- 5 **[0077]** Las distintas líneas tumorales y normales fueron infectadas a distintas multiplicidades de infección (MOI) con Ad- β -gal, y se registró el porcentaje de infección (ver Tabla 2). Luego de 3 días se realizó un ensayo con X-gal para revelar β -galactosidasa. Se contaron las células azules (indicador de célula infectada) y se calculó el porcentaje con respecto a las células no infectadas. Se contaron al menos tres campos diferentes.

Tabla 2

| MOI | % de infección | | | | | | | |
|------|----------------|---------|----------|--------|----------|-------|----------|--------|
| | A375N | HeLa | LoVo | T84 | SB2 | WI-38 | WI-38 VA | BAEC |
| 1 | 0,03125 | 0,25325 | 0,006 | 0,0215 | 5,833333 | 0,02 | 0,24 | 0,0266 |
| 10 | 3,05 | 7,5 | 0,0095 | 0,64 | 27,9 | 0,41 | 2,86 | 0,85 |
| 100 | 27,675 | 21,5 | 2,15 | 10 | 95,2 | 24,69 | 20,5 | 13,9 |
| 500 | 35,33333 | 77 | 32,5 | 80,5 | ND | 60,35 | 75,25 | 52,6 |
| 1000 | 53,33333 | 84,75 | 73,33334 | 85 | ND | 91 | 79,65 | 55,94 |

- 10 **[0078]** Se observó que, a una multiplicidad de infección (MOI) de 1000, prácticamente todas las líneas están infectadas al menos en un 75%, con la excepción de las células BAEC y A375N, que sólo se infectan un 50%. A una MOI menor de 100 se observa una baja infectividad de las células (aproximadamente 25%) con la excepción de la línea de melanoma SB2 que tiene una infectividad de más del 95%. A una MOI de 10 prácticamente no se ven células infectadas en ninguna línea, salvo SB2.

- 15 **[0079]** En resumen, la capacidad de infección de las líneas celulares testeadas sería SB2>T84>HeLa>WI-38 VA>WI-38>LoVo>BAEC>A375N.

Ejemplo 11.- Ensayos *in vitro* con los adenovirus Ad-F512, Ad(I)-F512-TK y Ad(I)-F512(E3) para la determinación de capacidad oncolítica.

- 20 **[0080]** A fin de comprobar la capacidad oncolítica de los adenovirus (CRAds) construidos de acuerdo con la presente invención, los mismos fueron utilizados para infectar *in vitro* células que poseen diferentes niveles de expresión de SPARC. Particularmente, se emplearon las líneas de melanoma SB2, A375N y MeI; las líneas WI-38, WI-38 VA y HFL-1 de fibroblastos; las líneas de colon T84 y LoVo; la línea HeLa de cervix; la línea endotelial BAEC; y células mesenquimales normales. Se utilizó como control el Ad5-wt (*wild type* o salvaje). Se infectaron las distintas líneas tumorales con los adenovirus Ad-F512 (SEQ ID NO 51 y SEQ ID NO 52), Ad(I)-F512-TK (SEQ ID NO 53 y SEQ ID NO 54), Ad(I)-F512(E3) (SEQ ID NO 55 y SEQ ID NO 56) y Ad5-wt. El efecto lítico de los adenovirus fue evaluado mediante *tinción con cristal violeta* de las células que permanecieron adheridas luego del experimento y a través de la *cuantificación de la actividad metabólica con el ensayo de MTT*.

- 30 **[0081]** El efecto lítico de los adenovirus fue evaluado mediante tinción con cristal violeta: Haciendo referencia a la Fig. 6, el procedimiento de infección en monocapa para el estudio del efecto citopático se describe a continuación. Las células fueron sembradas en placas de 24 pocillos con una densidad de 1×10^4 células/pocillo. Al día siguiente se infectaron en un volumen de 200 μ l de DMEM alta glucosa 2% SFB durante 3 horas a distintas multiplicidades de infección (MOIs). Luego de la infección se agregaron 800 μ l del medio correspondiente de cada línea celular. Diez días después se tiñeron las células con cristal violeta (solución 0,75 % en 40% de metanol) o tinción de β -galactosidasa, y en este último caso se contaron dos campos o más para registrar el porcentaje de infección. En la Figura 6 se muestra una fotografía del ensayo tinción con cristal violeta en placa, para las distintas líneas celulares empleadas.

- 35 **[0082]** El efecto lítico de los adenovirus fue evaluado a través de la cuantificación de la actividad metabólica con el ensayo de MTT: El ensayo de MTT (viabilidad celular) se basa en el clivaje de la sal amarilla de tetrazolio en un compuesto de color púrpura (formazan). Esta reacción sólo ocurre en células metabólicamente activas que tienen la enzima *succinato-tetrazolio reductasa* presente en la cadena respiratoria de las mitocondrias. El efecto lítico

5 medido en función de la actividad metabólica (ensayo MTT) se muestra en la Figura 7. En este ensayo se sembraron placas de 96 pocillos con una densidad de 5×10^3 células/pocillo y el día posterior se infectaron durante 2 horas en un volumen de 25 μ l (DMEM alta glucosa 2%). Luego de 2 horas se adicionó 100 μ l del medio correspondiente de cada línea. Diez días después se cuantificó la viabilidad celular por el método de MTT (Mosmann, T. *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays*. J Immunol Methods, 65: 55-63, 1983).

10 **[0083]** Los ensayos de viabilidad con MTT se muestran en la Figura 7. En líneas generales, se observa una actividad lítica para los diversos tipos celulares similar a la mostrada por cristal violeta; sólo que en este caso se observó mayor viabilidad para cada MOI que en las correspondientes tinciones con cristal violeta. En estos ensayos se incluyeron tres líneas de cáncer de mama (578T, MCF7 y T-47D), todas con muy baja expresión de SPARC, y en el caso de T-47D con baja actividad de F512. Sorprendentemente, dos de las líneas (MCF7 y T-47D) resultaron susceptibles a los CRAds a una MOI de 100.

15 **[0084]** Sorprendentemente, todas las células tumorales fueron lisadas por los CRAds. Sin embargo, la actividad lítica de los CRAds en las células tumorales resultó independiente del grado de expresión de ARNm de SPARC o de la actividad del promotor en la línea celular. Así, por ejemplo, para células de melanoma, todos los virus resultaron más efectivos en SB2 que en MeJ o A375N. Este resultado es coincidente con la infectividad de las células pero no con la actividad del promotor o la expresión de SPARC. Dado que los virus poseen diferente capacidad de infección en cada línea, la comparación entre los diferentes virus se realizó principalmente dentro de la misma línea celular. En primer lugar, SB2 se lisa con mayor efectividad con Ad(I)-F512(E3) > Ad-F512 ~ Ad(I)-F512-TK \pm GCV, mientras que en MeJ (en donde el promotor mostró una actividad mucho mayor) Ad(I)-F512(E3) ~ Ad-F512 > Ad(I)-F512-TK \pm GCV.

20 **[0085]** De esta comparación resulta claro que el virus menos potente es aquel que tiene incorporada la secuencia *insulator*, y que el agregado de la región E3 hace más efectiva la lisis. Por otra parte, no se observa un aumento del efecto lítico al agregar GCV al cultivo de células infectadas con Ad(I)-F512-TK.

25 **[0086]** Por otro lado, se observó que las líneas de colon T84 y LoVo resultaron muy susceptibles al Ad-F512. En el caso de LoVo este efecto es más fuerte que el observado para las células SB2 de melanoma. Observamos que Ad-F512 fue capaz de lisar a fibroblastos WI-38 (los cuales expresan la proteína SPARC en forma moderada), a una MOI de 500, mientras que los dos virus que tienen una secuencia *insulator* entre el ITR del virus y el promotor, resultaron líticos a una MOI de 1000. El agregado de GCV aumenta ligeramente la capacidad lítica de Ad(I)-F512-TK. Dos líneas adicionales de fibroblastos (WI-38VA y HFL-1) analizadas con el virus Ad-F512 fueron pobremente lisados a MOI de 1000. En las tres líneas de fibroblastos el Ad5-wt fue capaz de lisar a una MOI de 1. Las células endoteliales no resultaron susceptibles al Ad-F512, independientemente de su alta expresión de SPARC. Las células mesenquimales primarias derivadas de médula ósea no fueron afectadas por Ad-F512 pero sí por Ad5-wt, a una MOI de 100.

35 **[0087]** En conclusión, el F512 en el contexto de tres adenovectores resulta lítico en la mayor parte de las líneas tumorales, mientras que no afecta a células normales como mesenquimales, endotelio, y algunos fibroblastos.

Ejemplo 12.- Producción de virus en diferentes líneas celulares

40 **[0088]** Con el propósito de evaluar la capacidad de replicación de los CRAds en diferentes líneas tumorales, se llevó a cabo un ensayo de "*Producción de Virus*" (*virus yield*). Los resultados del mismo se muestran en la Figura 8.

[0089] El procedimiento general para la producción de virus en las distintas líneas celulares se describe a continuación:

45 **[0090]** El día 0 se sembraron 100000 células en cada pocillo de una placa de 6. El día 1 se infectaron las células a una MOI de 50 en un volumen de 300 μ l por pocillo en medio DMEM alta glucosa al 2% SFB. La infección se llevó a cabo durante 1 hora a 37°C con al menos dos agitaciones. Posteriormente se sacó el medio, se lavó dos veces con PBS y se agregó 1 ml del medio 10% de SFB. Luego de tres días, las células se mantuvieron a temperatura ambiente durante 15 minutos y se levantaron conjuntamente con el medio. Se colocó el sobrenadante en un tubo Eppendorf y se realizaron tres ciclos de congelado y descongelado con nitrógeno líquido. Posteriormente se centrifugó a 4500 rpm y se hicieron diluciones seriadas de 1/10 de ese sobrenadante en medio DMEM alta glucosa 5% de SFB y 0,01 M de HEPES. Se sembraron 100 μ l de cada dilución (sextuplicado) en un pocillo de una placa de 96 que el día anterior fue sembrado con células 293 a razón de

20000 células/pocillo. Cinco días después se fijaron las células con paraformaldehído 4% y se tiñeron con la solución de cristal violeta.

5 **[0091]** Haciendo referencia a la Fig. 8, la producción de los adenovirus en las distintas líneas (melanoma, colon, mama, fibroblastos y endotelio) está expresada como partículas virales por ml (pv/ml), y cada barra representa el promedio de al menos dos ensayos independientes.

10 **[0092]** En primer lugar, se destaca que la producción de los adenovirus es independiente de la expresión de ARNm de SPARC. En segundo lugar, todas las líneas muestran mayor replicación de Ad(l)-F512(E3) que del virus Ad-F512. En tercer lugar, la producción del adenovirus Ad5-wt difiere entre las distintas líneas hasta 5 órdenes de magnitud (comparar 578T con respecto a LoVo), lo cual en parte puede ser atribuido a la baja infectividad de algunas de las líneas. Por otro lado, las líneas que producen mayor cantidad de CRAds son las que presentan mayor susceptibilidad a los CRAds (líneas de colon).

Ejemplo 13.- Estudio del efecto cooperativo entre virus no replicativos y virus replicativos

15 **[0093]** Tal como se enunció anteriormente, un adenovirus no replicativo requiere del aporte en trans de la proteína E1A para poder iniciar la replicación. Cuando se amplifica un adenovirus no replicativo se utilizan las células 293 que han sido modificadas para expresar constitutivamente la proteína E1A, pero esta proteína también puede ser provista por un adenovirus replicativo. Con el propósito de estudiar la cooperación de Ad-F512 y un adenovirus no replicativo (Ad-β-gal) se infectaron células de colon T84 con una cantidad constante de Ad-β-gal (MOI 10) y cantidades crecientes de Ad-F512. El Ad-F512 es capaz de complementar al adenovirus no replicativo, permitiendo su replicación y distribución a las células vecinas, dado que a medida que aumenta la cantidad de Ad-F512 se observa un aumento de las células teñidas de azul que evidencian el aumento local del virus Ad-β-gal. La Figura 9 muestra la tinción de β-gal para las distintas MOI ensayadas en las células de colon T84.

Ejemplo 14.- Ensayos *in vivo* utilizando los CRAds Ad-F512 y Ad(l)-F512-TK

25 **[0094]** Se utilizaron ratones machos atímicos N:NIH(S)-nu de 6-8 semanas de edad (obtenidos de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de La Plata). Se llevaron a cabo tres ensayos *in vivo* diferentes utilizando los adenovirus recombinantes obtenidos de acuerdo con la presente invención: dos ensayos con Ad-F512 y uno con Ad-(l)F512-TK.

30 **[0095]** Los animales fueron inyectados subcutáneamente con un inóculo de 4×10^6 células SB2 de melanoma. Cuando los tumores alcanzaron un volumen promedio de 100 mm^3 (aproximadamente a los 20 días), se inició la inyección intratumoral del adenovirus a razón de 10^{10} pv/30 μl por dosis. Cada animal recibió un total de tres dosis a los días 0, 2 y 8 de iniciado el tratamiento. En uno de los ensayos, cuando se utilizó el CRAd que expresa en forma simultánea la enzima herpética *hsv*-TK, se alternó el tratamiento del adenovirus con la inyección de la prodroga ganciclovir (GCV, Cytovene[®], Rotang), según lo esquematizado en la Figura 10A, donde se indican con flechas las inyecciones del CRAd, así como también el tratamiento con GCV. Esta droga fue administrada una vez al día a razón de 30 mg/kg.

[0096] El grupo control recibió la inyección de un adenovirus no replicativo (Ad-β-gal), que además expresa un gen que no es terapéutico, en lugar de alguno de los dos CRAds utilizados en el presente ensayo.

40 **[0097]** La Figura 10A muestra las curvas de crecimiento tumoral en el ensayo utilizando el CRAd Ad-F512-TK, donde además se indican las inyecciones efectuadas del CRAd y la administración de ganciclovir. La Figura 10B muestra las curvas del crecimiento tumoral en los ratones utilizados en el ensayo con Ad-F512. La Figura 10C es una fotografía de la zona tumoral en un ratón control (inyectado con Ad-β-gal) y en uno tratado con el CRAd Ad-F512. La Figura 10D muestra fotografías histológicas de cortes realizados sobre algunos animales a los 14 días de iniciado el tratamiento. Las Figuras 10E y 10F son curvas de Kaplan-Meier (% de sobrevida) para los dos ensayos realizados con Ad-F512.

45 **[0098]** En los dos ensayos con el Ad-F512 se observó total remisión en la mayor parte de los tumores tratados (Figuras 10B, 10E y 10F) con la presencia de una cicatriz en el lugar del tumor (indicada con una flecha en la Figura 10C). Haciendo referencia nuevamente a las Figuras 10E y 10F, estas curvas indican que la mayor parte de los animales tratados con Ad-F512 continúan con vida luego de 90 días, ya sea porque su tumor no crece, se regresiona totalmente o crece a más baja tasa, mientras que los animales controles (tumor + Ad-β-gal) se mueren debido a que el tumor continúa creciendo.

50

5 [0099] Se realizaron estudios histológicos de algunos animales, que fueron fijados en formol 10% y posteriormente procesados. De esta forma, un estudio histológico de la zona de la cicatriz reveló diferencias entre los días 14 y 90 de iniciado el tratamiento: mientras que a los 14 días se observa abundante infiltrado de macrófagos con pigmentación en su interior, con focos polimorfonucleares, restos nucleares y vascularización granulomatosa (ver Figura 10D), a los 90 días se observa que el tejido se ha reparado completamente. En ambos casos se realizó la autopsia del animal entero no encontrando metástasis; sin embargo, en uno de los animales a los 90 días se observó el bazo con un foco de fibrosis y el hígado con un foco de hepatitis. Ninguno de los controles analizados mostró estas características.

10 [0100] Las curvas de supervivencia (Figuras 10E y 10F) en los dos ensayos con Ad-F512 son muy similares entre sí y difieren significativamente del control.

[0101] Por otro lado, haciendo referencia a la Figura 10A, el ensayo con el CRAd que expresa el gen suicida TK no mostró diferencias estadísticamente significativas en presencia o en ausencia de GCV, pero el virus resulta igualmente efectivo comparado con el control.

Ejemplo 15 – Ensayos *in vitro* utilizando los CRADs Ad-F512, Ad(I)-F512-TK y Ad(I)-F512(E3)

15 a) **Análisis de líneas tumorales**

[0102] En esta etapa, el análisis previo llevado a cabo como se describió en el Ejemplo 11 se extendió mediante el ensayo de otras líneas tumorales de cáncer de melanoma, colon, mama y páncreas. Se analizó el efecto citopático de virus sobre células mediante la tinción con cristal violeta de las células que permanecieron pegadas al pocillo después de 10 días de pos-infección con el adenovirus. Los resultados se muestran en la Figura 11.

20 [0103] Las células de melanoma Mel888 (amablemente provistas por la Dr. Estela Medrano, Houston, TX) fueron lisadas mediante adenovirus a las mismas concentraciones virales que para los ensayos con células SB2 y IIB-Mel-J (las primeras amablemente provistas por Dr. Estela Medrano, Houston, TX y las segundas por Ledda y col, *Suppression of SPARC by antisense RNA abrogates the tumorigenicity of human melanoma cells*, Nat. Med. 1997 Feb; 3(2):171-6) ensayado en el Ejemplo 11 anterior. Las dos líneas de colon HT29 (ATCC N° HTB-38) y CaCo-2 (ATCC N° HTB-37) incluidas en estos nuevos ensayos mostraron también la susceptibilidad de las células de colon a los CRADs construidos. Se ha encontrado que la línea de cáncer de páncreas MIA-PaCa-2 (ATCC N° HTB-22) es sensible a una concentración de adenovirus de 5×10^7 pv/ml, mientras que las cuatro líneas de 578T de mama (ATCC N° HTB-126), T-47D (ATCC N° HTB-133), MCF-7 (ATCC No. HTB-22) y MDA-231 (ATCC N° HTB-26) no son afectadas por los CRADs, (ver Figura 11). En todos los casos el virus tipo salvaje (Ad5-wt) es capaz de eliminar todas las células tumorales.

b) **Análisis de líneas normales**

35 [0104] Uno de los requerimientos para utilizar un adenovirus oncolítico en un ensayo clínico es que debería ser activo en células de tumor e inactivo en células normales. A fin de establecer el nivel de atenuación en células normales de los tres virus oncolíticos construidos, se analizó su actividad en un panel de dichas células. Se incluyeron líneas celulares de melanocitos, colon y mama normales así como fibroblastos, queratinocitos y células microendoteliales humanas. Después de 10 días de pos-infección con 5×10^6 partículas virales /ml de Ad-F512, Ad(I)-F512-TK o Ad(I)-F512(E3) la viabilidad de los melanocitos fue mayor al 95% mientras que 100% de las células fueron lisadas mediante el Ad-wt (ver Figura 12A). Se mostró (ver Figura 12B) que los virus oncolíticos tampoco tuvieron ningún efecto sobre las células normales de colon CCD841 (ATCC N° CRL-1790), o de mama MCF-12A (ATCC N° CRL-10782), (ver Figura 12C). Estas líneas no tienen expresión de SPARC (ver Tabla 3 abajo). También se analizaron células microendoteliales humanas hMEC-1 (gentilmente cedidas por Isaiah Fidler, Houston, TX) con expresión de SPARC y se observó que las mismas son lisadas por los adenovirus a una alta MOI (ver Figura 12D). Posteriormente se analizaron otros componentes celulares presentes en la piel como los queratinocitos o los fibroblastos. Los primeros no producen SPARC mientras que los segundos tienen una expresión intermedia de SPARC comparada con la línea de células tumorales A375N (ver Tabla 3, abajo). En la Figura 12E se muestra el efecto viral en queratinocitos (HaCaT, gentilmente cedidas por el laboratorio Craveri) y en las células fibroblastos CCD1140 (ATCC N° CRL-2714) y Malme-3 (ATCC N° HTB-102). Se observó que ni los queratinocitos ni las líneas de fibroblastos fueron lisadas por los adenovirus.

50 [0105] Por consiguiente, los CRADs no lisan las células normales que no expresan SPARC (colon, mama, melanocitos, queratinocitos), lisando en cambio las células microendoteliales hMEC-1 que expresan SPARC.

Tabla 3: Expresión relativa de SPARC de las líneas celulares utilizadas en el estudio. La expresión promedio de ARNm se muestra en relación a la expresión en la línea tumoral A375N. DS: Desviación estándar

| Línea celular | Origen | Promedio | DS |
|---------------|----------------------|------------|------------|
| A375N | Melanoma | 1 | 0 |
| Mel888 | Melanoma | 0,1523333 | 0,00617342 |
| HT-29 | Colon | 0,00083554 | 1,4217E-05 |
| CaCO2 | Colon | 0,00194873 | 0,00047591 |
| 578T | Mama | 1,585 | 0,345 |
| T-47D | Mama | 0,00152448 | 0,00045275 |
| MCF-7 | Mama | 0 | 0 |
| MDA-231 | Mama | 0 | 0 |
| BxPC3 | Páncreas | 0 | 0 |
| MiaPaca-2 | Páncreas | 0 | 0 |
| NHM | Melanocitos normales | 0,05 | 0 |
| CCD841 | Colon normal | 0,04033333 | 0,01125956 |
| MCF12-A | Mama normal | 0 | 0 |
| hMEC-1 | microendotelial | 0,20225 | 0,01271728 |
| HACAT | queratinocitos | 0,0005 | 0,0005 |
| CCD1140 | fibroblastos | 0,417 | 0,0609836 |

5 c) **Efecto lítico de Ad(I)-F512-TK en células que expresan SPARC: células tumorales y estromales (fibroblastos y endotelio) creciendo en monocapa.**

10 [0106] Los ensayos *in vitro* con células del estroma tumoral (endoteliales y fibroblastos) demostraron que aún con alta o moderada expresión de SPARC los adenovirus no tuvieron la misma actividad que en las células tumorales. De acuerdo con una hipótesis de los inventores de la presente, las células normales tienen más resistencia a la replicación viral. En este caso, el agregado de un gen tóxico permitiría aumentar la capacidad

15 lítica en forma específica en aquellas células en donde el promotor de SPARC fuera activo. Es por ello que se llevaron a cabo experimentos *in vitro* con Ad(I)-F512-TK en los cuales las células fueron tratadas también con el agregado de la prodroga ganciclovir (GCV). En primer lugar se observó que el agregado de GCV mejora la lisis del virus en las células de melanoma SB2 (ver Figura 13A); esta mejora es más efectiva si se deja actuar al virus oncolítico y luego de 72 hs se comienza con el agregado de GCV. En cuanto a las células endoteliales, son más sensibles a la presencia de la prodroga sola (ver Figura 13B, las tres primeras barras a la izquierda). El agregado del virus a una MOI de 750 y en presencia de 50 μ M o 100 μ M de CGV permite eliminar la casi totalidad de las células (últimas dos columnas de la Figura 13B). Otras células endoteliales analizadas fueron las de aorta bovina (BAEC, gentilmente cedidas por Helene Sage, Seattle, USA). Estas células que expresan valores mayores de SPARC que A375N y en las cuales el promotor humano F512 es muy activo (ver Ejemplo 1 y 3B anteriores), sin embargo no se infectan bien con la cápside de Ad5. Al igual que lo que ocurre con hMEC-1, las células son sensibles a la prodroga, pero la presencia de la prodroga GCV sumada al virus permite la eliminación de las células a concentraciones virales en las cuales el virus por sí mismo no posee efecto (ver Figura 13C).

20

Ejemplo 16 – Ensayos *in vivo* utilizando los CRAbs Ad-F512 y Ad(I)-F512-TK

5 [0107] Se llevaron a cabo ensayos *in vivo* en animales (ratones machos atímicos N:NIH (S) – nu de 6-8 semanas de edad), en los cuales se inyectaron tumores mixtos de melanoma de compuestos de células tumorales y estromales. Posteriormente, estos tumores fueron tratados con los CRAbs obtenidos de acuerdo con la presente invención, utilizando el mismo protocolo para los tumores de solo células de melanoma.

10 [0108] En la Figura 14A se muestra el resultado de un ensayo en el cual los animales eran portadores de tumores mixtos SB2-hMEC-1/WI38 y fueron tratados con Ad-F512. Se observó que el tratamiento con el adenovirus produce un retraso relevante en el crecimiento del tumor incluso cuando las células malignas fueron co-inyectadas con células endoteliales (hMEC-1) y fibroblastos (WI38), demostrando que este virus puede ser efectivo, en una situación similar a la que se da en un tumor.

[0109] Este mismo resultado se obtuvo al repetir el ensayo (datos no mostrados).

15 [0110] Posteriormente, se probó la eficacia del tratamiento adenoviral sobre tumores mixtos de células tumorales y fibroblastos. Se observó que el tratamiento de tumores SB2/WI38 con Ad-F512 resultó parcialmente efectivo (Figura 14B). Cuando se inyectaron células SB2/hMEC-1, se observó que algunos de los animales respondían mucho mejor al tratamiento aunque no hubo ningún rechazo (Figura 14C). Finalmente los tumores SB2/WI38 fueron tratados con Ad(I)-F512-TK + GCV, observándose que 3 de un total de 5 animales rechazaron completamente el tumor, indicando que el agregado del gen tóxico TK mejora significativamente el efecto del virus (Figura 14D).

20 [0111] Por otra parte, esta descrito (Yamazaki, M., Straus, F. H., Messina, M., Robinson, B.G., Takeda, T., Hashizume, K., y DeGroot, L. J., Adenovirus-mediated tumor-specific combined gene therapy using Herpes simplex virus thymidine/ganciclovir system murine interleukin-12 induces effective antitumor activity againts medullary thyroid carcinoma, Cancer Gene Ther., 11:8-15, 2004) que muchos CRAbs muestran mayor especificidad *in vitro* que *in vivo*. Como se vió en el Ejemplo 11, los virus de la presente invención eran capaces de eliminar células de cáncer de colon *in vitro*. Sin embargo, estudios previos (Yamazaki y col., 2004, que antecede) sugerirían que esto podía deberse a efectos inespecíficos. En consecuencia, se llevaron a cabo ensayos *in vivo* con tumores de cáncer de colon y páncreas.

30 [0112] Un dato a destacar fue el efecto observado *in vivo* con tumores de colon. De hecho, Ad-F512 y Ad(I)-F512-TK fueron incapaces de eliminar *in vivo* el tumor de células LoVo (Figura 15A); sin embargo, el agregado de células endoteliales hMEC-1 a esos tumores en presencia de GCV permitió retrasar el crecimiento de los tumores de colon comparado con los tumores del grupo control, indicando que la presencia de células endoteliales que expresan SPARC podría favorecer la eliminación de tumores cuyas células malignas no expresan SPARC (Figura 15B).

35 [0113] Sobre esta misma base, en otro grupo de experimentos se trataron tumores mixtos de Mia-PaCa-2 (ATCC N° CRL-1420) (páncreas maligno)/hMEC-1 con Ad-F512 y Ad(I)-F512-TK + GCV, observándose sorprendentemente que estos tumores se eliminan completamente (Figura 15C).

LISTADO DE SECUENCIAS

[0114]

40 <110> INIS Biotech LLC

<120> Un Fragmento de ADN Aislado del Promotor Humano de SPARC y su Uso para Dirigir la Expresión de un Gen Heterólogo en Células Tumorales

45 <130> SPARC

<160> 56

<170> PatentIn Versión 3.4

ES 2 384 736 T3

<210> 1
<211> 548
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

5

<220>
<223> Secuencia promotora derivada del promotor completo humano de la proteína SPARC humana

<400> 1

10

gcagctgtc ttgtcttac agtggttaagt cctggccttg ccttgtggc aaatacaacc 60
ccctgaatt gcttggccct tctcagcatt gcctaattt agggaggact cctgtaaagc 120

15

tcactggta gaagatcaag acactgggc ctggttctgc ccctgggggc cattgggtaa 180
ttcctgcag tctccaggcc tcaactgccc tctgaacaag aaagaggctg ttctgggtca 240

20

tcctccagg cctgtccagc cctggcactc tgtgagtcgg tttaggcagc agccccggaa 300
cagatgaggc aggcagggtt gggacgtttg gtcaggacag cccaccgcaa aaagaggagg 360

25

aaagaaatga aagacagaga cagcttggc tatgggagaa ggaggaggcc gggggaagga 420
ggagacagga ggaggagga ccacggggtg gaggggagat agaccagcc cagagctctg 480

30

aggagagc 548

<210> 2
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35

<220>
<223> Cebador sintetizado químicamente

<400> 2

40

aaccgaagag gaggtggtg 19

<210> 3
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45

<220>
 <223> Cebador sintetizado químicamente

5 <400> 3
 gcaaagaagt ggcaggaaga 20

<210> 4
 <211> 20
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador sintetizado químicamente

15 <400> 4
 agaaaatctg gcaccacacc 20

<210> 5
 20 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 25 <223> Cebador sintetizado químicamente

<400> 5
 cagaggcgta cagggatagc 20

30 <210> 6
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Cebador sintetizado químicamente

<400> 6
 40 ctagctagca gctgggtgtt gtggcat 27

<210> 7
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador sintetizado químicamente

 <400> 7
 5 acgcgtcgac ctcaaggca ggca 24

 <210> 8
 <211> 38
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador sintetizado químicamente

 15 <400> 8
 cggcctcctc ctctcccct gtctctgtct ttcatttc 38

 <210> 9
 <211> 26
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador sintetizado químicamente
 25
 <400> 9
 ctagctagcg ggagaaggag gaggcc 26

 <210> 10
 30 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 35 <223> Cebador sintetizado químicamente

 <400> 10
 gcagatctcc tcagtgcag gc 22

 40 <210> 11
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 45 <220>

<223> Cebador sintetizado químicamente

<400> 11
gcacgcgtag ctgggtgttg tgg 23

5

<210> 12
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> Cebador sintetizado químicamente

<400> 12
15 cgagatctgc tctccgggca g 21

<210> 13
<211> 25
<212> ADN
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador sintetizado químicamente

<400> 13
25 cgagatctgg gcagtctgaa ggacc 25

<210> 14
<211> 23
30 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador sintetizado químicamente

35

<400> 14
cgacgcgtgc agcttgctt gtc 23

<210> 15
40 <211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
45 <223> Cebador sintetizado químicamente

ES 2 384 736 T3

<400> 15
 gcagatctag tctgaaggac cgcg 24

5 <210> 16
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Cebador sintetizado químicamente

<400> 16
 gaacgcgtgg gagaaggagg ag 22

15 <210> 17
 <211> 1246
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Secuencia del promotor humano de SPARC correspondiente a las bases -1175/+71 desde el inicio de la transcripción.

25 <400> 17

agctgggtgt tgtggcatgt ggcctgtaa tcccagctac tctggaggct gaggcgcat 60

aattgctga acccgggagg cagaggtgc agtgagccga aatcatacca ctgcactcca 120

30 gcctgggcca cagagtgagt gagactctgt ctcaaaaca acaaaaca acaaaaca 180

aaaccgaaa ccacaaaact tttgaggac aaggaccagg tattattaa ttctatacc 240

35 tcccagagtg ttaggcacaa aataaacatt caaccaagac ctgttgact gagcagttca 300

tatataacag gaggaccaca agtgaaacg tagaatcagc cctctatac cacttttgc 360

caggatgca taggcaagt acttagcatc tatgttctc tattattaa atggcataa 420

40 ttacaatgcc taagataagg ggtgctgtg aagattatta aatcctcagt aaacttggc 480

tattgtact cctatgatta tcatcaatat catcaattac ctatctgtt caatactggt 540

45 ggacaggtc caccagctag atgtctaac cctatgtgt ctattagtg tacaagtga 600

ES 2 384 736 T3

gttgagtg gattttttt ttaagacca gttccaaatc atcaaggatg ataccactag 660

5 tagcagcttg tctgtctgt acagtggtaa gtcctggcct tgctttgtg gcaaatacaa 720

ccccctgaa ttgctggcc ctctcagca tgcctaata ttagggagga ctctgtaaa 780

gctcactggt tagaagatca agacactgg gcctggttct gcccctgggg gccattgggt 840

10 aattcctgc agtctccagg cctcactgc cctctgaaca agaaagaggc tgttctgggt 900

catccctcca ggcctgtcca gccctggcac tctgtgagtc ggtttaggca gcagccccgg 960

15 aacagatgag gcaggcaggg ttgggacgtt tggtcaggac agcccaccgc aaaaagagga 1020

ggaaagaaat gaaagacaga gacagcttg gctatgggag aaggaggagg ccgggggaag 1080

gaggagacag gaggaggagg gaccacgggg tggaggggag atagaccag cccagagctc 1140

20 tgagtgggtt cctgttgct gtctctaaac ccctccacat tcccgggtc cttcagactg 1200

cccgagagc ggcctctgcc tgccgctgc ctgcctgcca ctgagg 1246

<210> 18

25 <211> 1236

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

30 <223> Este promotor es una modificación del promotor completo de SPARC -1175/+71, en donde se delecionó una secuencia de 10 pb comprendida entre las dos cajas GGA.

<400> 18

35 agctgggtgt tgggcatgt ggcctgtaa tcccagctac tctggaggct gaggcgcat 60

aattgctga acccgggagg cagaggtgc agtgagccga aatcatacca ctgcactcca 120

gcctgggcca cagagtgagt gagactctgt ctcaaaacaa acaaaacaaa acaaaacaaa 180

40 aaaccgaaa ccacaaaact tttgaggac aaggaccagg tatttattaa ttctatacc 240

tcccagagtg ttaggcacaa aataaacatt caaccaagac ctgttgact gagcagttca 300

45 tatataacag gagtgacca agtgaaacg tagaatcagc cctctcatic cactttttgc 360

ES 2 384 736 T3

caggatgca taggcaagt acttagcatc tatgttctct tattattaa atggcataa 420

ttacaatgcc taagataagg ggttgctgtg aagattatta aatcctcagt aatgttact 480

5 cctatgatta tcatcaatat catcaattac cttatctgtt caatactggt ggcacaggtc 540

caccagctag atgtctaate ccttatgtgt ctattagtg tacaagtga gttgagtg 600

10 gattttttt ttaagacca gttccaaatc atcaaggatg ataccactag tagcagcttg 660

tctgtctgt acagtggtaa gtcctggcct tgcctttgtg gcaaatacaa ccccctgaa 720

ttgctggcc ctctcagca ttgctaata ttagggagga ctctgtaa gctcactggt 780

15 tagaagatca agacactgg gcctggttct gccctgggg gccattgggt aattcctgc 840

agtctcagg cctcactgc cctctgaaca agaaagaggc tgtctgggt catccctca 900

20 ggcctgtcca gccctggcac tctgtgagtc ggttaggca gcagccccgg aacagatgag 960

gcaggcaggg ttgggacgtt tggtcaggac agcccaccgc aaaaagagga ggaaagaat 1020

gaaagacaga gacagcttg gctatgggag aaggaggagg ccgggggaag gaggagacag 1080

25 gaggaggagg gaccacgggg tggaggggag atagaccag cccagagctc tgagtggttt 1140

cctgttgct gtcttaaac cctccacat tcccgggtc cttcagactg cccggagagc 1200

30 gcgctctgcc tgccgctgc ctgctgcca ctgagg 1236

<210> 19

<211> 1210

<212> ADN

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintetizado químicamente

40 <400> 19

agctgggtgt tgggcatgt ggcctgtaa tcccagctac tctggaggct gaggcgcat 60

aattgctga acccgggagg cagaggtgc agtgagccga aatcatacca ctgcactcca 120

ES 2 384 736 T3

gcctgggcca cagagtgagt gagactctgt ctcaaaacaa aacaaaacaa acaaacaaaa 180
aaaccggaaa ccacaaaact tttgaggac aaggaccagg tattattaa ttctatacc 240
5 tcccagatg ttaggcacaa aataaacatt caaccaagac ctgttcact gagcagtca 300
tatataacag gagtgacca agtgaaacg tagaatcagc cctctatac cacttttgc 360
caggatgca taggcaagt acttagcatc tatgttctc tattattaa atggcataa 420
10 ttacaatgcc taagataagg ggtgctgtg aagattatta aatcctcagt aaacttggc 480
tattgtact cctatgatta tcatcaatat catcaattac cttatctgtt caatactggt 540
15 ggacaggtc caccagctag atgtctaac ccttatgtgt ctattagtg tacaagtgga 600
gtttgatgg gattttttt ttaagacca gttcacaac atcaaggatg ataccactag 660
tagcagctg tctgtctgt acagtggtaa gtctggcct tgctttgtg gcaaatacaa 720
20 ccccttgaa ttgctggcc ctctcagca ttgcctaata ttagggagga ctctgtaaa 780
gctcactggt tagaagatca agacactgg gcttggttct gccctgggg gccattgggt 840
25 aattctgc agtctccagg cctcactgc cctctgaaca agaaagaggc tgttctgggt 900
catccctcca ggctgtcca gccctggcac tctgtgagtc ggttaggca gcagccccg 960
aacagatgag gcaggcagg tgggacgtt tggcaggac agcccaccgc aaaaagagga 1020
30 ggaaagaaat gaaagacaga gacagcttg gctatgggag aaggaggagg ccgggggaag 1080
gaggagacag gaggaggagg gaccacgggg tggaggggag atagaccag cccagagctc 1140
35 tgagtgttt cctgtgcct gtctctaac ccctccacat tcccgggtc cttcagactg 1200
cccggagagc 1210
<210> 20
40 <211> 1203
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
45 <223> Sintetizado químicamente

ES 2 384 736 T3

<400> 20

5 agctgggtgt tgggcatgt ggcctgtaa tcccagctac tctggaggct gaggcgcat 60
aattgctga acccgggagg cagaggtgc agtgagccga aatcatacca ctgcactcca 120
gcctgggcca cagagtgagt gagactctgt ctcaaaaca acaaaaaca acaacaaaa 180

10 aaaccggaaa ccacaaaact tttgaggac aaggaccagg tattattaa ttctatacc 240
tcccagagtg ttaggcacaa aataaacatt caaccaagac ctgttcact gagcagttca 300
tatataacag gagtgacca agtgaaacg tagaatcagc cctctatac cacttttgc 360

15 cagggtatca taggcaagtt acttagcatc tatgttctct tattattaa atggcataa 420
ttacaatgcc taagataagg ggtgctgtg aagattatta aatcctcagt aaacttggc 480

20 tattgttact cctatgatta tcatcaatat catcaattac ctatctgtt caatactggt 540
ggcacaggtc caccagctag atgtctaac ccttatgtgt ctattagtg tacaagtga 600
gttgagtg gattttttt ttaagacca gttccaaatc atcaaggatg ataccactag 660

25 tagcagcttg tctgtctgt acagtggtaa gtctggcct tgctttgtg gcaaataca 720
ccccctgaa ttgcttgcc ctctcagca ttgcctaata ttagggagga ctctgtaaa 780

30 gctcactggt tagaagatca agacacttg gctgttct gccctgggg gccattgggt 840
aattcctgc agtctccagg cctcactgc cctctgaaca agaaagaggc tgttctgggt 900
catccctcca ggcctgtcca gcctggcac tctgtgagtc gtttaggca gcagccccg 960

35 aacagatgag gcaggcaggg ttgggacgtt tggtcaggac agcccaccgc aaaaagagga 1020
ggaaagaaat gaaagacaga gacagcttg gctatgggag aaggaggagg ccgggggaag 1080

40 gaggagacag gaggaggagg gaccacgggg tggaggggag atagaccag cccagagctc 1140
tgagtggttt cctgttgcct gtctctaaac ccctccacat tcccgggtc cttcagactg 1200
ccc 1203

ES 2 384 736 T3

<210> 21
<211> 584
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<223> Sintetizado químicamente

<400> 21

10

gcagctgtc ttgtctgtac agtggttaagt cctggccttg cctttgtggc aaatacaacc 60
cccttgaatt gcttggccct tctcagcatt gcctaattt agggaggact cctgtaaagc 120

15

tcactggta gaagatcaag acactgggc ctggttctgc ccctgggggc cattgggtaa 180
ttcctgcag tctccaggcc tcaattgccc tctgaacaag aaagaggctg ttctgggtca 240

20

tcctccagg cctgtccagc cctggcactc tgtgagtcgg tttaggcagc agccccggaa 300
cagatgaggc aggcagggtt gggacgtttg gtcaggacag cccaccgcaa aaagaggagg 360

25

aaagaaatga aagacagaga cagctttggc tatgggagaa ggaggaggcc gggggaagga 420
ggagacagga ggaggagga ccacggggtg gagggagat agaccagcc cagagctctg 480

30

agtgtttcc tgttcctgt ctctaaacc ctccacattc ccgcggtcct tcagactgcc 540
cggagagcgc gctctgctg ccgctgcct gctgccact gagg 584

<210> 22
<211> 541
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35

<220>
<223> Sintetizado químicamente

<400> 22

40

gcagctgtc ttgtctgtac agtggttaagt cctggccttg cctttgtggc aaatacaacc 60
cccttgaatt gcttggccct tctcagcatt gcctaattt agggaggact cctgtaaagc 120

ES 2 384 736 T3

tcactggta gaagatcaag acactgggc ctggtctgc ccctggggc cattgggtaa 180
tccttgag tctccaggcc tcaactgcc tctgaacaag aaagaggctg ttctgggtca 240
5 tcctccagg cctgtccagc cctggcactc tgtgagtcgg ttaggcagc agccccgaa 300
cagatgagc aggcagggtt gggacgttg gtcaggacag cccaccgcaa aaagaggagg 360
aaagaaatga aagacagaga cagcttggc tatgggagaa ggaggaggcc ggggaagga 420
10 ggagacagga ggaggagga ccacggggtg gagggagat agaccagcc cagagctctg 480
agtgttcc tgtgcctgt ctctaaacc ctccacatc ccggtctct tcagactgc 540
15 c 541
<210> 23
<211> 537
<212> ADN
20 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> Sintetizado químicamente
25 <400> 23
gcagctgtc ttgtgtac agtgtaagt cctggcctg ccttgggc aaatacaacc 60
ccctgaatt gctggccct tctcagcatt gcctaatatt agggaggact cctgaaagc 120
30 tcactggta gaagatcaag acactgggc ctggtctgc ccctggggc cattgggtaa 180
tccttgag tctccaggcc tcaactgcc tctgaacaag aaagaggctg ttctgggtca 240
35 tcctccagg cctgtccagc cctggcactc tgtgagtcgg ttaggcagc agccccgaa 300
cagatgagc aggcagggtt gggacgttg gtcaggacag cccaccgcaa aaagaggagg 360
aaagaaatga aagacagaga cagcttggc tatgggagaa ggaggaggcc ggggaagga 420
40 ggagacagga ggaggagga ccacggggtg gagggagat agaccagcc cagagctctg 480
agtgttcc tgtgcctgt ctctaaacc ctccacatc ccggtctct tcagact 537
45 <210> 24

ES 2 384 736 T3

<211> 191
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Sintetizado químicamente

<400> 24

10 gggagaagga ggaggccggg ggaaggagga gacaggagga ggagggacca cggggtggag 60
gggagataga cccagcccag agctctgagt ggttctctgt tgctgtctc taaaccctc 120
cacattcccg cggctctca gactgcccgg agagcgcgct ctgctgccg cctgcctgcc 180

15 tgccactgag g 191

<210> 25
<211> 155
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Sintetizado químicamente

25 <400> 25

gggagaagga ggaggccggg ggaaggagga gacaggagga ggagggacca cggggtggag 60

30 gggagataga cccagcccag agctctgagt ggttctctgt tgctgtctc taaaccctc 120
cacattcccg cggctctca gactgcccgg agagc 155

35 <210> 26
<211> 148
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Sintetizado químicamente

<400> 26

gggagaagga ggaggccggg ggaaggagga gacaggagga ggagggacca cggggtggag 60

ES 2 384 736 T3

gggagataga cccagcccag agctctgagt gggttcctgt tgccgtctc taaaccctc 120

cacattcccg cggtcctca gactgccc 148

5 <210> 27
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Cebador sintetizado químicamente

<400> 27
 tacgactcac tataggg 17

15 <210> 28
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Cebador sintetizado químicamente

<400> 28
 25 atttagtgta cactatag 18

<210> 29
 <211> 20
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador sintetizado químicamente

35 <400> 29
 attaacctc actaaagga 20

<210> 30
 <211> 23
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador sintetizado químicamente

ES 2 384 736 T3

<400> 30
ctttatgttt ttggcgtctt cca 23

5 <210> 31
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Cebador sintetizado químicamente

<400> 31
ctagcaaaat aggctgtccc c 21

15 <210> 32
<211> 93
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Sitio de clonado multiple, incluido en el vector pADPSY, sintetizado químicamente

<400> 32

25 ggtaccggag gcctcgctag ccacgcgtgg cggcagatct tgcagatatc cgcggatcga 60
tccgccagta cgtaacttcc ttaggcagtc gac 93

30 <210> 33
<211> 7303
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Sintetizado químicamente

<400> 33

40 ttctcatgtt tgacagctta tcatcatcaa taatatacct tattttggat tgaagccaat 60
atgataatga gggggtggag tttgtgacgt ggcgcggggc gtggaacgg ggcgggtgac 120
gtagtagtgt ggcggaagtg tgatgttga agtgtggcgg aacacatgta agcgacggat 180

ES 2 384 736 T3

gtggcaaaag tgacgtttt ggtgtgcgcc ggtgtacaca ggaagtgaca atttcgcgc 240
ggttttaggc ggatgttga gtaaatttg gcgtaaccga gtaagattg gccatttcg 300
5 cgggaaaact gaataagagg aagtgaaatc tgaataatt tgtttactc atagcgcgta 360
atattgtct agggccgcgg ggacttgac cgttacgtg gagactcgc caggtgttt 420
tctcaggtg ttccgcgtt ccgggtcaaa gttgvcgtt tattattata gtcaggggga 480
10 tctctagaa ctagtctag agctcgtga tcagcctcga ctgtccttc tagttgccag 540
ccatctgtt tttcccctc ccccgctct tcctgacct tgaaggtgc cactcccact 600
15 gtctttct aataaaatga ggaaattgca tcgattgtc tgagtaggtg tcattctatt 660
ctggggggtg ggtggggca ggacagcaag ggggaggatt ggaagacaa tagcagcat 720
gctggggatg gtaccggagg cctcgtagc cacgcgtggc ggcagatctc cgggactgaa 780
20 aatgagacat attatctgc acggaggtg tattaccgaa gaaatggccg ccagtcttt 840
ggaccagctg atcgaagagg tactggctga taatctcca cctcctagcc atttgaacc 900
25 acctaccct cacgaactg atgattaga cgtgacggcc cccgaagatc ccaacgagga 960
ggcggttcg cagatttcc cggactctg aatgtggcg gtgcaggaag ggattgactt 1020
actcacttt ccgccggcgc ccggtctcc ggagccgcct caccttccc ggcagcccga 1080
30 gcagccggag cagagagcct tgggtccgt ttctatcca aacctgtac cggaggtgat 1140
cgatcttacc tgccacgagg ctggcttcc acccagtgc gacgaggatg aagagggtga 1200
35 ggagtttg ttagattatg tggagcacc cgggcacggt tgcaggtctt gtcattatca 1260
ccggaggaat acgggggacc cagatattat gtgttcgctt tgctatatga ggacctgtg 1320
catgttgc tacagtaagt gaaaattatg ggcagtggg gatagagtgg tgggttgg 1380
40 gtgtaattt tttttaat ttttacagt ttgtggtta aagaatttg tattgtatt 1440
ttttaaaag gtcctgtgc tgaacctgag cctgagccc agccagaacc ggagcctgca 1500
45 agacctacc gccgtctaa aatggcctc gctatcctga gacgcccgc atcacctgtg 1560

ES 2 384 736 T3

tctagagaat gcaatagtag tacggatagc tgtgactccg gtccttctaa cacacctct 1620
gagatacacc cgggtgtccc gctgtgcccc attaaaccag ttgccgtgag agttggtggg 1680
5 cgtgccagg ctgtggaatg tatcgaggac ttgcttaacg agcctgggca accttggac 1740
ttgagctgta aacgccccag gccataaggt gtaaacctgt gattgcgtgt gtggttaacg 1800
10 cctttgttg ctgaatgagt tgatgtaagt ttaataaagg gtgagataat gtttgatct 1860
tgcagatc cgcggatcga tccgccagta cgtacttcc ttaggcagtc gacctcgaga 1920
tccagacatg ataagataca ttgatgagt ttgacaaacc acaactagaa tgcagtgaaa 1980
15 aaaatgcttt atttgtgaaa tttgatgac tattgctta tttgtaacca ttataagctg 2040
caataaacia gttggggatc tcgagggggg gcccatcga ttctgcagc ccgggggatc 2100
20 tgaagggtgc tgaggtagc tgagaccgc accagggtgca gaccctgca gtgtggcggt 2160
aaacatatta ggaaccagcc tgtgatgctg gatgtgaccg aggagctgag gccgatcac 2220
ttgtgctgg cctgcacccg cgctgagttt ggctctagcg atgaagatac agattgaggt 2280
25 actgaaatgt gtggcggtg cttaagggtg ggaaagaata tataagggtg ggttctatg 2340
tagtttga tctgtttgc agcagccgcc gccgcatga gcaccaactc gtttgatgga 2400
30 agcattgta gctcatatt gacaacgagc atgccccat gggccgggt gcgtcagaat 2460
gtgatgggct ccagcattga tggcgcccc gtctgcccc caaactctac tacctgacc 2520
tacgagaccg tgtctggaac gccgttgag actgcagcct ccgcccgc ttcagccgct 2580
35 gcagccaccg ccccgggat tgtgactgac tttgcttcc tgagcccgt tgcaagcagt 2640
gcagctccc gttcatccc ccgcatgac aagttgacgg ctctttggc acaattgat 2700
40 tcttgacc ggaactaa tgcgttct cagcagctgt tggatctgc ccagcaggt 2760
tctgccga aggctctc ccctccaat gcggttaaa acataaataa aaaaccagac 2820
tctgttga tttgatcaa gcaagtgtct tgctgtctt atttaggggt tttcgcgcg 2880

ES 2 384 736 T3

cggtaggccc gggaccagcg gtctcggtcg ttgaggggcc tgtgtatfff ttccaggacg 2940
tggtaaaggt gactctggat gttcagatac atgggcataa gcccgtctct ggggtggagg 3000
5 tagcaccact gcagagcttc atgctgctgg gtgggtgtgt agatgatcca gtcgtagcag 3060
gagcgctggg cgtgggtcct aaaaatgtct ttcagtagca agctgattgc caggggcagg 3120
cccttggtgt aagtgtttac aaagcggta agctgggatg ggtgcatacg tggggatatg 3180
10 agatgcatct tggactgtat ttttaggttg gctatgttcc cagccatac cctccgggga 3240
ttcatgtgt gcagaaccac cagcacagtg tatccggtgc actgggaaa tttgcatgt 3300
15 agcttagaag gaaatcggtg gaagaactg gagacgccct tgtgacctcc aagattttcc 3360
atgcattcgt ccataatgat ggcaatgggc ccacgggcgg cggcctgggc gaagatattt 3420
ctgggatcac taacgtcata gttgtgttcc aggatgagat cgtcataggc catttttaca 3480
20 aagcgcgggc ggaggggtcc agactgctgt ataatggtc catccggccc aggggcgtag 3540
ttaccctcac agatttgcac ttcccagct ttgagttcag atggggggat catgtctacc 3600
25 tgcggggcga tgaagaaaac ggtttccggg gtaggggaga tcagctggga agaaagcagg 3660
ttctgagca gctgcgactt accgcagccg gtgggcccgt aaatcacacc tattaccggg 3720
tgcaactggt agttaagaga gctgcagctg ccgcatccc tgagcagggg ggccacttcg 3780
30 ttaagcatgt cctgactcg catgttttcc ctgaccaa atccgagaag gcgctgcg 3840
cccagcgata gcagttctg caaggaagca aagttttca acggttgag accgtccgcc 3900
35 gtaggcatgc tttgagcgt ttgaccaagc agttccaggc ggtcccacag ctggtcacc 3960
tgtctacgg catctcgatc cagcatact cctcgtttcg cgggtgggg cggcttccg 4020
tgtacggcag tagtcgggtc tctccagac gggccagggt catgtcttc cacgggcgca 4080
40 gggctcctgt cagcgtatgc tgggtcacgg tgaaggggtg cgctccgggc tgcgctg 4140
ccagggctgc cttgaggctg gtctgctgg tgctgaagcg ctgccgtct tcgccctgcg 4200
45 cgtcggccag gtagcattg accatggtgt catagtcag cccctccgcg gcgtggccct 4260

ES 2 384 736 T3

tggcgcgcag cttgcccttg gaggaggcgc cgcacgaggg gcagtcgaga cttttgaggg 4320
cgtagagctt gggcgcgaga aataccgatt ccggggagta ggcatccgcg ccgcaggccc 4380
5 cgcagacggt ctgcattcc acgagccagg tgagctctgg ccgttcgggg tcaaaaacca 4440
ggtttcccc atgcttttg atgcgtttct tacctctggt ttccatgagc cgggtgccac 4500
10 gctcggtagc gaaaaggctg tccgtgtccc cgtatacaga cttgagaggg ctgtcctcga 4560
gcggtgttcc gcggtcctcc tcgtatagaa actcggacca ctctgagaca aaggctcgcg 4620
tccaggccag cacgaaggag gctaagtggg aggggtagcg gtcgtgtcc actagggggg 4680
15 ccaactcgtc cagggtgta agacacatgt cgccctctc ggcatcaagg aagggtattg 4740
gttgtaggt gtaggccacg tgaccgggtg ttctgaagg ggggctataa aagggggtgg 4800
20 gggcgcgttc gtcctcactc tctccgcat cgctgtctgc gagggccagc tgttggggtg 4860
agtactccct ctgaaaagcg ggcatgactt ctgcgctaag attgtcagtt tcaaaaaacg 4920
aggaggattt gatattcacc tggcccgcgg tgatgccttt gagggtgccc gcatccatct 4980
25 ggtcagaaaa gacaatctt ttgtgtcaa gcttggtggc aaacgacccg tagagggcgt 5040
tggacagcaa cttggcgatg gagcgcaggg tttggtttt gtcgcatcg gcgcgctcct 5100
30 tggccgcgat gtttagctgc acgtattcg gcgcaacgca ccgccattcg ggaaagacgg 5160
tggtgcgctc gtcgggcacc aggtgcacgc gccaaccgcg gttgtgcagg gtgacaaggt 5220
caacgctggt ggctacctt ccgctagggc gctcgttggc ccagcagagg ccggccgacg 5280
35 cgctgggcta cgtcttgctg gcgttcgga cgcgaggctg gatggccttc cccattatga 5340
ttctctcgc ttccggcggc atcgggatgc ccgctgtgca ggccatgctg tccaggcagg 5400
40 tagatgacga ccatcagggg cagcaaaggc cagcaaaagg ccaggaaccg taaaaaggcc 5460
gcgttgctgg cgttttcca taggctcgc ccccctgacg agcatcaca aaatcgacgc 5520
tcaagtacga ggtggcgaaa cccgacagga ctataaagat accaggcgtt tccccctgga 5580

ES 2 384 736 T3

agctccctcg tgcgctctcc tgttccgacc ctgccgctta cggatacct gtccgccttt 5640
ctcccttcgg gaagcgtggc gctttctcat agctcacgct gtaggtatct cagttcggtg 5700
5 taggtcgttc gtcceaagct gggctgtgtg cacgaacccc ccgttcagcc cgaccgctgc 5760
gccttatccg gtaactatcg tcttgagtcc aacccggtaa gacacgactt atgccactg 5820
gcagcagcca ctggaacag gattagcaga gcgaggtatg taggcgggtc tacagagttc 5880
10 ttgaagtggg ggcctaacta cggctacact agaaggacag tatttggat ctgcgctctg 5940
ctgaagccag ttaccttcgg aaaaagagtt gtagctctt gatccggcaa acaaaccacc 6000
15 gctggtagcg gtggttttt tgttgcaag cagcagatta cgcgcagaaa aaaaggatct 6060
caagaagatc cttgatctt tctacgggg tctgacgctc agtgaacga aaactcacgt 6120
taagggattt tggcatgag attatcaaaa aggatctca cctagatcct tttaaattaa 6180
20 aaatgaagtt taaatcaat ctaaagtata tatgagtaaa ctgtgtctga cagttaccaa 6240
tgcttaatca gtgaggcacc tatctcagcg atctgtctat ttcgttcac catagttgcc 6300
25 tgactccccg tcgttagat aactacgata cgggagggt taccatctgg cccagtgct 6360
gcaatgatac cgcgagacc acgtcaccg gctccagatt tatcagcaat aaaccagcca 6420
gccggaaggg ccgagcgcag aagtgtctct gcaactttat ccgcctccat ccagtctatt 6480
30 aattgttgc ggaagctag agtaagtagt tcgccagta atagtttgcg caacgttgtt 6540
gccattgctg caggcatcgt ggtgtcacgc tcgtcgttg gtatggcttc atcagctcc 6600
35 ggttccaac gatcaaggcg agttacatga tccccatgt tgtcaaaaa agcggtagc 6660
tcctcggtc ctccgatcgt tgcagaagt aagtggccg cagtggtatc actcatggtt 6720
atggcagcac tgcataattc tctactgtc atgcatccg taagatgctt ttctgtgact 6780
40 ggtgagtact caaccaagtc attctgagaa tagttagtgc ggcgaccgag ttgctcttgc 6840
ccggcgtcaa cacgggataa taccgcgcca catagcagaa cttaaaagt gctcatcatt 6900
45 gggaaaacgt tctcggggc gaaaactctc aaggatctta ccgctgttga gatccagttc 6960

ES 2 384 736 T3

gatgtaacc actcgtgcac ccaactgac ttcagcatct ttactttca ccagcgtttc 7020

5 tgggtgagca aaaacaggaa ggcaaatgc cgcaaaaag ggaataaggg cgacacggaa 7080

atggtgaata ctactactct tccttttca atattattga agcattatc agggttattg 7140

tctcatgagc ggatacatat tgaatgat ttagaaaaat aaacaaatag gggttccgcg 7200

10 cacattccc cgaaaagtgc cacctgacgt ctaagaaacc attattatca tgacattaac 7260

ctataaaaat aggcgtatca cgaggccctt tcgtcttcaa gaa 7303

<210> 34

15 <211> 28

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Cebador sintetizado químicamente

<400> 34

ccactagtgc tagagctcgc tgatcagc 28

25 <210> 35

<211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> Cebador sintetizado químicamente

<400> 35

35 cgtaccatc cccagcatgc ctgc 24

<210> 36

<211> 1020

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

40 <220>

<223> Secuencia obtenida con el cebador T3

<220>

45 <221> misc_feature

ES 2 384 736 T3

<222> (1009)..(1009)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
5 <221> misc_feature
<222> (1013)..(1013)
<223> n is a, c, g, or t

<400> 36

10 gaatgccctt gatcactatc cggatgaattg aattagcggc cgcaattcg cccttcgaga 60
tctccggact gaaaatgaga catattattt gccacggagg tgttattacc gaagaaatgg 120

15 ccgccagtct ttggaccag ctgatcgaag aggtactggc tgataatctt ccacctccta 180
gccatttga accacctacc cttcacgaac tgtatgattt agacgtgacg gccccgaag 240

20 atcccaacga ggaggcgggt tcgcagattt ttcccgactc tgtaatgttg gcagtgcagg 300
aagggattga ctactcact ttccgccgg cgcccgggtc tccggagccg cctcaccttt 360

cccggcagcc cgagcagccg gagcagagag ccttgggtcc gtttctatg ccaaaccttg 420

25 taccggaggt gatcgatctt acctgccacg aggctggctt tccaccagc gacgacgagg 480
atgaagaggg tgaggagttt gtgtagatt atgtggagca ccccggcac ggtgcaggt 540

ctgtcatta tcaccgagg aatacggggg acccagatat tatgtgttcg cttgtctata 600

30 tgaggacctg tggcatgttt gtctacagta agtgaaaatt atgggcagtg ggtgatagag 660
tggtaggttt ggtgtgtaa tttttttt aattttaca gtttgtgtt taaagaatt 720

35 ttgtattgtg attttttaa aggtcctgt gtctgaacct gagcctgagc ccgagccaga 780
accggagcct gcaagaccta cccgccgtcc taaaatggcg cctgtatcc tgagacgccc 840

gacatcacct gtgtctagag aatgcaatag tagtacggat agctgtgact ccggtccttc 900

40 taacacacct cctgagatac acccgggtgt cccgctgtgc ccattaaacc agttgcccgtg 960
agagttggtg ggcgtcgcca ggctgtggaa tgtatcgagg acttgctna cgnctgggc 1020

45 <210> 37

ES 2 384 736 T3

<211> 1029
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Secuencia obtenida con el cebador T7

<220>
<221> misc_feature
10 <222> (15)..(15)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
15 <222> (32)..(32)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
20 <222> (57)..(57)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
25 <222> (75)..(75)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
30 <222> (87)..(87)
<223> n is a, c, g, or t

<400> 37

35 cccatttta tacancatta cgccaagctc anaattaacc ctactaaag ggactanctc 60
ctgcagggtt aaacnaattc gccctncgg atccaaacat tatctcacc ttattaaac 120
ttacatcaac tcattcagca aacaaggcg ttaaccacac acgcaatcac aggtttacac 180
40 cttatggcct gggcggttta cagctcaagt ccaaaggttg cccaggctcg ttaagcaagt 240
cctcgataca ttccacagcc tggcgagcc caccaactct cacggcaact ggtttaatgg 300
45 ggcacagcgg gaccaccggg tgtatctcag gaggtgtgtt agaaggaccg gagtcacagc 360

ES 2 384 736 T3

tatccgtact actattgcat tctctagaca caggtgatgt cgggcgtctc aggatagcag 420

gcccatttt aggacggcgg gtaggtcttg caggctccgg ttctggctcg ggctcaggct 480

5 caggttcaga cacaggacct tttaaaaaaa tcacaatata aaattcttta aaccacaaaa 540

ctgtaaaaat taaaaaaaaa attaccacac caaaccacc actctatcac cactgccca 600

10 taattttcac ttactgtaga caaacatgcc acaggtcctc atatagcaaa gcgaacacat 660

aatatctggg tccccgtat tctccgggtg ataatgacaa gacctgcaac cgtgcccggg 720

gtgctccaca taatctaaca caaactcctc accctctca tctctgctgt cactgggtgg 780

15 aaagccagcc tcgtggcagg taagatcgat cacctccggt acaaggttg gcatagaaac 840

cggaccaag gctctctgct ccggctgctc gggctgccgg gaaaggtgag gcggctccgg 900

20 agaaccgggc gccggcggaa aagtgagtaa gtcaatccct tcctgcactg ccaacattac 960

agagtcggga aaaatctgcg aaaccgcctc ctcgtggga tctgggggc cgtcacgtct 1020

aatcataca 1029

25

<210> 38
<211> 1562
<212> ADN

30 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintetizado químicamente

35 <400> 38

tctcagggtt ttccgcgtt ccgggtcaaa gttggcgttt tattattata gtcaggggga 60

tcctctagaa ctagtctag agctcgtga tcagcctga ctgtgcctc tagttgccag 120

40 ccatctgttg ttgcccctc ccccgctcct tcctgacct tggaaggtgc cactcccact 180

gtccttctc aataaaatga ggaaattgca tcgcattgc tgagtaggtg tcattctatt 240

45 ctgggggggtg gggggggca ggacagcaag ggggaggatt gggagacaa tagcaggcat 300

ES 2 384 736 T3

gctggggatg gtaccggagg cctcgctagc cacgcgtggc ggcagatctc cgggactgaa 360
aatgagacat attatctgcc acggaggtgt tattaccgaa gaaatggccg ccagctcttt 420
5 ggaccagctg atcgaagagg tactggctga taatctcca cctcctagcc atttgaacc 480
acctaccctt cacgaactgt atgattaga cgtgacggcc cccgaagatc ccaacgagga 540
10 ggcggttcg cagatcttc ccgactctgt aatgtggcg gtgcaggaag ggattgactt 600
actcactttt ccgccggcgc ccggttctcc ggagccgcct caccttccc ggcagcccga 660
gcagccggag cagagagcct tgggtccggt ttctatgcca aacctgtac cggaggtgat 720
15 cgatcttacc tgccacgagg ctggcttcc acccagtgc gacgaggatg aagagggta 780
ggagttgtg ttagattatg tggagcacc cgggcacggt tgcaggtctt gtcattatca 840
20 ccggaggaat acgggggacc cagatattat gtgttcgctt tgctatatga ggacctgtgg 900
catgtttgc tacagtaagt gaaaattatg ggcagtgggt gatagagtgg tgggtttggt 960
gtggaattt ttttttaat ttttacagtt ttgtggtta aagaatttg tattgtgatt 1020
25 tttttaaag gtcctgtgc tgaacctgag cctgagccc agccagaacc ggagcctgca 1080
agacctacc gccgtcctaa aatggcgctt gctatcctga gacgcccgc atcacctgtg 1140
30 tctagagaat gcaatagtag tacggatagc tgtgactccg gtccttctaa cacacctct 1200
gagatacacc cgggtgtccc gctgtgcccc attaaaccag ttgccgtgag agttggtggg 1260
cgtgccagg ctgtggaatg tatcgaggac ttgcttaacg agcctgggca accttgac 1320
35 ttgagctgta aacgcccag gccataaggt gtaaacctgt gattgcgtgt gtggttaacg 1380
ccttgttg ctgaatgagt tgatgtaagt ttaataaagg gtgagataat gtttgatct 1440
40 tgcagatctc cgcggatcga tccgccagta cgtacttcc ttaggcagtc gacctcgaga 1500
tccagacatg ataagataca ttgatgagtt tggacaaacc acaactagaa tgcagtgaaa 1560
aa 1562

ES 2 384 736 T3

<210> 39
<211> 1335
<212> ADN
5 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintetizado químicamente

10 <400> 39

tctcagggtg ttccgcggtt ccgggtcaaa gttggcggtt tattattata gtcaggggga 60

tctctagaa ctagtgtgat caggtaccgg aggctcgcct agccacgcgt ggcggcagat 120

15 ctccgggact gaaaatgaga catattatct gccacggagg tgttattacc gaagaaatgg 180

ccgccagtct ttggaccag ctgatcgaag aggtactggc tgataatctt ccacctccta 240

20 gccatttga accacctacc cttcacgaac tgtatgattt agacgtgacg gccccgaag 300

atccaacga ggaggcggtt tgcagattt ttccgactc tgtaatgtg gcggtgcagg 360

aagggatga ctactcact ttccgccgg cgcccggttc tccggagccg cctcaccttt 420

25 cccggcagcc cgagcagccg gagcagagag ccttgggtcc ggttctatg ccaaacctg 480

taccggaggt gatcgtatct acctgccacg aggcctggct tccacctcagt gacgacgagg 540

30 atgaagaggg tgaggagttt gtgtagatt atgtggagca ccccgggcac ggtgcaggt 600

ctgtcatta tcaccggagg aatacggggg accagatat tatgtgttcg cttgctata 660

tgaggacctg tggcatgttt gtctacagta agtgaaaatt atgggcagtg ggtgatagag 720

35 tggtggttt ggtgtggtaa tttttttt aatttttaca gtttgtgtt taaagaatt 780

ttgtattgtg attttttaa aaggctctgt gtctgaacct gagcctgacg ccgagccaga 840

40 accggagcct gcaagaccta cccgccgtcc taaaatggcg cctgctatcc tgagacgccc 900

gacatcacct gtgtctagag aatgcaatag tagtacggat agctgtgact ccggtcctc 960

taacacacct cctgagatac acccgggtgt cccgctgtgc cccattaaac cagttgccgt 1020

ES 2 384 736 T3

gagagttggt gggcgtgcc aggctgtgga atgtatcgag gacttgctta acgagcctgg 1080

gcaaccttgg gacttgagct gtaaacgccc caggccataa ggtgtaaacc tggattgcg 1140

5 tgtgtggtta acgccttgt ttgctgaatg agttgatgta agttaataa agggtgagat 1200

aatgtttgga tcttgagat atccgaggat cgatccgcca gtacgtactt tccttaggca 1260

10 gtcgacctcg agatccagac atgataagat acattgatga gtttgacaa accacaacta 1320

gaatgcagtg aaaaa 1335

<210> 40

15 <211> 776

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Sintetizado químicamente

<220>

<221> misc_feature

25 <222> (5)..(5)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc_feature

30 <222> (39)..(39)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc_feature

35 <222> (128)..(128)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc_feature

40 <222> (684)..(684)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc_feature

45 <222> (721)..(721)

ES 2 384 736 T3

<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
5 <222> (727)..(727)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
10 <222> (734)..(734)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
15 <222> (738)..(739)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
20 <222> (752)..(752)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
25 <222> (755)..(755)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
30 <222> (758)..(758)
<223> n is a, c, g, or t

<400> 40

35 ccctnggact gaagctggcg tttcaatta tagtcaggng gatcctctag aactagtgt 60

agagctcgct gatcagcctc gactgtgcct tctagttgcc agccatctgt tgttgcccc 120

tccccngtg ccttcttga ccctggaagg tgccactccc actgtccttt cctaataaaa 180

40 tgaggaaatt gcatcgcatl gtctgggtag gtgtcattct attctggggg gtggggtggg 240

gcaggacagc aagggggagg attggaaga caatagcagg catgctgggg atggtaccgg 300

45 aggctcgcct agccacgcgt gcagctgtc ttgtctgtac agtggttaagt cctggccttg 360

ES 2 384 736 T3

ccttgtggc aaatacaacc ccctgaatt gcttggcct tctcagcatt gcctaatt 420

aggaggact cctgtaaagc tcaactggta gaagatcaag acacttgggc ctggttctgc 480

5 ccctgggggt cattgggtaa ttcttgcag tctccaggcc tcaactgccc tctgaacaag 540

aaagaggctg ttctgggtca tccctccagg cctgtccagc cctggcactc tgtgagtcgg 600

10 ttaggcagc agccccgaa cagatgaggc aggcagggtt gggacgttg gtcaggacag 660

cccaccgaa aaagaggagg aaanaaatga aagacagaga cagcttggc tatgggagaa 720

15 ngaggangcc gggngaanng atgacacagg angangang accaccgggt ggaggg 776

<210> 41

<211> 507

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Secuencia obtenida con el cebador pAd-sense

<220>

25 <221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

30 <221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

35 <221> misc_feature

<222> (26)..(26)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

40 <221> misc_feature

<222> (498)..(498)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 41

ES 2 384 736 T3

cncccgntg aagctggcgt ttatnttat agtcaggggg atcctctaga actagtgatc 60
aggfaccgga ggcctcgcta gccacgcgtg cagcttggtc ttggtctgta cagtggaag 120
5 tctggcctt gcctttgtg caaatacaac ccccttgaat tgcttggccc ttctcagcat 180
tgccaatat tagggaggac tctgtaaag ctactggtt agaagatcaa gacactggg 240
cctgttctg ccctggggg tcattggga attccttga gtctccaggc ctactggc 300
10 ctctgaacaa gaaagaggct gttctgggc atccctccag gcctgtccag ccctggcact 360
ctgtgagtcg gtttaggcag cagccccga acagatgagg caggcagggt tgggacgtt 420
15 ggtcaggaca gccaccgca aaaagaggag gaaagaaatg aaagacagag acagcttgg 480
ctatgggaga aggaggangg ccggggg 507
<210> 42
20 <211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
25 <223> Cebador sintetizado químicamente
<400> 42
tgttttctc aggtgttttc cg 22
30 <210> 43
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
35 <220>
<223> Cebador sintetizado químicamente
<400> 43
40 gcccatggct tcgtaccccg gcc 23
<210> 44
<211> 29
<212> ADN
45 <213> Secuencia artificial

ES 2 384 736 T3

<220>

<223> Cebador sintetizado químicamente

5 <400> 44

gcgctgactc agttagcctc ccccatctc 29

<210> 45

10 <211> 957

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Secuencia obtenida con el cebador T3

<400> 45

20 gcatctgctg gggtttcggg gcgaagttac gattcgccct tgcgtcgact cagttagcct 60

ccccatctc ccgggcaaac gtgcgcgcca ggtcgcagat cgtcggatg gagccggggg 120

tgttgactg ggtctggacc atcccggagg taagttgcag cagggcgtcc cggcagccgg 180

25 cgggcgattg gtcgtaatcc aggataaaga cgtgcatggg acggaggcgt ttggccaaga 240

cgccaaggc ccaggcaaac acgtgtaca ggtcgccgtt gggggccagc aactcggggg 300

30 cccgaaacag ggtaaataac gtgtccccga tatggggtcg tgggcccgcg ttgctctggg 360

gctcggcacc ctggggcggc acggccgtcc ccgaaagctg tccccaatcc tcccgccacg 420

accgcccgc ctgcagatac cgcaccgtat tggcaagcag cccgtaaacg cggcgaatcg 480

35 cggccagcat agccaggta agccgctcgc cggggcgtg gcgtttggcc aggcggtcga 540

tgtgtctgtc ctccggaagg gcccccaaca cgatgtttgt gccgggcaag gtcggcggga 600

40 tgagggccac gaacgccagc acggcctggg gggcatgct gcccataagg tatcgcgagg 660

ccgggtagca caggagggcg gcgatgggat ggcggtcga gatgagggg agggccgggg 720

gcggggcatg tgagctcca gcctcccc cgatatgagg agccagaacg gcgtcggta 780

45 cggcataaag gcatgccc atgttatctgg gcgcttgta ttaccaccg cgctccccg 840

ES 2 384 736 T3

ggccgatatc tcaccctggt cgaggcgggt ttgtgtgggt gtagatgttc gcgattggtc 900

5 tcgcagcccc caagcaactg cagtaaagtc aatcgggcct cggggaacc gtttagg 957

<210> 46
<211> 238
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Secuencia obtenida con el cebador pAd-sense

<400> 46

15 ccggcttac gctggcgttt tattattata gtcaggggga tcctctagaa ctagtctag 60

agctcgctga tcagcctga ctgtccttc tagttgccag ccatctgtg ttgccctc 120

20 ccccgctcct tcctgacct tgaagggtgc cactcccact gtccttctc aataaaatga 180

ggaaattgca tcgcattgc tggtaggtg tcattctatt ctggggggtg ggggtggg 238

<210> 47
<211> 965
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia obtenida con el cebador pAd-antisense

<400> 47

35 acggtgtgt taggttctca ttctgtgtg gttgtcca actcatcaat gtatctatc 60

atgtctggat ctgaggtcg actcagttag cctccccat ctccgggca aacgtgcg 120

ccaggtcga gatcgctggt atggagccgg ggggtgtgac gtgggtctgg accatccgg 180

40 aggtaagtg cagcagggcg tcccgccagc cggcgggca ttgtcgtaa tccaggataa 240

agacgtgat gggacggagg cgtttgcca agacgtcaa ggcccaggca aacacgtgt 300

acaggtgcc gttgggggcc agcaactcg gggcccgaag cagggtaaat aacgtgtccc 360

ES 2 384 736 T3

cgatatgggg tcgtgggccc gcgtgtctct ggggctcggc accctggggc ggcacggccg 420
tccccgaaag ctgtcccaaa tcctcccccc acgacccgcc gccctgcaga taccgcaccg 480
5 tattggcaag cagcccgtaa acgcggcgaa tcgcggccag catagccagg tcaagccgct 540
cgccggggcg ctggcgtttg gccagggcgt cgatgtgtct gtcctccgga agggccccc 600
acacgatgtt tgtccgggc aaggtcggcg ggatgagggc cacgaacgcc agcacggcct 660
10 ggggggtcat gctgccata aggtatcgcg cggccgggta gcacaggagg gcggcgatgg 720
gatggcggtc gaagatggag ggtgagggcc ggggggcggg gcatgtgagc tccagcctc 780
15 cccccgata tgaggagcca gaacggcgtc ggtcacggca taaggcatgc ccattgttat 840
ctgggcgctt gtcattacca ccgcccgcgt ccccgccga tatctcaacc ctgatcgagg 900
cggatgatg gtgggtgtgt agaattgtt cgacgaattt gtctctcgcg aaagaggccc 960
20 cccca 965
<210> 48
<211> 25
25 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador sintetizado químicamente
30 <400> 48
cacaatttc acaataaag cattt 25
<210> 49
35 <211> 911
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
40 <223> Secuencia obtenida con el cebador pAd-sense, secuencia parcial del virus
<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(5)
45 <223> n is a, c, g, or t

ES 2 384 736 T3

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 5 <223> n is a, c, g, or t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (22)..(22)
 10 <223> n is a, c, g, or t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (34)..(34)
 15 <223> n is a, c, g, or t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (751)..(751)
 20 <223> n is a, c, g, or t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (854)..(854)
 25 <223> n is a, c, g, or t

<400> 49

30 catcngcnag cggcgctcta tnattatagt catnggatcc tctagaacta gtgctagagc 60
 tgctgatca gcctcgactg tgccttctag ttgccagcca tctgtgttt gccctcccc 120
 cgtgccttc ttgacctgg aagggtccac tccactgtc cttcctaataaaaatgagga 180
 35 aattgcatcg cattgtctgg gtagggtca ttctattctg gggggtgggg tggggcagga 240
 cagcaagggg gaggattggg aagacaatag caggcatgct ggggatggta cggaggcct 300
 cgctagccac gcgtgcagct tgccttctgt gtacagtgtt aagtctctgg cttgcctttg 360
 40 tggcaaatc aacccccctg aattgctgg cccttctcag cattgcctaa tattaggag 420
 gactcctgta aagctcactg gttagaagat caagacactt gggcctggtt ctgccctgg 480
 45 gggcattgg gtaattcctt gcagtctcca ggctcactt gccctctgaa caagaaagag 540

ES 2 384 736 T3

gctgttctgg gtcacccctc caggcctgtc cagccctggc actctgtgag tcggtttagg 600

5 cagcagcccc ggaacagatg aggcaggcag ggttgggacg ttgtgtcagg acagcccacc 660

gcaaaaagag gaggaagaa atgaaagaca gagacagctt tggctatggg agaaggagga 720

ggccggggga aggaggagac aggaagagga nggaccacgg ggtggaaggg agatagacc 780

10 agcccagagc tctgagtgg tccctgttg cctgtctcta aaccctcca cattcccgg 840

gctctcaga ctgnccggag agcagatctc cggactgaaa atgagacata ttattgcca 900

15 cggaaggtgt t 911

<210> 50

<211> 908

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Secuencia obtenida con el cebador pAd-antisense, secuencia parcial del virus

<220>

25 <221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

30 <221> misc_feature

<222> (18)..(18)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

35 <221> misc_feature

<222> (30)..(31)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 50

40 gcattctagt nctctaangg tccaaactn ntcaatgtat ctatcatgt ctggatctcg 60

aggtcgacca ctgtctggc ggccgcttta ctgtacagc ctcgtccatg ccgagagtga 120

45 tccggcggc ggtcacgaac tccagcagga ccatgtggat cgcgcttctc gttgggtct 180

ES 2 384 736 T3

ttgctcaggg cggactgggt gctcaggtag tggttgctcg gcagcagcac ggggccgctg 240
ccgatggggg tgttctgctg gtagtggtcg gcgagctgca cgctgccgtc ctcgatgttg 300
5 tggcggatct tgaagttcac cttgatgccg ttcttctgct tctcggccat gatatagaag 360
ttgtggctgt ttagttgta ctccagcttg tgccccagga tggtgccgtc ctccttgaag 420
10 tcgatgccct tcagctcgat gcggttcacc aggggtgctg cctcgaactt cacctcggcg 480
cgggtcttgt agttgccgtc gtccttgaag aagatggtgc gctcctggac gtagccttcg 540
ggcatggcgg acttgaagaa gtcgtgctgc ttcatgtggt cggggtagcg gctgaagcac 600
15 tgcacgccgt aggtcagggt ggtcacgagg gtgggccagg gcacgggcag cttgccggtg 660
gtgcagatga acttcagggt cagcttgccg taagtggcat cgccctcgcc ctcgccggac 720
20 acgctgaact tgtggccgtt tacgtcgccg tccagctcga ccaggatggg caccaccccg 780
gtgaacagct cctcgcctt gtcaccatg gttgtggcca tattatcacc gtgttttca 840
aaggaaaacc acgtccccgt ggttcggggg gcctaagacg ttttttaac ctcgactaaa 900
25 acacatgt 908
<210> 51
<211> 842
30 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Secuencia obtenida con el cebador pAd-sense, secuencia parcial del virus
35 <220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(5)
<223> n is a, c, g, or t
40 <220>
<221> misc_feature
<222> (14)..(15)
<223> n is a, c, g, or t

ES 2 384 736 T3

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (19)..(19)
 <223> n is a, c, g, or t
 5
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (24)..(25)
 <223> n is a, c, g, or t
 10
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (37)..(39)
 <223> n is a, c, g, or t
 15
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (61)..(61)
 <223> n is a, c, g, or t
 20
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (159)..(159)
 <223> n is a, c, g, or t
 25
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (795)..(795)
 <223> n is a, c, g, or t
 30
 <400> 51

 tccnngtaat cagnnagcng ctannaaggg tttgcnna gggatcctct agaactagtg 60
 35 ntcaggtagc ggaggcctcg ctgccacgc gtcagcttg tctgtctgt acagtggtaa 120
 gtcctggcct tgcctttgtg gcaaatacaa ccccttgnattgcttggc ccttctcagc 180
 attgcctaattaggaggagg actcctgtaa agctcactgg ttagaagatc aaggacactt 240
 40 gggcctgggt ctgcccctgg gggcattgg gtaattcctt gcagctcca ggcctcactt 300
 gcccttgaa caagaaagag gctgttctgg gtcacccctc caggcctgtc cagccctggc 360
 45 actctgtgga gtcggttag gcagcagccc cggaacaga tgaggcaggc agggttggga 420

ES 2 384 736 T3

cgtttggca ggacagccca ccgcaaaaag aggaggaaag aaatgaaaga cagagacagc 480

5 ttggctatg ggagaaggag gaggccgggg gaaggaggag acaggaggag gagggaccac 540

ggggtggagg ggagatagac ccagcccaga gctctgagtg gtttctgtt gcctgtctt 600

aaaccctcc acattccgc ggtcctcag actgccgga gagcagatct ccgactgaa 660

10 aatgagacat attattgcc acggaggtg tattaccgaa gaaatggccg ccagtcttt 720

ggaccagctg atcgaagagg tactggctga taatctcca cctctagcc atttgaacc 780

15 acctaccct cagcnaactg tatgattag acgtgacggg cccccgaaga tccaacgag 840

ga 842

<210> 52

<211> 851

20 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia obtenida con el cebador pAd-antisense, secuencia parcial del virus

25 <220>

<221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> n is a, c, g, or t

30 <220>

<221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> n is a, c, g, or t

35 <220>

<221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> n is a, c, g, or t

40 <220>

<221> misc_feature

<222> (14)..(14)

<223> n is a, c, g, or t

45 <220>

- <221> misc_feature
 - <222> (19)..(19)
 - <223> n is a, c, g, or t
- 5

 - <220>
 - <221> misc_feature
 - <222> (29)..(29)
 - <223> n is a, c, g, or t
- 10

 - <220>
 - <221> misc_feature
 - <222> (34)..(34)
 - <223> n is a, c, g, or t
- 15

 - <220>
 - <221> misc_feature
 - <222> (42)..(42)
 - <223> n is a, c, g, or t
- 20

 - <220>
 - <221> misc_feature
 - <222> (65)..(65)
 - <223> n is a, c, g, or t
- 25

 - <220>
 - <221> misc_feature
 - <222> (90)..(90)
 - <223> n is a, c, g, or t
- 30

 - <220>
 - <221> misc_feature
 - <222> (103)..(103)
 - <223> n is a, c, g, or t
- 35

 - <220>
 - <221> misc_feature
 - <222> (130)..(130)
 - <223> n is a, c, g, or t
- 40

 - <220>
 - <221> misc_feature
 - <222> (393)..(393)
 - <223> n is a, c, g, or t
- 45

 - <220>

ES 2 384 736 T3

<221> misc_feature
<222> (539)..(539)
<223> n is a, c, g, or t

5 <400> 52

aaaangacgn cngnaagcnc taaggggcna attncaaagg gnatctatc atgtctggat 60

ctcgnaggct cggactgcct aaggtaaagn acgtactggc ggnatcgaat cgcgaggata 120

10 tctgctaagn atccaaacat tatctcacc tttattaaac ttacatcaac tcattcagca 180

aacaaaggcg ttaaccacac acgcaatcac aggctttaca ccttatggcc tggggcggtt 240

15 acagctcaag tccaaagggt gccaggctc gttaagcaag tcctcgatac attccacagc 300

ctggcgacgc ccaccaactc tcacggcaac tggttaatg gggcacagcg ggaccaccgg 360

gtgtatctca ggaggtgtgt tagaaggacc ggnagtcaca gctatccgta ctactattgc 420

20 attctctaga cacaggtgat gtcgggcgct tcaggatagc aggcgccatt ttaggacggc 480

gggtaggtct tgcaggctcc ggttctggct cgggctcagg ctcaggttca gacacaggna 540

25 cccttataaa aaatcacaat acaaaattct taaaccaca aaactgtaa aattaaaaaa 600

aaaattacca caccaaacc accactctat cacccactgc ccataattt cacttactgt 660

agacaaacat gccacaggct ctcatatagc aaagcgaaca cataatatct gggcccccg 720

30 tattctccg ggtgataatg gacaagacct gcaaccgtgg cccggggtgc tccacataaa 780

tctaacacaa actcctcacc ctctcatcc tcgtcgtcac tgggtggaaa gccagccctc 840

35 gtggcaggta a 851

<210> 53
<211> 854
<212> ADN

40 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia obtenida con el cebador pAd-sense, secuencia parcial del virus

45 <400> 53

ES 2 384 736 T3

aaaaagaacc ttttaatgcg cgctcggctg cgttttatta ttatagtcag ggggatcctc 60

5 tagaactagt gctagagctc gctgatcagc ctcgactgtg ccttctagt gccagccatc 120

tggtgttgc cctcccccg tgccttcctt gaccctggaa ggtgccactc cactgtcct 180

ttcctaataa aatgaggaaa tgcacgcga ttgtctgggt aggtgtcatt ctattctggg 240

10 ggggtggggtg gggcaggaca gcaaggggga ggattgggaa gacaatagca ggcattgctgg 300

ggatgttacc ggaggcctcg ctagccacgc gtgcagcttg tctgtctgt acagtggtaa 360

15 gtctggcct tgcctttgtg gcaaatataa ccccctgaa ttgctggcc ctctcagca 420

ttgcctaata ttagggagga ctctgtaaa gctcactggt tagaagatca agacactgg 480

gcctggtct gccctgggg gtcattgggt aattcctgc agtctccagg cctcactgc 540

20 cctctgaaca agaaagaggc tgtctgggt catccctcca gcctgtcca gcctggcac 600

tctgtgagtc ggttaggca gcagccccg aacagatgag gcaggcaggg ttgggacgtt 660

25 tggtcaggac agcccaccgc aaaaagagga ggaaagaaat gaaagacaga gacagcttg 720

gctatgggag aaggaggagg ccgggggaaa ggaggagaca ggaggaggag ggaccacggg 780

gtggaggggg agatagacc agccagagct cctgagtgtt tctgttggc ctgtcttaa 840

30 acccccctcc caca 854

<210> 54
<211> 840
<212> ADN

35 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia obtenida con el cebador pAd-antisense, secuencia parcial del virus

40 <400> 54

ttccatttt taaccttatg tcctgattg ttgattcact ctcatgttct atctgtctgg 60

tctcgaggcg cttaaaaaac tccccatct cccgggcaaa cgtgcgcgcc cctgccgcaa 120

ES 2 384 736 T3

atcgtcgga tggagccggg ggtggtgacg tgggtctgga ccatcccga ggtaagttgc 180

agcagggcgt cccggcagcc ggcgggcat tggctgtaat ccaggataaa gacgtgcatg 240

5 ggacggaggc gtttgccaa gacgtccaag gccagggcaa acacgttgta caggtcgccg 300

ttgggggcca gcaactcggg ggcccgaac agggtaaata acgtgtccc gatatgggt 360

cgtgggcccg cgtgtctg gggctggca cctggggcg gcacggcctg cccgaaagc 420

10 tgtcccaat cctccgcca cgaccgccc cctgcagat accgcaccgt attggcaagc 480

agcccgtaaa cgcggcgaat cgcggccagc atagccaggt caagccgctc gccggggcgc 540

15 tggcgttgg ccaggcggc gatgtgtctg tctccggaa gggcccccac cacgatggtt 600

gtgccgggca aggtcggcgg gatgaggcc acgaacgcca gcacggcctg gggggcatg 660

ctgccataa ggtatcgcgc ggccgggta gcacaggagg gcggcgatgg ggatggcgg 720

20 cgaagatgag ggtgaggcc ggggggggg gcattgtgagc tccagcctc cccccgatt 780

tgaggagcca gaacggcgtc gggcacggc taaggcatgc ccattgtaa tggggccct 840

25 <210> 55
<211> 833
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Secuencia obtenida con el cebador pAd-sense, secuencia parcial del virus

<400> 55

35 cctggcatct tttgaaagt cggatctgt cgcgttatt attatagca gggggatcct 60

ctagaactag tgctagagct cgctgatcag cctcgactgt gccttctagt tgccagccat 120

ctgtgtttg ccctcccc gtgccttct tgaccctgga aggtgccact cccactgtcc 180

40 ttccctaata aatgaggaa attgcatcgc attgtctgg taggtgtcat tctattctgg 240

ggggtgggt ggggcaggac agcaagggg aggattggga agacaatagc aggcattgctg 300

45 gggatgttac cggaggcctc gctagccag cgtgcagctt gtctgtctg tacagtggta 360

ES 2 384 736 T3

agtcctggcc ttgctttgt ggcaaataca accccctga attgcttggc ccttctcagc 420

5 attgcctaatt attagggagg actcctgtaa agctcactgg ttagaagatc aagacacttg 480

ggcctgggtc tgcccctggg ggtcattggg taattccttg cagtcctcag gcctcacttg 540

ccctctgaac aagaaagagg ctgttctggg tcatccctcc aggcctgtcc agccctggca 600

10 ctctgtgagt cggtttaggc agcagccccg gaacagatga ggcaggcagg gttgggacgt 660

ttgtcagga cagcccaccg caaaaagagg aggaaagaaa tgaagacag agacagcttt 720

15 ggctatggga gaaggaggag gccgggggaa ggaggagaca ggaggaggag ggaccacggg 780

gtggagggga gatagacca gccagagct ctgagtgtt tctgtttgc ctg 833

<210> 56

20 <211> 816

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Secuencia obtenida con el cebador pAd-antisense, secuencia parcial del virus

<400> 56

30 cctcatcccc taacgatcc gcctctgaat gtgatgtcca actcatcatg tatcttatca 60

tgtctggatc tcgcggtctc ccctgtgct ggcggccgct ttactgtac agctctcca 120

tgttgagag tgatcccgcg ggcggtcacg aactccagca ggaccatgtg atcgcgcttc 180

35 tcgtgggggt cttgctcag ggcggactgg gtgctcaggt agtggttgtc gggcagcagc 240

acggggccgt cgccgatggg ggtgttctgc tggtagtggg cggcgagctg cacgctgccg 300

40 tctcgaagt gtggcggat ctgaagttc acctgatgc cgttctctg cttgtcggcc 360

atgatataga cgtgtggct gttgtagtt tactccagct tctgcccag gatgtgccg 420

tctcctga agtcgatcc cttcagctcg atgcggttca ccagggtgtc gccctcgaac 480

45 ttacacctcg cgcggtctt gtagtggcg tctcctga agaagatggg gcgctcctgg 540

ES 2 384 736 T3

acgtagcctt cgggcatggc ggacttgaag aagtcgtgct gcttcatgtg gtcgggtag 600
cggtgaagc actgcagcc gtaggtcagg gtggtcacga ggggggcca gggcacggc 660
5 agctgccgg tggtcagat gaactcagg gtcagcttcg cgtaggtggc atgccctcg 720
ccctgccgg acacgctgaa ctgtggccg ttacgtcgc cgtccagctc gacagggatg 780
10 ggcaccacc cgggaacag ctctgccc ttgctc 816

REIVINDICACIONES

1. Un ADN aislado que comprende un promotor de ácido nucleico que tiene una secuencia que consiste en la SEQ ID NO 1.
- 5 2. El ADN aislado de la reivindicación 1, en donde la secuencia promotora está operablemente ligada a un gen heterólogo.
3. El ADN aislado de la reivindicación 1, que además comprende un segundo promotor de ácido nucleico.
4. El ADN aislado de la reivindicación 3, que además comprende una secuencia reguladora seleccionada de una secuencia de respuesta a radiación, una secuencia de respuesta a hipoxia o una secuencia de respuesta a radicales libres.
- 10 5. El ADN aislado de la reivindicación 2, en donde el gen heterólogo es un gen terapéutico.
6. El ADN aislado de la reivindicación 2, en donde el gen heterólogo está seleccionado a partir del grupo que consiste de: un gen de E1A, un gen suicida, la región E3 del genoma adenoviral y un gen que codifica una interleuquina.
- 15 7. Un vector de expresión que comprende el ADN aislado de la reivindicación 1 y un gen heterólogo operablemente ligado al mismo.
8. El vector de expresión de la reivindicación 7, en donde el vector es un plásmido o un vector viral.
9. El vector de expresión de la reivindicación 8, en donde el vector viral es un adenovirus recombinante.
- 20 10. El vector de expresión de la reivindicación 8, en donde el vector viral es un Adenovirus Oncolítico de Replicación Condicionada.
11. El vector de expresión de la reivindicación 7, en donde el gen heterólogo es un gen terapéutico.
12. El vector de expresión de la reivindicación 11, en donde el gen heterólogo es un gen de la proteína E1A.
13. El vector de expresión de la reivindicación 7, en donde el gen heterólogo es un gen suicida.
- 25 14. El vector de expresión de la reivindicación 13, en donde el gen suicida es el gen de timidina quinasa de un virus de herpes (hsvTK).
15. El vector de expresión de la reivindicación 7, que además comprende una región E3 del genoma adenoviral.
16. Un método ex-vivo para expresar ADN foráneo en una célula huésped, comprendiendo el método introducir dentro de la célula huésped el vector de expresión de la reivindicación 7.
- 30 17. Una composición farmacéutica que comprende el vector de expresión de la reivindicación 7 en un portador farmacéuticamente adecuado.
18. El uso de una composición farmacéutica de la reivindicación 17 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un tumor en un paciente que sufre del mismo.
- 35 19. Un vector de expresión que comprende un promotor de ácido nucleico que tiene una secuencia que consiste en la SEQ ID NO 1 de acuerdo a la reivindicación 1.

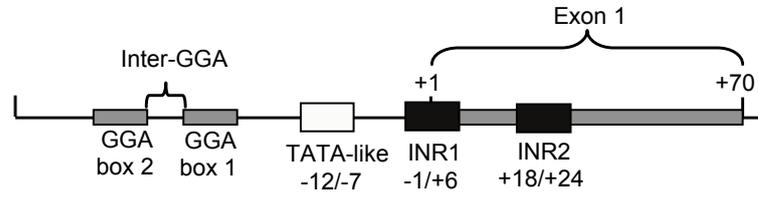


FIG. 1

Expresión relativa de ARNm de SPARC

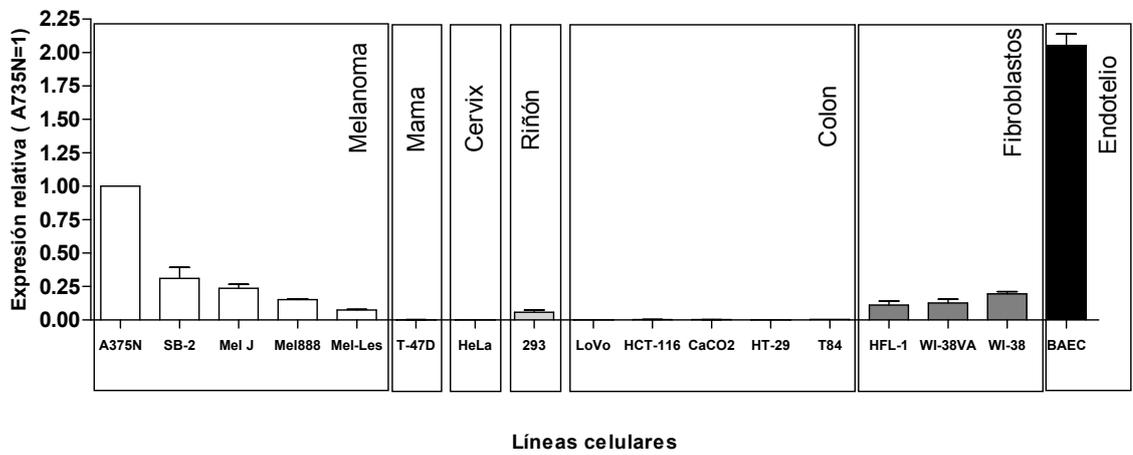


FIG. 2

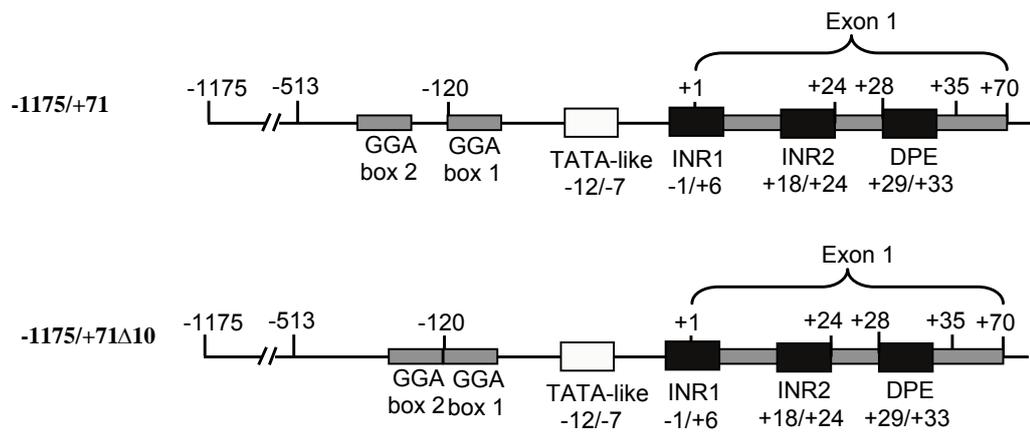


FIG. 3

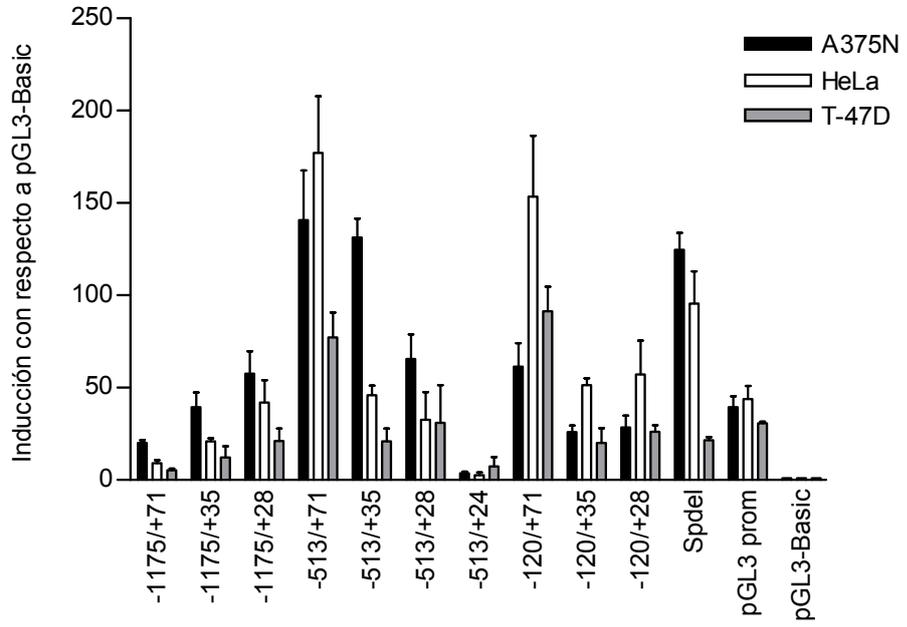


FIG. 4 A

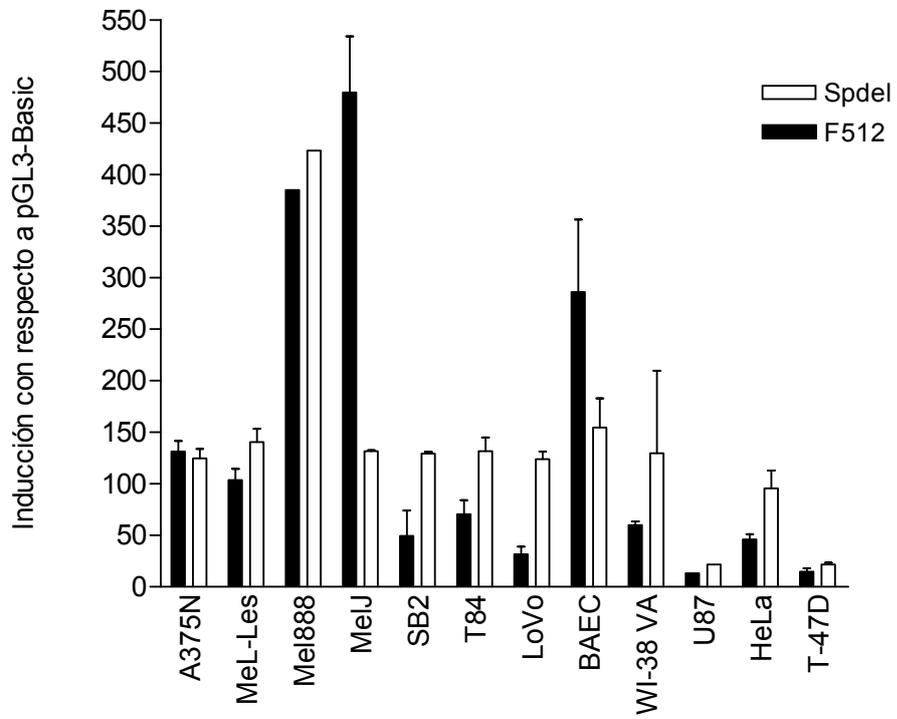


FIG. 4 B

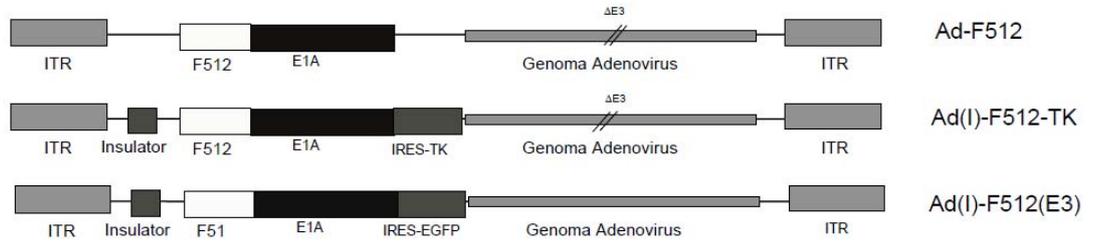


FIG. 5 A

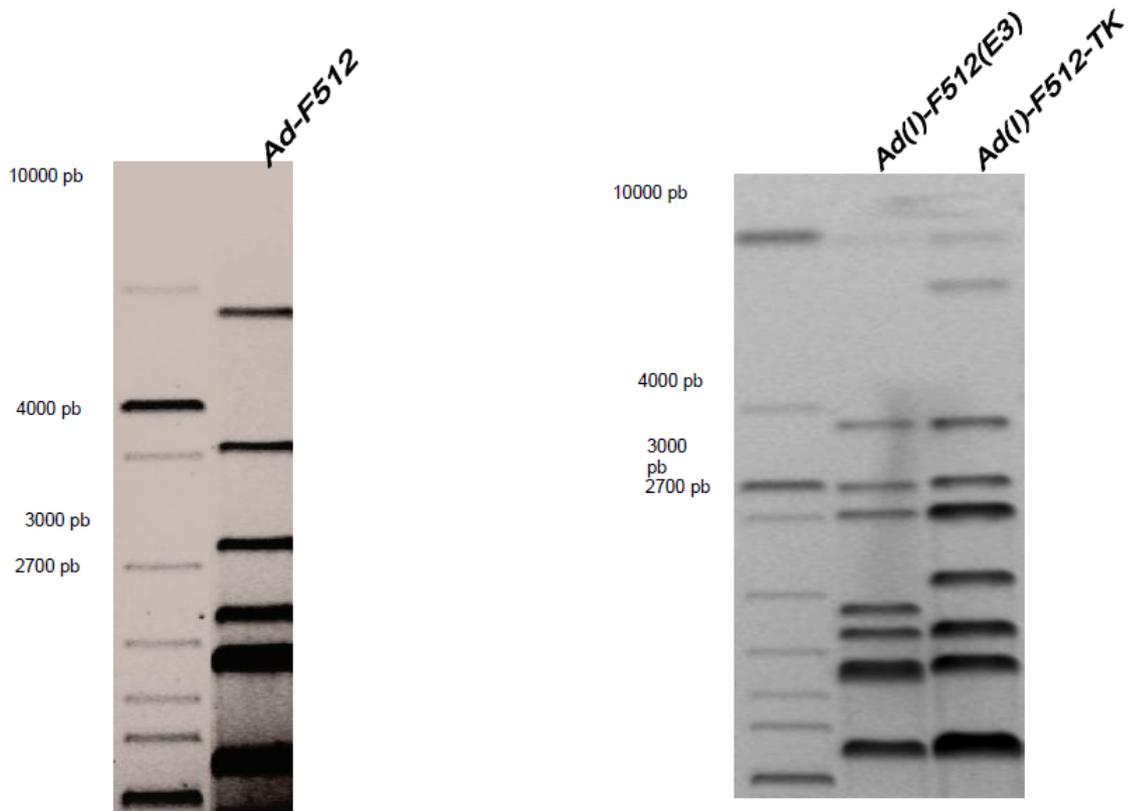


FIG. 5 B

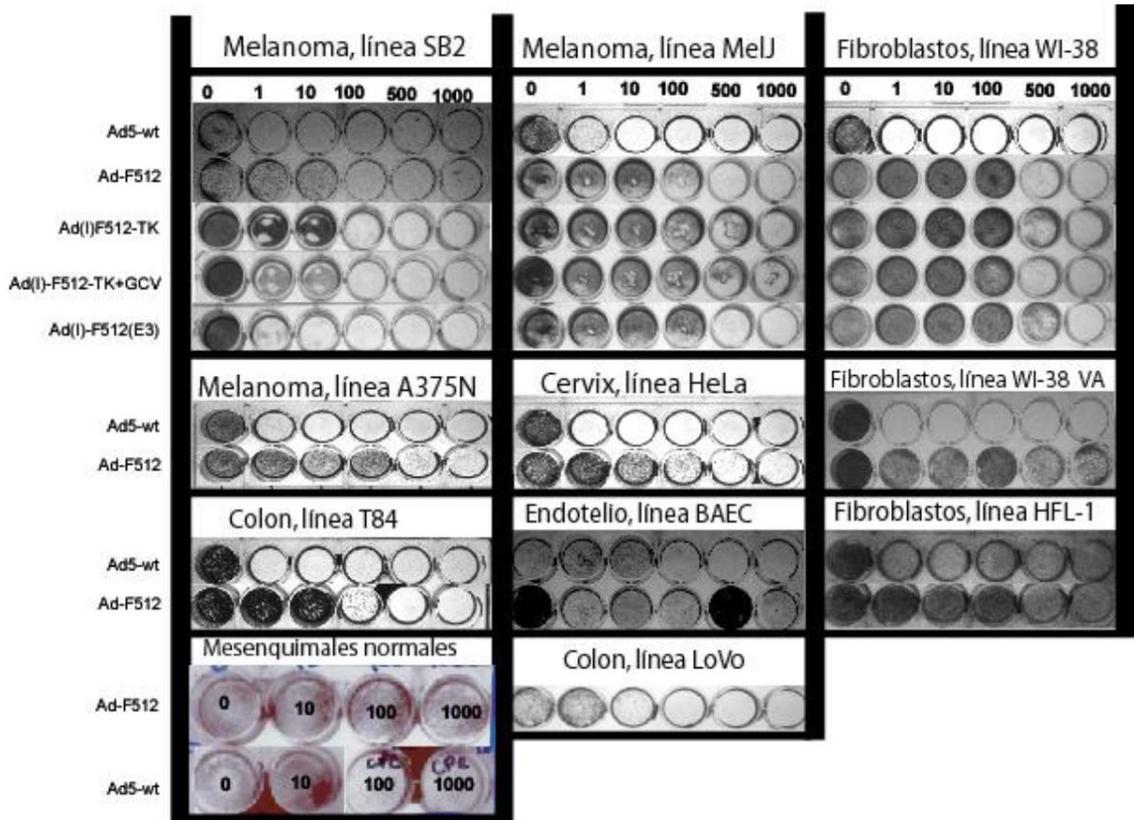


FIG. 6

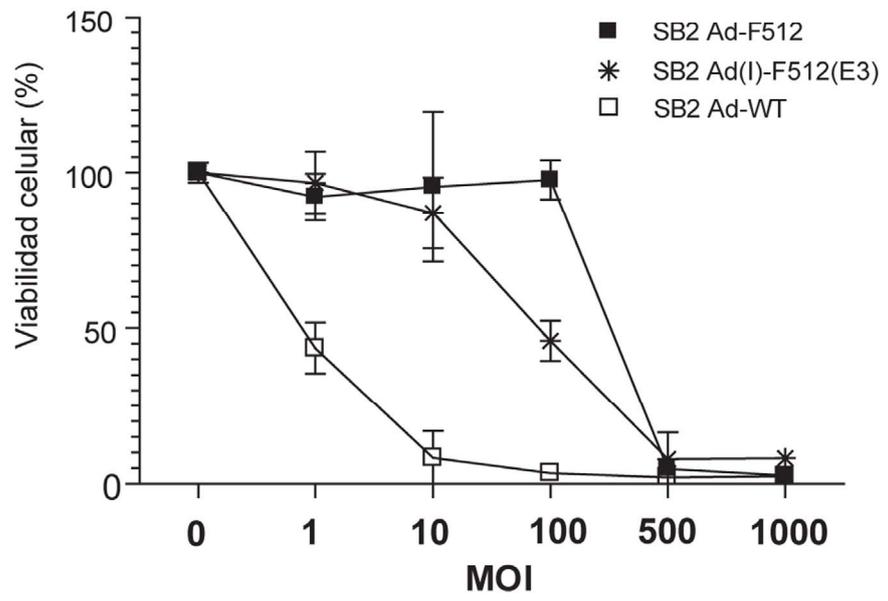


FIG. 7 A

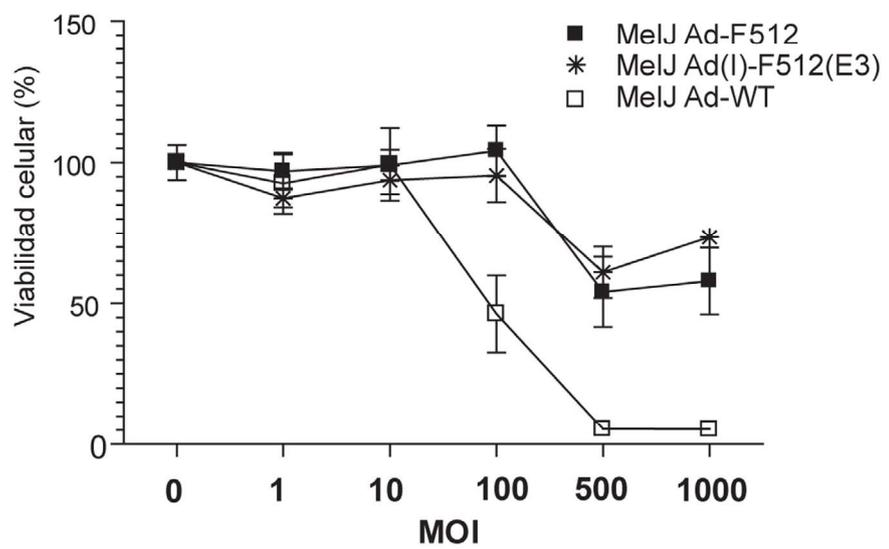


FIG. 7 B

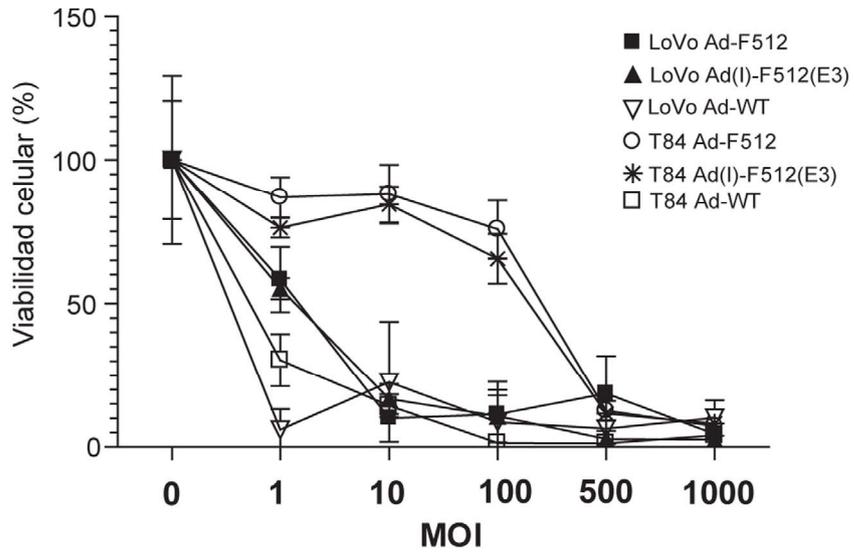


FIG. 7 C

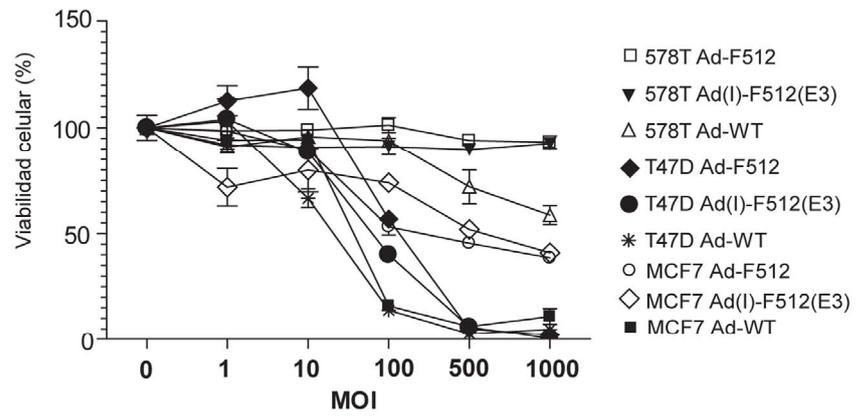


FIG. 7 D

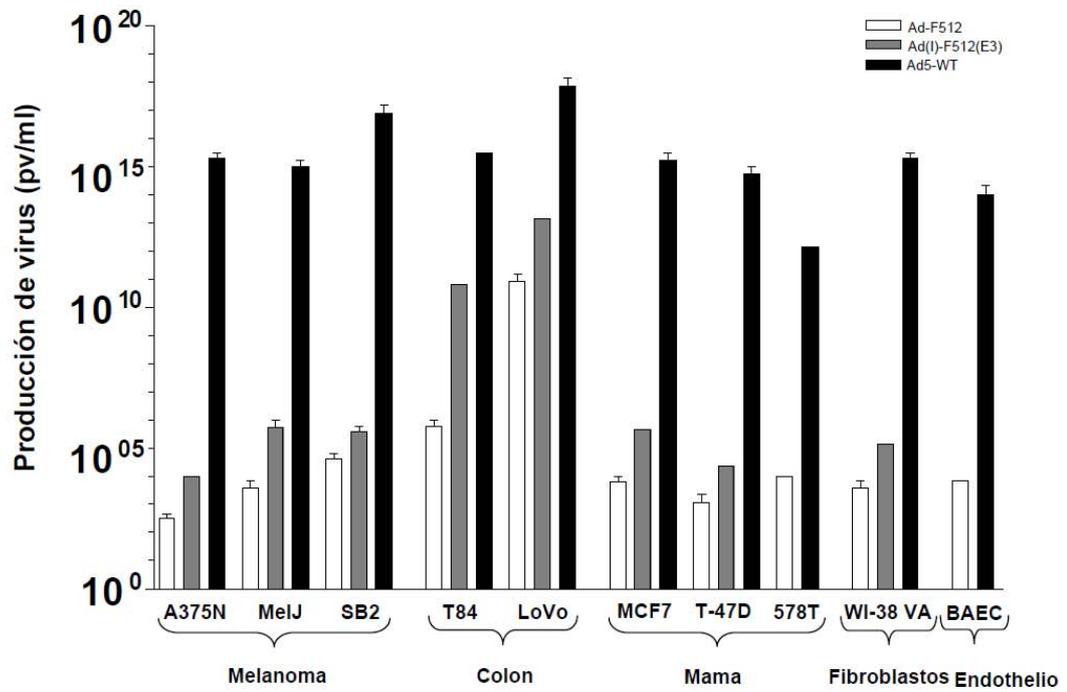


FIG. 8



FIG. 9

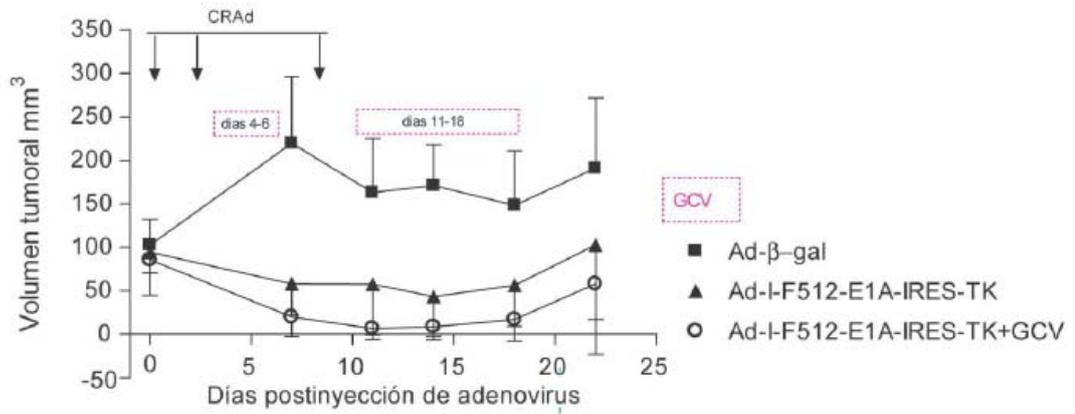


FIG. 10 A

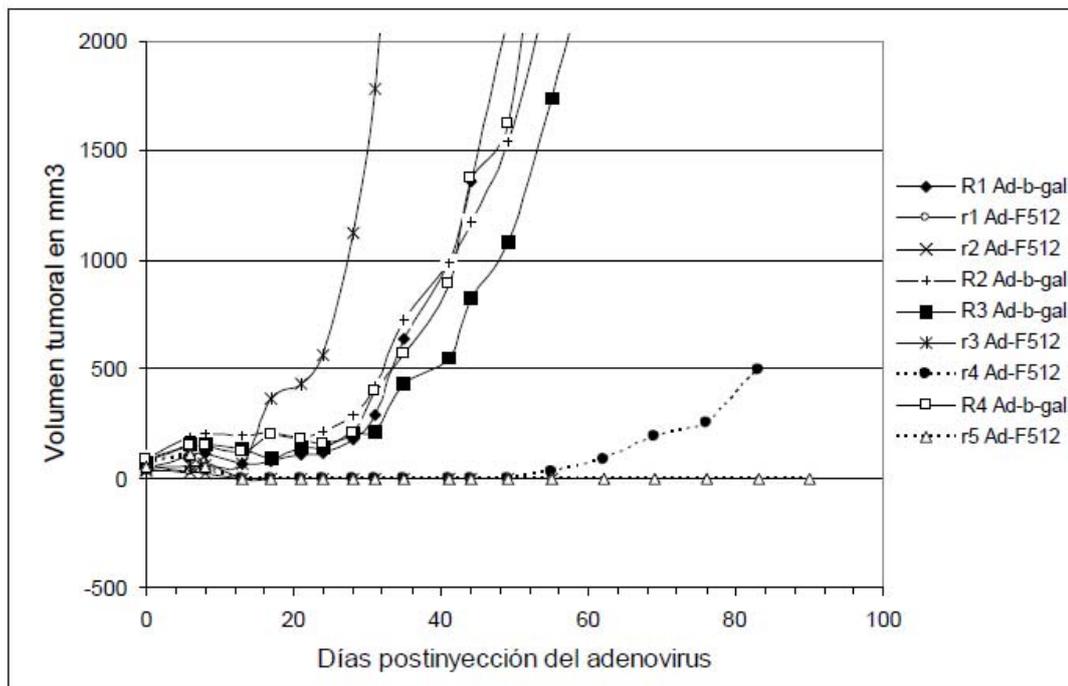


FIG. 10 B



FIG. 10 C

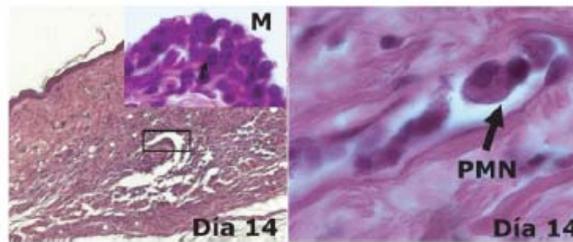


FIG. 10 D

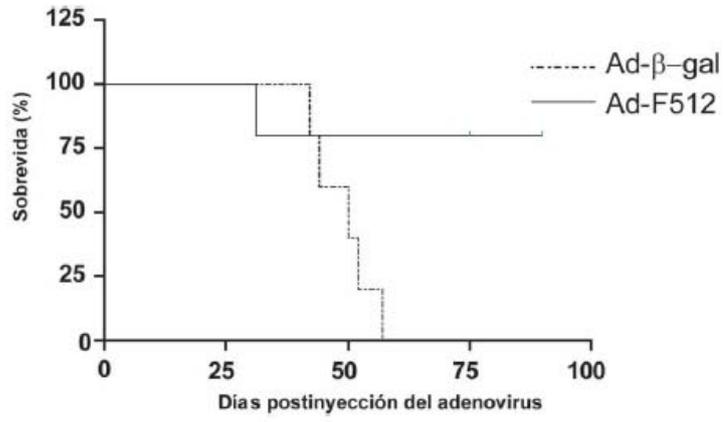


FIG. 10 E

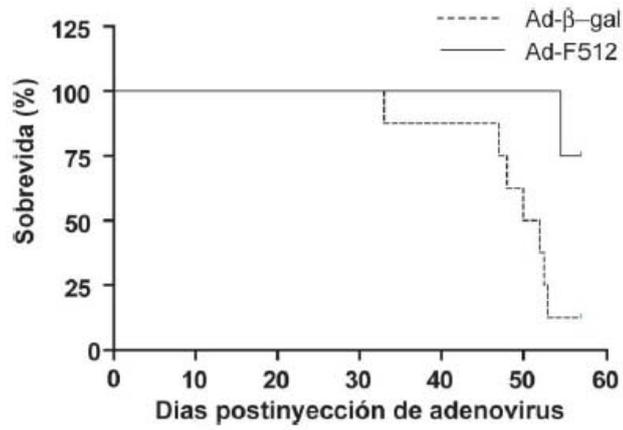


FIG. 10 F

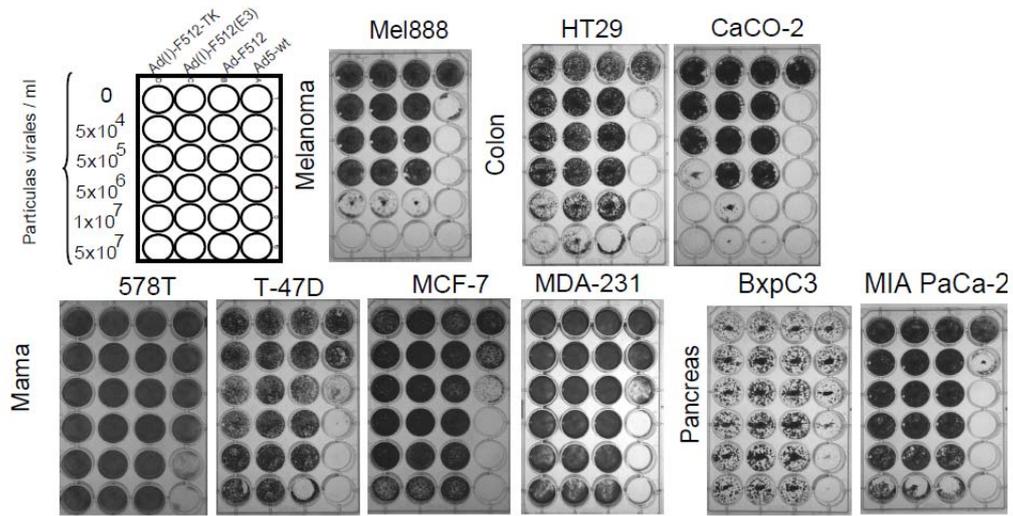


FIG. 11

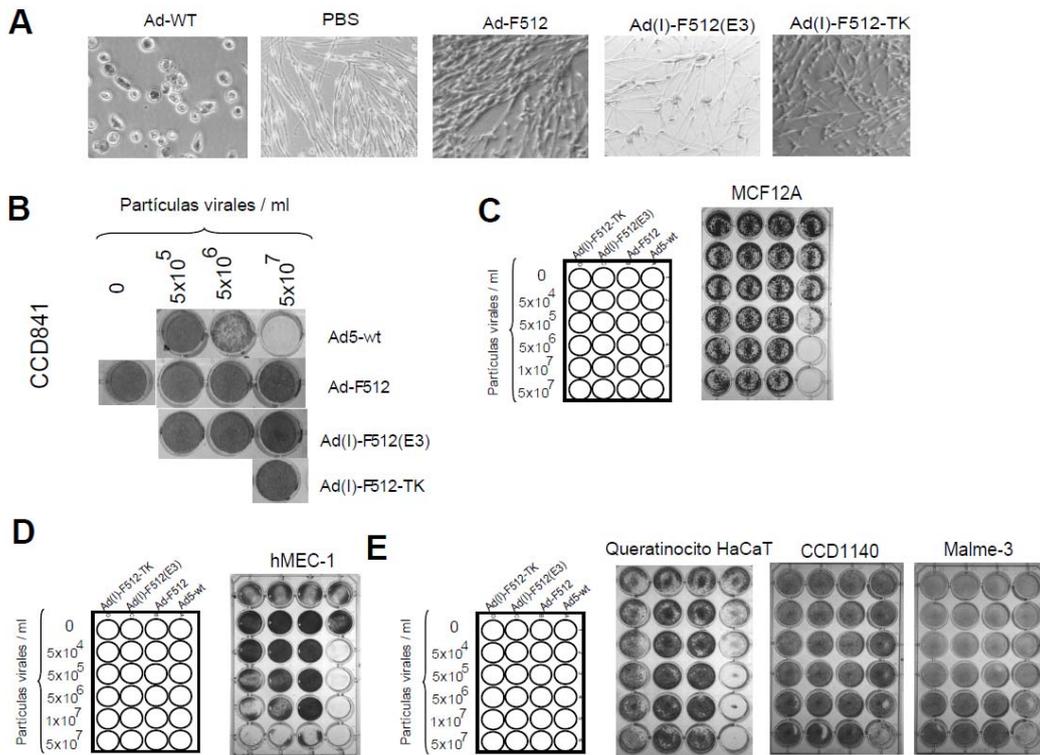


FIG. 12

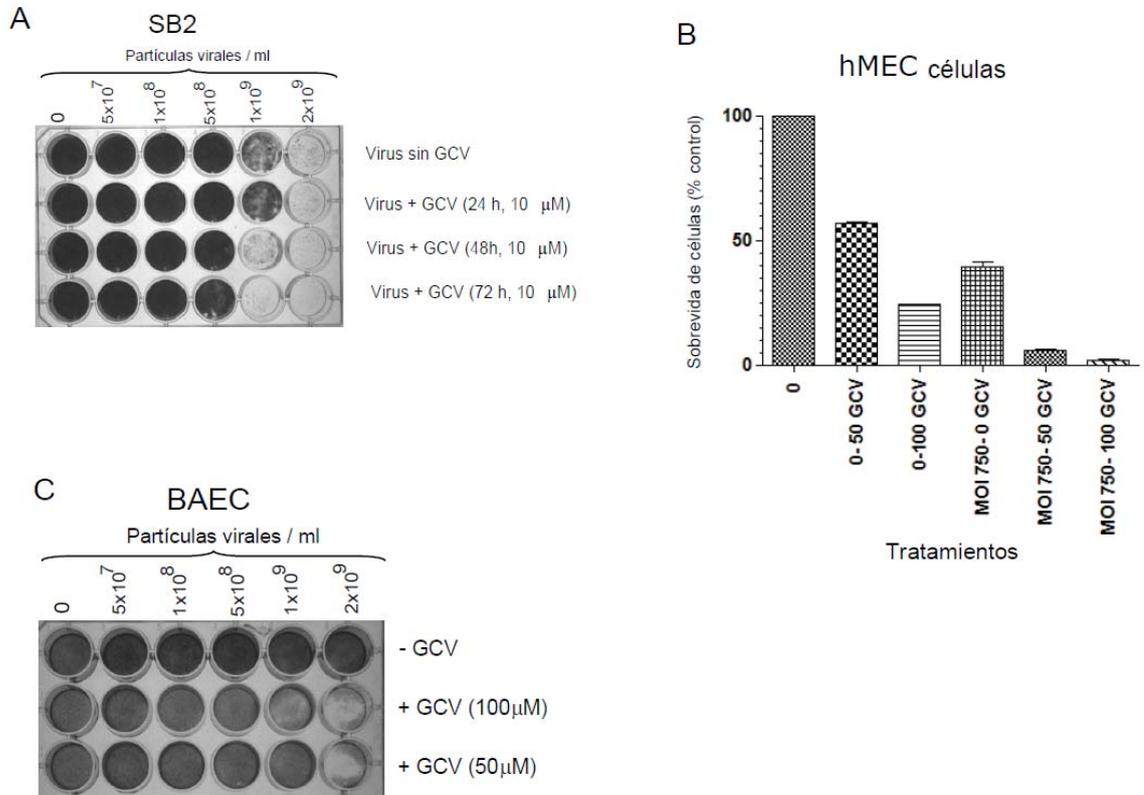


FIG. 13

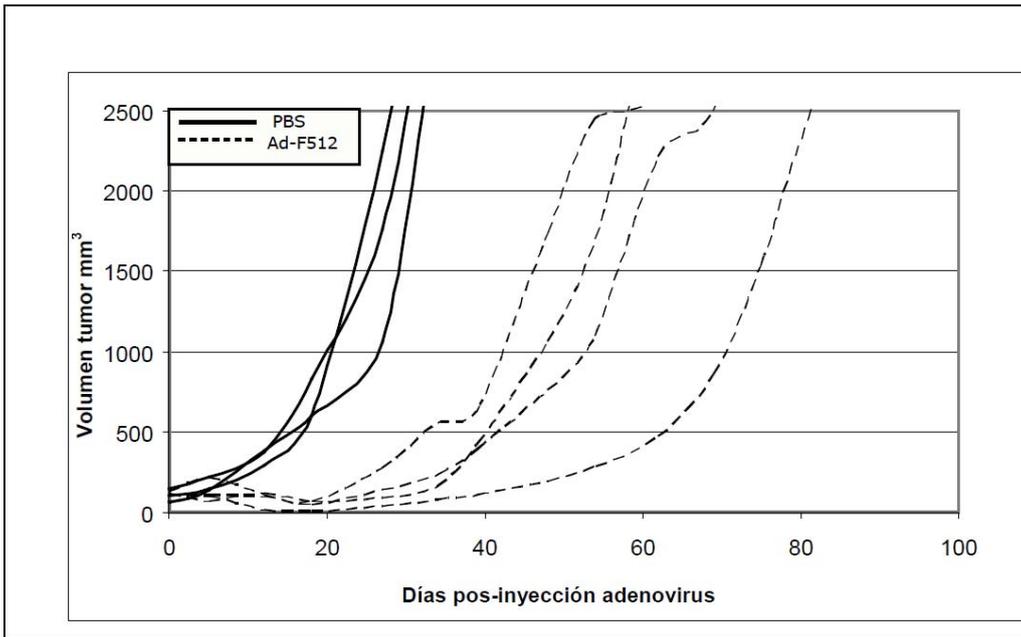


FIG. 14 A

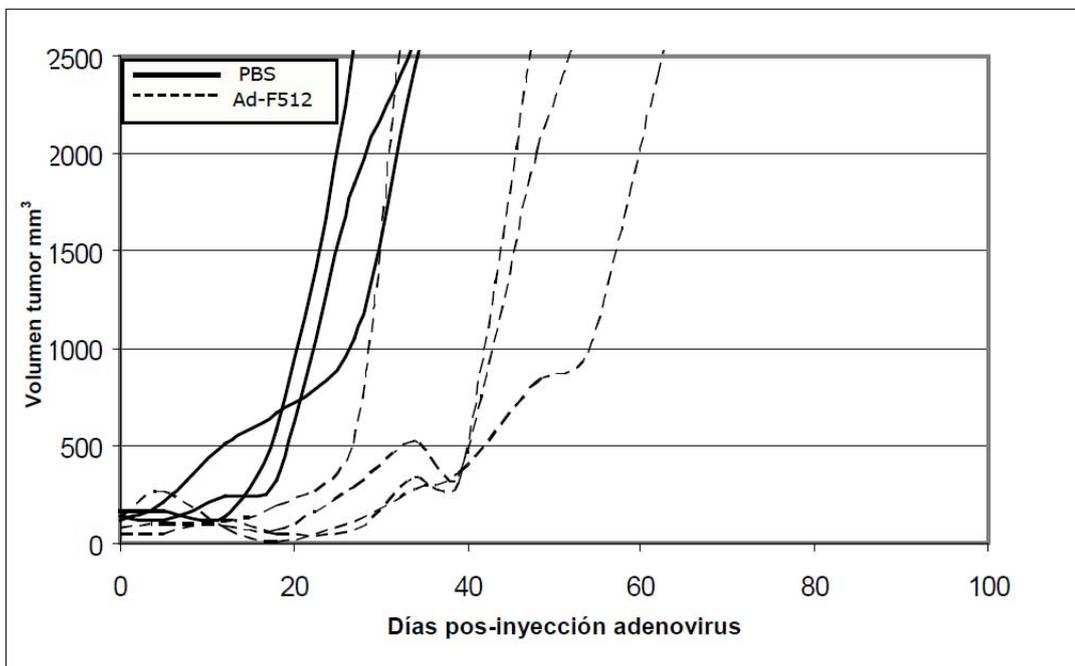


FIG. 14 B

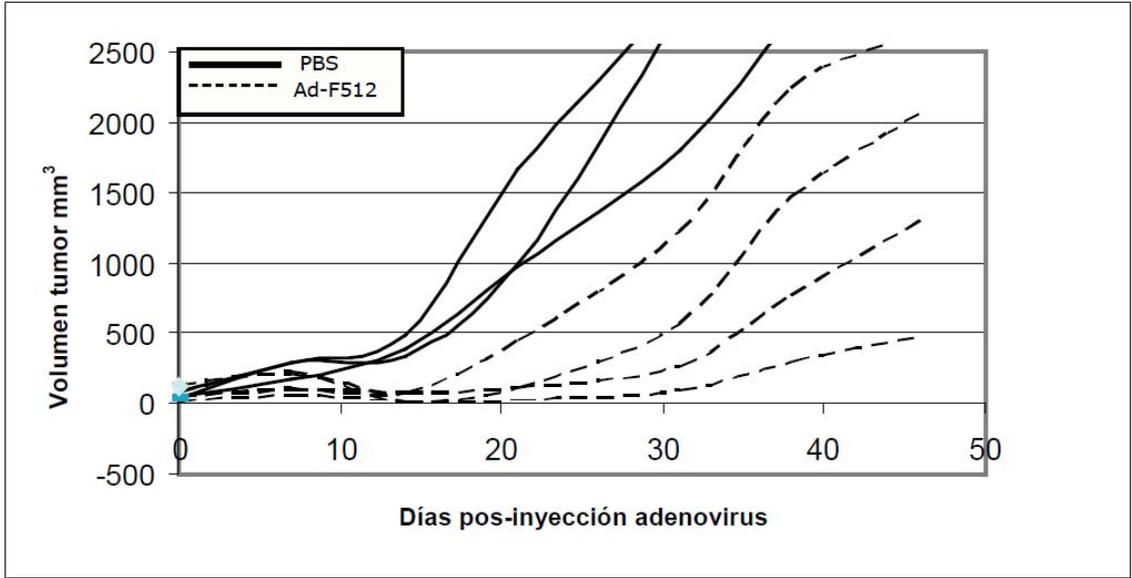


FIG. 14 C

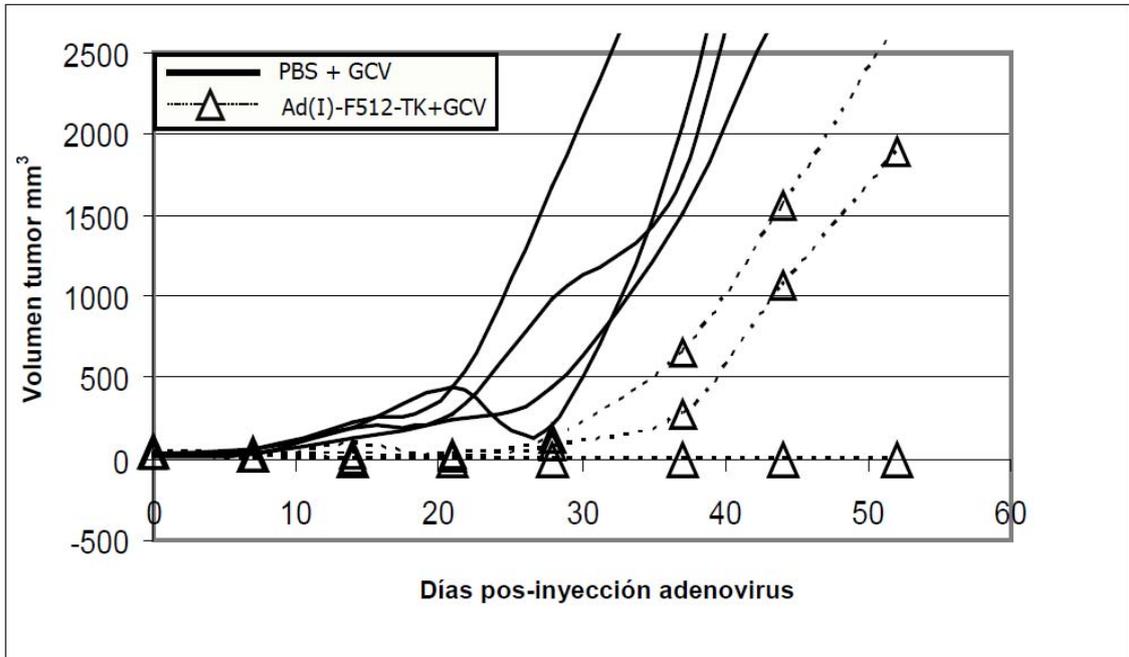


FIG. 14 D

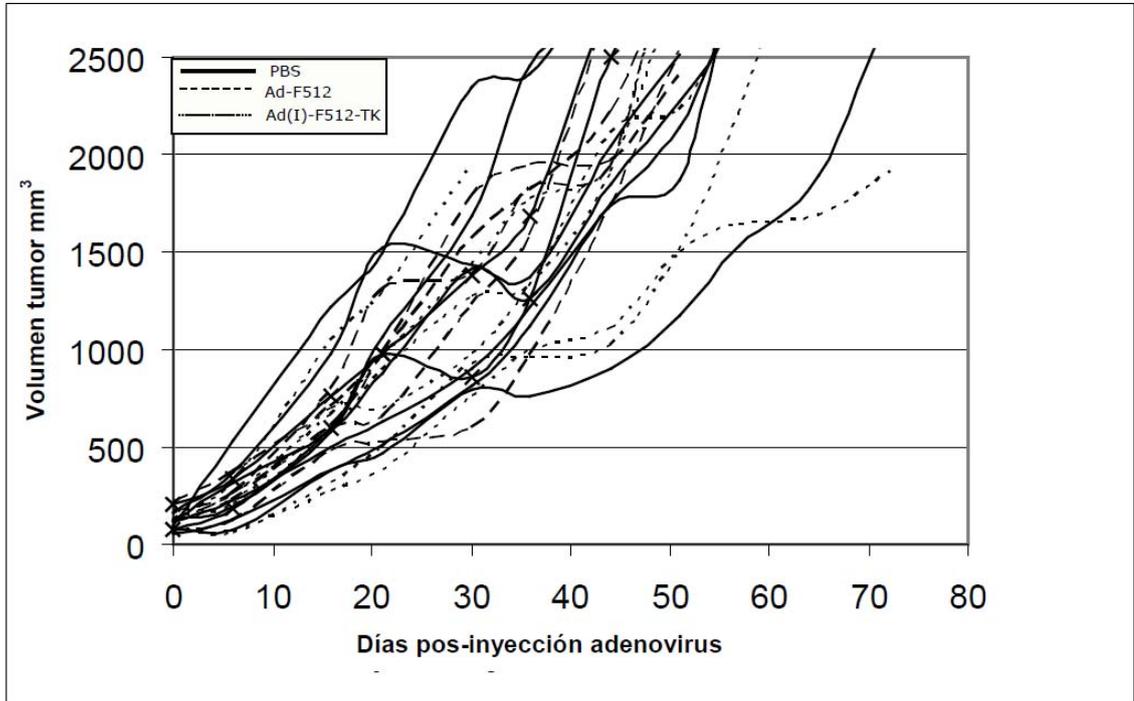


FIG. 15 A

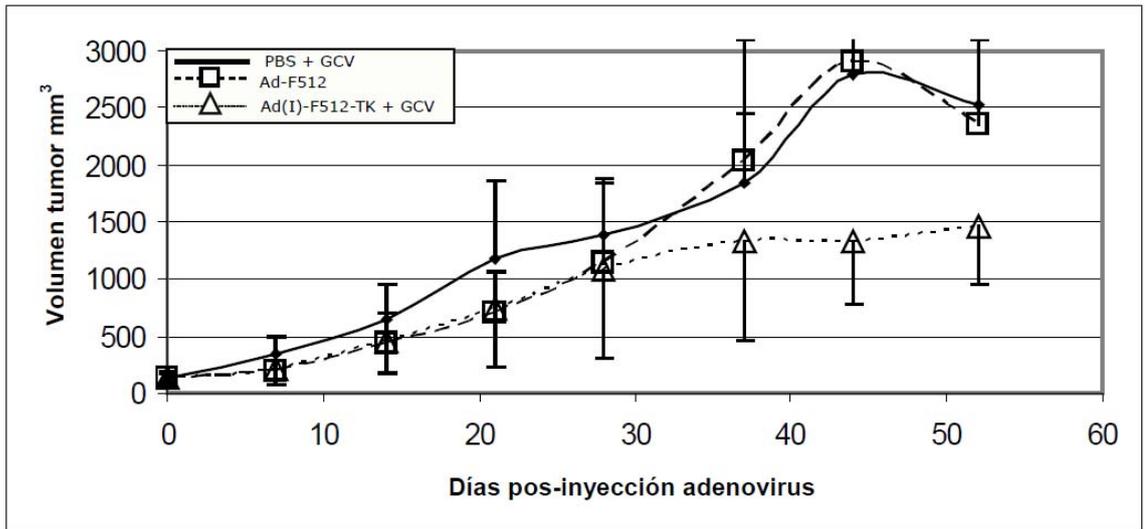


FIG. 15 B

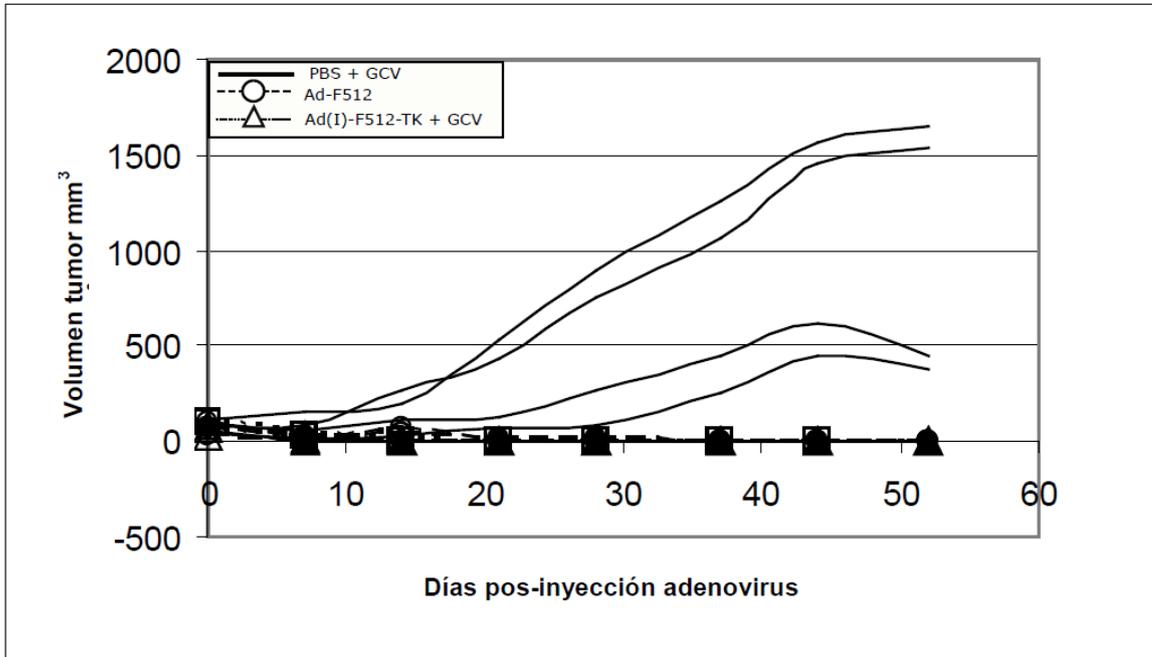


FIG. 15 C

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de la patente europea. A pesar del cuidado tenido en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO niega toda responsabilidad en este sentido.

Literatura diferente de patentes citada en la descripción

- **LEDDA, M.F. ; ADRIS, S. ; BRAVO, A.I. ; KAIRI-YAMA, C. ; BOVER, L. ; CHERNAJOVSKY, Y. ; MORDOH, J. ; PODHAJECER, O.L.** Suppression of SPARC expression by antisense RNA abrogates the tumorigenicity of human melanoma cells. *Nat Med*, 1997, vol. 3, 171-176 [0003]
- **PORTE, H. ; TRIBOULET, J.P. ; KOTELEVETS, L. ; CARRAT, F. ; PREVOT, S. ; NORDLINGER, B. ; DIGIOIA, Y. ; WURTZ, A. ; COMOGLIO, P. ; GESPACH, C.** Overexpression of stromelysin-3, BM-40/SPARC, and MET genes in human esophageal carcinoma: implications for prognosis. *Clin Cancer Res*, 1998, vol. 4, 1375-1382 [0003]
- **LANE, T.F. ; SAGE, E.H.** The biology of SPARC, a protein that modulates cell-matrix interactions. *Faseb J*, 1994, vol. 8, 163-173 [0003]
- **HAFNER, M. ; ZIMMERMANN, K. ; POTTGIESSER, J. ; KRIEG, T. ; NISCHT, R. A.** purine-rich sequence in the human BM-40 gene promoter region is a prerequisite for maximum transcription. *Matrix Biol*, 1995, vol. 14, 733-741 [0004]
- **MCVEY, J.H. ; NOMURA, S. ; KELLY, P. ; MASON, I.J. ; HOGAN, B.L.** Characterization of the mouse SPARC/osteonectin gene. Intron/exon organization and an unusual promoter region. *J Biol Chem*, 1988, vol. 263, 11111-11116 [0004]
- **YOUNG, M. F. ; FINDLAY, D. M. ; DOMINGUEZ, P. ; BURBELO, P. D. ; MCQUILLAN, C. ; KOPP, J. B. ; ROBNEY, P. G. ; TERMINE, J. D.** Osteonectin promoter. DNA sequence analysis and S1 endonuclease site potentially associated with transcriptional control in bone cells. *J Biol Chem*, 1989, vol. 264, 450-456 [0004]
- **BREATHNACH, R. et al.** Organization and expression of eucaryotic split genes coding for proteins. *Annu Rev Biochem*, 1981, vol. 50, 349-383 [0005]
- **DOMINGUEZ, P. ; IBARAKI, K. ; ROBNEY, P.G. ; HEFFERAN, T.E. ; TERMINE, J.D. ; YOUNG, M.F.** Expression of the osteonectin gene potentially controlled by multiple cis-and trans-acting factors in cultured bone cells. *J Bone Miner Res*, 1991, vol. 6, 1127-1136 [0006]
- **VILE, R.** Cancer gene therapy-new approaches to tumour cell killing. *J Gene Med*, 2000, vol. 2, 141-143 [0007]
- **TOLLEFSON, A.E. et al.** The E3-11.6-kDa adenovirus death protein (ADP) is required for efficient cell death: characterization of cells infected with adp mutants. *Virology*, 1996, vol. 220, 152-162 [0009]
- **TOLLEFSON, A.E. et al.** The adenovirus death protein (E3-11.6K) is required at very late stages of infection for efficient cell lysis and release of adenovirus from infected cells. *J Virol*, 1996, vol. 70, 2296-2306 [0009]
- **KRUYT, F.A. et al.** A new generation of conditionally replicating adenoviruses: pairing tumor selectivity with maximal oncolysis. *Hum Gene Ther*, 2002, vol. 13, 485-495 [0009]
- **MOOLTEN, F. L.** Drug sensitivity ("suicide") genes for selective cancer chemotherapy. *Cancer Gene Ther*, 1994, vol. 1, 279-287 [0010]
- **HERNANDEZ-ALCOCEBA R ; PIHALJA M ; NUN-EZ G ; CLARKE MF.** Evaluation of a new dual-specificity promoter for selective induction of apoptosis in breast cancer cells. *Cancer Gene Ther.*, April 2001, vol. 8 (4), 298-307 [0029]
- **GRECO O. et al.** Novel chimeric gene promoters responsive to hypoxia and ionizing radiation. *Gene Ther*, 2002, vol. 9, 1403-1411 [0029]
- **IDO A. ; UTO H. ; MORIUCHI A. ; NAGATA K. ; ONAGA Y. ; ONAGA M. ; HORI T. ; HIRONO S. ; HAYASHI K. ; TAMAOKI T.** Gene therapy targeting for hepatocellular carcinoma: selective and enhanced suicide gene expression regulated by a hypoxia-inducible enhancer linked to a human alpha-fetoprotein promoter. *Cancer Res.*, 01 April 2001, vol. 61 (7), 3016-21 [0029]
- **PARK J.O. ; LOPEZ C.A. ; GUPTA V.K. ; BROWN C.K. ; MAUCERI H.J. ; DARGA T.E. ; MANAN A. ; HELLMAN S. ; POSNER M.C. ; KUFE D.W.** Transcriptional control of viral gene therapy by cisplatin. *J Clin Invest.*, August 2002, vol. 110 (3), 403-10 [0029]
- **COWEN R.L. ; WILLIAMS K.J. ; CHINJE E.C. ; JAFFAR M. ; SHEPPARD F.C. ; TELFER B.A. ; WIND N.S. ; STRATFORD I.J.** Hypoxia targeted gene therapy to increase the efficacy of tirapazamine as an adjuvant to radiotherapy: reversing tumor radioresistance and effecting cure. *Cancer Res.*, 15 February 2004, vol. 64 (4), 1396-402 [0029]
- **PFAFF1, M.W.** A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 2001, vol. 29, e45 [0044]
- **KADONAGA, J.T.** The DPE, a core promoter element for transcription by RNA polymerase II. *Exp Mol Med*, 2002, vol. 34, 259-264 [0046]

- **SHERF, B.A. et al.** Dual Luciferase Reporter Assay: An Advanced Co-Reporter Technology Integrating Firefly and Renilla Luciferase Assays. *Promega Notes Magazine*, 1996, 2-9 [0052]
- **MARIANO J. ALVAREZ ; FEDERICO PRADA ; EDGARDO SALVATIERRA ; ALICIA I. BRAVO ; VIVIANA P. LUTZKY ; CECILIA CARBONE ; FERNANDO J. ; PITOSI, H. ; EDUARDO CHULUYAN ; OSVALDO L. PODHAJECR.** Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine Produced by Human Melanoma Cells Modulates Polymorphonuclear Leukocyte Recruitment and Antitumor Cytotoxic Capacity. *Cancer Research*, 15 June 2005, vol. 65, 5123-5132 [0059]
- **STEINWAERDER, D.S. ; LIEBER, A.** Insulation from viral transcriptional regulatory elements improves inducible transgene expression from adenovirus vectors in vitro and in vivo. *Gene Ther*, 2000, vol. 7, 556-567 [0060]
- **HEARING, P. ; SHENK, T.** The adenovirus type 5 E1A enhancer contains two functionally distinct domains: one is specific for E1A and the other modulates all early units in cis. *Cell*, 1986, vol. 45, 229-236 [0060]
- **MARTIN-DUQUE, P. ; JEZZARD, S. ; KAFTANSIS, L. ; VASSAUX, G.** Direct comparison of the insulating properties of two genetic elements in an adenoviral vector containing two different expression cassettes. *Hum Gene Ther*, 2004, vol. 15, 995-1002 [0060]
- **BERENSTEIN, M. ; ADRIS, S. ; LEDDA, F. ; WOLFMANN, C. ; MEDINA, J. ; BRAVO, A. ; MORDOH, J. ; CHERNAJOVSKY, Y. ; PODHAJECR, O. L.** Different efficacy of in vivo herpes simplex virus thymidine kinase gene transduction and ganciclovir treatment on the inhibition of tumor growth of murine and human melanoma cells and rat glioblastoma cells. *Cancer Gene Ther*, 1999, vol. 6, 358-366 [0063]
- **FERRARI, C. C. ; DEPINO, A. M. ; PRADA, F. ; MURARO, N. ; CAMPBELL, S. ; PODHAJECR, O. ; PERRY, V. H. ; ANTHONY, D. C. ; PITOSI, F. J.** Reversible demyelination, blood-brain barrier breakdown, and pronounced neutrophil recruitment induced by chronic IL-1 expression in the brain. *Am J Pathol*, 2004, vol. 165, 1827-1837 [0066]
- **NEVINS, J. R.** Definition and mapping of adenovirus 2 nuclear transcription. *Methods Enzymol*, 1980, vol. 65, 768-785 [0066]
- **LIEBER, A. ; HE, C. Y. ; KIRILLOVA, I. ; KAY, M. A.** Recombinant adenoviruses with large deletions generated by Cre-mediated excision exhibit different biological properties compared with first-generation vectors in vitro and in vivo. *J Virol*, 1996, vol. 70, 8944-8960 [0067]
- **KANERVA, A. ; HEMMINKI, A.** Adenoviruses for treatment of cancer. *Ann Med*, 2005, vol. 37, 33-43 [0076]
- **MOSMANN, T.** Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 1983, vol. 65, 55-63 [0082]
- **LEDDA et al.** Suppression of SPARC expression by antisense RNA abrogates the tumorigenicity of human melanoma cells. *Nat Med.*, February 1997, vol. 3 (2), 171-6 [0103]
- **YAMAZAKI, M. ; STRAUS, F. H. ; MESSINA, M. ; ROBINSON, B. G. ; TAKEDA, T. ; HASHIZUME, K. ; DEGROOT, L. J.** Adenovirus-mediated tumor-specific combined gene therapy using Herpes simplex virus thymidine/ganciclovir system and murine interleukin-12 induces effective antitumor activity against medullary thyroid carcinoma. *Cancer Gene Ther*, 2004, vol. 11, 8-15 [0111]