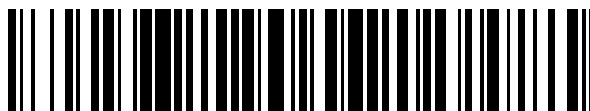


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 385 492**

51 Int. Cl.:
C12N 15/85 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **05767457 .4**
96 Fecha de presentación: **01.04.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1737966**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **03.01.2007**

54 Título: **Promotores específicos de cáncer**

30 Prioridad:
02.04.2004 US 559111 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
25.07.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
25.07.2012

73 Titular/es:
**BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF
TEXAS SYSTEM
201 WEST 7TH STREET 7TH FLOOR
AUSTIN, TX 78701, US**

72 Inventor/es:
**HUNG, Mien-Chie;
DAY, Chi-Ping;
RAU, Kun-Ming;
XIE, Xiaoming y
LI, Zheng**

74 Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

ES 2 385 492 T3

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

DESCRIPCIÓN

Promotores específicos de cáncer

Campo de la invención

5 La presente invención está dirigida a los campos de la biología celular, biología molecular, biología del cáncer y medicina. Más particularmente, la presente invención se refiere a secuencias reguladoras específicas de cáncer para la regulación de la expresión de un polinucleótido terapéutico útil para la terapia del cáncer.

Antecedentes de la invención

10 La capacidad de controlar la expresión de polinucleótidos particulares tras transferencia génica es una función útil, particularmente para aplicaciones en que se desea una actividad localizada específica. Este es el caso del cáncer, en que es prudente confinar los productos génicos destructivos o letales a las células cancerosas, evitando al menos en parte dicha actividad en células normales.

Expresión específica de tejido de cáncer de mama

15 Las terapias actuales de cáncer de mama, tales como quimioterapia (QT) y radioterapia, tienen una baja selectividad por las células tumorales y efectos secundarios para los tejidos normales. Para minimizar los efectos secundarios, estas terapias se administran generalmente de manera intermitente, permitiendo recuperarse a las células normales entre los ciclos de tratamiento. Sin embargo, durante el periodo de recuperación, algunas células cancerosas supervivientes se vuelven más resistentes al tratamiento debido a mutaciones genéticas. Por consiguiente, puede aparecer la recurrencia o progresión del cáncer. La terapia génica orientada a tumor minimiza los efectos secundarios del tratamiento y el riesgo de desarrollar resistencia al actuar sobre rutas de señalización específicas de tumor.

20 Un promotor específico de cáncer de mama descrito en la presente memoria comprende porciones seleccionadas del gen de topoisomerasa II α . Aunque la región flanqueante 5' del gen de topoisomerasa II α es conocida desde hace algún tiempo (Hochhauser *et al.*, 1992), no se ha demostrado que una región activa particular descrita en la presente memoria fuera útil para tejido de cáncer de mama, siquiera ligada con potenciador de citomegalovirus (Mo *et al.*, 1998).

Otro promotor específico de cáncer de mama descrito en la presente memoria comprende porciones seleccionadas del promotor de receptor de transferrina. La expresión del receptor de transferrina se ha localizado en tejido de mama (Fuernkranz *et al.*, 1991; Shterman *et al.*, 1991) y en cáncer de mama (Bauman *et al.*, 1997; Shindelman *et al.*, 1981), pero no se ha dado a conocer una región particular que proporcione dicha actividad.

30 Expresión específica de tejido de cáncer de próstata

Se han desarrollado recientemente promotores específicos de próstata tales como PSA, probasina y hK2. Las actividades de estos promotores son dependientes de andrógeno y el uso de vectores sensibles a andrógeno para dirigir la expresión de genes terapéuticos a tejido prostático es útil para numerosas etapas de la enfermedad. Aunque dichos promotores específicos de próstata sensibles a receptor de andrógeno se han desarrollado por los presentes inventores (Xie *et al.*, *Cancer Res.* 2001) y otros grupos (Zhang *et al.*, *Mol. Endocrinol.* 2000), estos promotores dependientes de andrógeno pueden ser menos activos después de castración o terapia de ablación androgénica, que son las modalidades principales de tratamiento de cáncer de próstata progresivo. En los pacientes tratados con composiciones que comprenden estos promotores, este tipo de terapia puede fracasar y morir de cáncer de próstata independiente de andrógeno (CPIA) recurrente. Falta en la técnica un promotor novedoso para terapia génica de cáncer de próstata que sea activo tanto en CPDA como en CPIA para tratar el cáncer de próstata refractario a hormonas metastásico y recurrente.

Expresión específica de tejido de cáncer pancreático

45 El cáncer pancreático es una de las malignidades humanas más agresivas y la quinta causa de muerte por cáncer, dado que no están disponibles modalidades eficaces. La presente invención se enfrenta a dicha necesidad proporcionando un promotor eficaz para regular la expresión de un polinucleótido terapéutico específicamente en células de cáncer pancreático.

Breve resumen de la invención

50 La presente invención proporciona promotores específicos de tejido novedosos para la regulación de la expresión de un polinucleótido terapéutico. Estas composiciones y procedimientos terapéuticos que las utilizan son útiles para el tratamiento del cáncer, y un especialista en la materia reconocerá que cualquier medio adicional en el arsenal para combatir el cáncer es beneficioso para la salud pública.

En particular, la invención proporciona composiciones, tales como composiciones terapéuticas, y procedimientos de uso de las mismas dirigidas a la expresión regulada específica del cáncer de un polinucleótido terapéutico en terapia génica del cáncer, tal como al menos cáncer de ovario, mama, pancreático y de próstata, por ejemplo.

5 Por tanto, la presente invención se refiere en general a procedimientos para inhibir la proliferación en una célula cancerosa y/o célula tumoral, comprendiendo el procedimiento poner en contacto la célula con un polipéptido terapéutico en una cantidad eficaz para inhibir la proliferación utilizando un promotor específico de cáncer, tal como uno descrito en la presente memoria. La inhibición de la proliferación puede indicarse, por ejemplo, por una inducción de la apoptosis de una célula tal como, por ejemplo, en cultivo celular, la inhibición del crecimiento de una línea celular cancerosa, la reducción del tamaño de un tumor y/o el aumento de la supervivencia, en realizaciones
10 ejemplares. Más preferiblemente, en algunas realizaciones las células en que se va a inhibir la proliferación es una célula en un organismo vivo, por ejemplo un ser humano. La inhibición de dicha transformación tiene una gran utilidad en la prevención y/o tratamiento de eventos activados por la transformación tales como cáncer, tumorigénesis y/o metástasis.

15 La presente invención engloba constructos polinucleotídicos que comprenden secuencias de control que dirigen la expresión de un polinucleótido terapéutico en un tejido y/o tipo de célula particular. El polinucleótido puede ponerse en contacto con, o introducirse en, una célula mediante cualquiera de una variedad de maneras conocidas por los especialistas. El polinucleótido terapéutico puede introducirse mediante introducción directa de polinucleótido en una célula o tejido de interés. En este caso, el polinucleótido terapéutico puede obtenerse mediante cualquier procedimiento conocido en la materia.

20 En aspectos específicos de la invención, pueden introducirse en la célula ARN o ADN que comprenden el polinucleótido terapéutico mediante cualquier manera conocida en la materia. En ciertas realizaciones preferidas, se introduce el polipéptido terapéutico en la célula mediante la introducción de un segmento de ADN que codifique el producto génico terapéutico. En algunas de dichas realizaciones, se prevé que el segmento de ADN que comprende el polinucleótido terapéutico esté ligado operativamente con las secuencias de control de la invención. La
25 construcción de dichos constructos génicos/de ADN de secuencia de control es bien conocida en la materia y se describe con detalle en la presente memoria.

En ciertas realizaciones, para la introducción, el segmento de ADN puede estar localizado en un vector, por ejemplo, un vector plasmídico o un vector vírico. El vector vírico puede ser, por ejemplo, un retrovirus, adenovirus, herpesvirus, virus *Vaccinia* y virus adenoasociados. Dicho segmento de ADN puede usarse en la variedad de
30 procedimientos relacionados con la invención. El vector puede usarse para suministrar un polinucleótido bik mutante a una célula en una de las realizaciones de terapia génica de la invención en realizaciones específicas. Dichos vectores pueden usarse también para transformar células cultivadas, y dichas células cultivadas podrían usarse, entre otras cosas, para la expresión de Bik mutante *in vitro*.

35 Un especialista en la materia reconocerá que los promotores de la invención son útiles en cualquier contexto, incluyendo la expresión específica de células no cancerosas o incluso la expresión de un polinucleótido que no sea de naturaleza específica de célula o tejido.

En una realización particular, un producto génico terapéutico es eficaz sobre el tejido de cáncer de mama, pancreático o de próstata respectivo. En realizaciones ejemplares, la presente invención es útil para suministrar
40 constructos genéticos que tratan cánceres que son positivos de receptor de estrógeno, que sobreexpresan receptor de EGF, que sobreexpresan Her2/neu, que no sobreexpresan Her-2/neu, que sobreexpresan Akt, dependientes de andrógeno y/o independientes de andrógeno, por ejemplo. Es decir, el producto génico terapéutico es eficaz sobre las células cancerosas respectivas independientemente de su estado de sobreexpresión oncogénica, tal como de Her-2/neu, EGFR, AKT, o independientemente de si su crecimiento es dependiente de hormona (tal como, por ejemplo, MCF-7) o no (tal como, por ejemplo, PC3).

45 Un especialista será consciente de las bases de datos disponibles al público que proporcionan secuencias polinucleotídicas terapéuticas, tales como la base de datos GenBank del National Center for Biotechnology Information o bases de datos disponibles comercialmente tales como Celera Genomics, Inc. (Rockville, MD). Aunque hay una pluralidad de polinucleótidos terapéuticos que son conocidos en la materia que se ha descubierto después que pueden utilizarse en la invención, algunos ejemplos incluyen inhibidores de la proliferación celular, reguladores
50 de la muerte celular programada, supresores tumorales y secuencias anticodificantes de inductores de la proliferación celular. El polinucleótido terapéutico puede codificar ARN interferentes pequeños o secuencias anticodificantes, por ejemplo. Los polinucleótidos terapéuticos ejemplares particulares incluyen aquellos que codifican Bik mutante, retinoblastoma, Blk, IL-12, IL-10, IFN- α , citosina desaminasa, GM-CSF, E1A, p53 y otras proteínas proapoptóticas, por ejemplo. Un constructo puede comprender también polinucleótidos terapéuticos tales como TNF α o p53 o inductores de la apoptosis incluyendo, pero sin limitación, Bik, p53, Bax, Bak, Bcl-x, Bad, Bim, Bok, Bid, Harakiri, Ad E1B, Bad y proteasas ICE-CED3. En aspectos específicos de la invención, se utiliza un polinucleótido Bik mutante que codifica una sustitución aminoacídica en la treonina 33, la serina 35 o ambas. En aspectos particulares de estas realizaciones, los aminoácidos del polipéptido Bik mutante están sustituidos por aspartato. En otros aspectos particulares, un Bik mutante es defectivo de uno o más sitios de fosforilación. En
60 realizaciones adicionales, el Bik mutante retiene actividad antiproliferativa celular y/o proapoptótica.

En realizaciones particulares, se introduce un constructo que comprende el polinucleótido terapéutico de la invención y las secuencias de control específicas del cáncer respectivo en una célula que es una célula humana. En muchas realizaciones, la célula es una célula tumoral. En algunas realizaciones actualmente preferidas, la célula tumoral es una célula tumoral de mama, una célula tumoral de ovario, una célula tumoral de próstata o una célula tumoral pancreática. En algunas realizaciones, se introduce un constructo que comprende el polinucleótido terapéutico y las secuencias de control específicas del cáncer respectivo mediante inyección. En realizaciones particulares, el constructo que comprende el polinucleótido terapéutico y las secuencias de control específicas del cáncer respectivo está comprendido en un liposoma.

En algunas realizaciones de la presente invención, se usa un constructo que comprende el polinucleótido terapéutico y las secuencias de control específicas del cáncer respectivo en combinación con otras terapias antitransformación/anticancerosas. Estas otras terapias pueden ser conocidas en el momento de la solicitud, o pueden evidenciarse después de la fecha de esta solicitud. Puede usarse un constructo que comprende el polinucleótido terapéutico y las secuencias de control específicas del cáncer respectivo en combinación con otros polipéptidos terapéuticos, polinucleótidos que codifican otros polipéptidos terapéuticos, agentes quimioterapéuticos, procedimientos quirúrgicos o radiación, por ejemplo.

Puede usarse un constructo que comprende el polinucleótido terapéutico y las secuencias de control específicas del cáncer respectivo junto con cualquier agente quimioterapéutico adecuado. En una realización representativa, el agente quimioterapéutico es taxol. Puede usarse también un constructo que comprende el polinucleótido terapéutico y las secuencias de control específicas del cáncer respectivo junto con radioterapia. El tipo de radiación ionizante que constituye la radioterapia puede comprender rayos X, rayos γ y microondas, por ejemplo. En ciertas realizaciones, la radiación ionizante puede suministrarse por irradiación de rayos externos o mediante la administración de un radionucleido. El producto génico terapéutico regulado por la secuencia de control específica de cáncer puede usarse también con otros regímenes de terapia génica. En realizaciones particulares, se introduce en un tumor el constructo que comprende el polinucleótido terapéutico y las secuencias de control específicas del cáncer respectivo. El tumor puede estar en un animal, en particular un mamífero tal como un ser humano.

Los constructos que tienen los promotores específicos de tejido de la invención que regulan la expresión de un producto génico terapéutico y polinucleótidos de la presente invención pueden introducirse también usando cualquier procedimiento adecuado. Un "procedimiento adecuado" de introducción es aquel que dispone un producto génico terapéutico en una posición que reduce la proliferación de una célula tumoral, preferiblemente en el tejido o células de interés, y/o que mejora al menos un síntoma del cáncer. Por ejemplo, pueden emplearse procedimientos de inyección, orales y de inhalación, siendo capaz el especialista en la materia de determinar el procedimiento de introducción apropiado para una circunstancia dada, y las secuencias de control específicas de tejido de la presente invención dirigen la expresión del polinucleótido terapéutico al menos principalmente en el tejido o células de interés. En las realizaciones en que se use inyección, esta inyección puede ser intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, intratumoral o intrapleural, por ejemplo, o cualquier otra forma apropiada.

En ciertos otros aspectos de la presente invención, se proporcionan kits terapéuticos que comprenden en un envase adecuado una formulación farmacéutica de un constructo que comprende las secuencias de control de la invención. En aspectos adicionales, un polinucleótido que comprende las secuencias de control de la invención comprende uno o más sitios de clonación tales que pueda clonarse en el sitio un polinucleótido deseado, tal como un polinucleótido de interés. En realizaciones particulares, en un polinucleótido que tiene la orientación 5' a 3', el uno o más sitios de clonación pueden estar localizados 5' de la secuencia de control o 3' de la secuencia de control. En aspectos adicionales, están también comprendidos en el kit uno o más polinucleótidos terapéuticos tales como en la misma molécula de ácido nucleico que las secuencias de control de la presente invención. Dicho kit puede comprender adicionalmente una formulación farmacéutica de un polipéptido terapéutico, un polinucleótido que codifique un polipéptido terapéutico y/o un agente quimioterapéutico.

La actividad antitumoral, actividad antiproliferación celular y/o actividad proapoptótica proporcionadas por el producto génico del polinucleótido terapéutico pueden ser útiles para un organismo distinto del que deriva el polinucleótido terapéutico. Por ejemplo, puede usarse un polinucleótido terapéutico de murino como alternativa o adicionalmente para tratamiento humano.

Por tanto, la presente invención proporciona secuencias de control específicas de cáncer para la expresión orientada de un polinucleótido terapéutico y, por lo tanto, la presente invención está dirigida a una mejora novedosa de las técnicas globales de control del crecimiento celular, incluyendo la inhibición de la proliferación celular y/o la facilitación de la muerte celular. En una realización específica, la inhibición de la proliferación celular comprende un retardo de la velocidad de proliferación, un retardo del número total de células en proliferación o ambos.

En un objeto adicional de la presente invención, existe un procedimiento de prevención del crecimiento de una célula en un individuo que comprende la etapa de administrar al individuo un constructo que comprende secuencias de control específicas de cáncer que regulan la expresión de un polinucleótido terapéutico. En otra realización específica, la administración del constructo que comprende las secuencias de control de la invención es mediante un liposoma.

En otro objeto de la presente invención, existe un procedimiento de prevención del crecimiento de una célula en un individuo que comprende la etapa de administrar al individuo un ácido nucleico que comprende una secuencia de control específica de tejido englobada por la presente invención. En otra realización específica, la administración del ácido nucleico es mediante un vector seleccionado del grupo consistente en un plásmido, un vector retrovítico, un vector adenovítico, un vector vírico adenoasociado, un liposoma y una combinación de los mismos. La composición que comprende el ácido nucleico puede dispersarse en un excipiente farmacológicamente aceptable y la composición puede administrarse a un animal que tenga un trastorno celular proliferativo.

En un objeto adicional de la invención, se regula un polinucleótido terapéutico por un promotor específico de tejido tal como uno que oriente a tejido canceroso. Aunque puede ser cualquier promotor que oriente preferiblemente a tejido canceroso frente a tejido no canceroso, en una realización específica, el promotor específico de cáncer es un promotor específico de cáncer de mama, un promotor específico de cáncer de próstata o un promotor específico pancreático, por ejemplo.

En una realización particular, un promotor específico de cáncer de mama comprende una secuencia específica de cáncer de mama y, en realizaciones adicionales, una secuencia potenciadora que aumente la expresión, tal como el nivel de expresión, de la secuencia específica de tejido. En una realización particular, se liga una secuencia promotora potenciadora del promotor de CMV con un segmento específico de cáncer de mama del promotor de topoisomerasa II α ejemplar (topoll α) o el promotor de receptor de transferrina ejemplar. Los inventores muestran en la presente memoria que ambos de estos promotores compuestos activan la expresión génica selectivamente en células de cáncer de mama y poseen una actividad comparable al promotor de CMV. Son útiles para la orientación génica a la diana y para tratar cánceres de mama primario y metastásico con menos toxicidad para los tejidos normales.

En otra realización, la expresión de un polinucleótido terapéutico se regula por un promotor específico de cáncer pancreático. En una realización particular, se utiliza un promotor específico de cáncer pancreático novedoso, tal como aquel designado en la presente memoria como CTP, que comprende el receptor de colecistocinina A mínimo (CCKAR, -726 a +1 nucleótidos) y el elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis de marmota (WPRE). Este constructo genomanipulado tiene una fuerte actividad promotora y demuestra especificidad por células cancerosas pancreáticas *in vitro* e *in vivo*.

En otra realización específica de la presente invención, un promotor específico de cáncer de próstata regula la expresión de un polinucleótido terapéutico. En una realización particular, la invención utiliza un promotor específico de cáncer de próstata novedoso tal como el designado en la presente memoria como ATTP, que comprende el promotor de transcriptasa inversa de telomerasa humana mínimo (hTert), el elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis de marmota (WPRE) y el elemento ARR2 derivado del plásmido ARR2PB, que es sensible a la estimulación por andrógeno. Este constructo genomanipulado tiene una fuerte actividad promotora y demuestra especificidad tanto por células de cáncer de próstata dependientes de andrógeno como independientes de andrógeno *in vitro*. Este promotor puede usarse para activar específicamente la expresión génica de un polinucleótido terapéutico en cáncer de próstata *in vivo*.

En un objeto de la invención, existe un constructo polinucleotídico que comprende una secuencia de control específica de cáncer de mama, comprendiendo dicha secuencia de control una porción seleccionada del promotor de topoisomerasa II α o una porción seleccionada del promotor de receptor de transferrina. En particular, la secuencia de control comprende una porción seleccionada del promotor de topoisomerasa II α , tal como el que comprende la SEQ ID NO: 12. La secuencia de control puede comprender también una porción seleccionada del promotor de receptor de transferrina, tal como el que comprende la SEQ ID NO: 13.

En realizaciones particulares, los constructos de la presente invención comprenden un potenciador, tal como un potenciador de citomegalovirus (CMV), un promotor de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) o el promotor de β -actina. El constructo puede comprender adicionalmente una secuencia reguladora postranscripcional tal como, por ejemplo, el elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis de marmota (WPRE). En realizaciones adicionales, un constructo de la presente invención comprende una secuencia de amplificación transcripcional de dos etapas (TSTA), en la que la secuencia de TSTA incluye un dominio de unión a ADN tal como Gall, Gal4 o LexA, y un dominio de activación tal como VP2 o VP16, por ejemplo. En aspectos particulares de la invención, la secuencia de TSTA es GAL4-VP2 o GAL4-VP16, por ejemplo.

En otras realizaciones particulares, la secuencia de control está ligada operativamente con un polinucleótido que codifica un producto génico terapéutico, tal como aquel que es un inhibidor de la proliferación celular, un regulador de la muerte celular programada o un supresor tumoral, o uno que engloba dos o más de estas actividades. Los constructos de la presente invención pueden estar comprendidos en un liposoma.

En otro objeto de la invención, un constructo polinucleotídico comprende una secuencia de control específica de cáncer de próstata que comprende al menos dos de las siguientes secuencias: una secuencia de control específica de tejido de próstata, una secuencia de control específica de cáncer y una secuencia de amplificación transcripcional en dos etapas (TSTA), incluyendo dicha secuencia de TSTA un dominio de unión a ADN y un dominio de activación. En realizaciones particulares, la secuencia de control específica de tejido de próstata comprende la SEQ ID NO: 17.

En otras realizaciones particulares, la secuencia de control específica de cáncer comprende la SEQ ID NO: 18. De nuevo, el dominio de unión a ADN de la secuencia de TSTA puede ser Gall, Gal4 o LexA, y el dominio de activación puede ser VP2 o VP16. En particular, la secuencia de TSTA es GAL4-VP2 o GAL4-VP16.

5 En un aspecto específico de la invención, un constructo polinucleotídico que comprende una secuencia de control específica de cáncer de próstata comprende adicionalmente una secuencia reguladora postranscripcional tal como una secuencia de elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis de marmota (WPRE). La secuencia de control está ligada operativamente con un polinucleótido que codifica un producto génico terapéutico, en algunas realizaciones, tal como un inhibidor de la proliferación celular, un regulador de la muerte celular programada o un supresor tumoral o uno que engloba dos o más de estas actividades. El constructo polinucleotídico que comprende
10 una secuencia de control específica de cáncer puede estar comprendido en un liposoma.

En un objeto adicional de la invención, existe un constructo polinucleotídico que comprende una secuencia de control específica de cáncer pancreático que comprende: una secuencia de control específica de tejido pancreático tal como, por ejemplo, la que comprende la SEQ ID NO: 14, y una secuencia de amplificación transcripcional en dos etapas (TSTA), incluyendo dicha secuencia de TSTA un dominio de unión a ADN y un dominio de activación. En el
15 constructo polinucleotídico que comprende una secuencia de control específica de cáncer pancreático, el dominio de unión a ADN de la TSTA puede ser Gall, Gal4 o LexA, y el dominio de activación de la TSTA puede ser VP2 o VP16. En particular, la secuencia de TSTA es GAL4-VP2 o GAL4-VP16.

En particular, el constructo puede comprender una secuencia reguladora postranscripcional, tal como el elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis de marmota (WPRE). La secuencia de control puede estar
20 ligada operativamente con un polinucleótido que codifica un producto génico terapéutico, tal como aquel que es un inhibidor de la proliferación celular, un regulador de la muerte celular programada o un supresor tumoral, o aquel que engloba una o más de estas actividades. El constructo puede estar comprendido en un liposoma.

En un objeto adicional de la invención, existe un procedimiento de inhibición de la proliferación de células de cáncer de mama que comprende poner en contacto una célula de cáncer de mama con una cantidad eficaz de un
25 constructo polinucleotídico que comprende una porción seleccionada del promotor de topoisomerasa II α o una porción seleccionada del receptor de transferrina, en el que la porción seleccionada puede estar ligada operativamente con un polinucleótido que codifica un producto génico eficaz para inhibir la proliferación celular. La porción seleccionada de promotor de topoisomerasa II α puede comprender, por ejemplo, la SEQ ID NO: 12. La porción seleccionada del receptor de transferrina puede comprender la SEQ ID NO: 13, por ejemplo. En aspectos
30 particulares de la invención, el constructo comprende adicionalmente un potenciador tal como de CMV, promotor de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPD) o promotor de β -actina.

En otro objeto de la invención, existe un procedimiento de inhibición de la proliferación de células de cáncer de próstata que comprende poner en contacto una célula de cáncer de próstata con una cantidad eficaz de un
35 constructo polinucleotídico que tenga al menos dos de las siguientes secuencias: una secuencia de control específica de células de próstata, una secuencia de amplificación transcripcional en dos etapas y una secuencia específica de células cancerosas, en el que las secuencias están ligadas operativamente con un polinucleótido que codifica un producto génico eficaz para inhibir la proliferación de células de cáncer de próstata. El constructo puede comprender adicionalmente una secuencia de control postranscripcional ligada operativamente con el polinucleótido que codifica un producto génico eficaz para inhibir la proliferación de células de cáncer de próstata, tal como una
40 secuencia de WPRE, por ejemplo.

En un objeto adicional de la invención, existe un procedimiento de inhibición de la proliferación de células de cáncer pancreático que comprende poner en contacto una célula de cáncer pancreático con una cantidad eficaz de un
45 constructo polinucleotídico que comprenda una secuencia específica de células pancreáticas y una secuencia de amplificación en dos etapas, estando ambas ligadas operativamente con un polinucleótido que codifica un producto génico eficaz para inhibir la proliferación celular. El constructo puede comprender adicionalmente una secuencia de control postranscripcional ligada operativamente con el polinucleótido que codifica un producto génico eficaz para inhibir la proliferación celular, tal como una secuencia de WPRE, por ejemplo.

En un objeto adicional de la invención, existe un procedimiento de tratamiento de cáncer de mama en un individuo que tiene el cáncer que comprende poner en contacto al menos una célula de cáncer de mama del individuo con una
50 cantidad terapéuticamente eficaz de un constructo polinucleotídico que comprenda una porción seleccionada del promotor de topoisomerasa II α o una porción seleccionada del receptor de transferrina, en el que la porción seleccionada está ligada operativamente con un polinucleótido que codifica un producto génico eficaz para tratar el cáncer de mama. El constructo puede comprender una porción seleccionada del promotor de topoisomerasa II α que es aquel que comprende la SEQ ID NO: 12. El constructo puede comprender también una porción seleccionada del
55 promotor de receptor de transferrina, tal como aquel que comprende la SEQ ID NO: 13. El constructo puede comprender adicionalmente un potenciador, tal como un potenciador de CMV, y el polinucleótido puede estar comprendido en un liposoma.

En otro objeto de la presente invención, existe un procedimiento de tratamiento de cáncer de próstata en un individuo que tiene el cáncer que comprende poner en contacto al menos una célula de cáncer de próstata del

individuo con una cantidad terapéuticamente eficaz de un constructo polinucleotídico que comprenda al menos dos de las siguientes: una secuencia de control específica de células de próstata, una secuencia de control específica de células cancerosas y una secuencia de amplificación transcripcional en dos etapas, en el que las secuencias están ligadas operativamente con un polinucleótido que codifica un producto génico eficaz para tratar cáncer de próstata.

5 El constructo polinucleotídico puede comprender adicionalmente una secuencia de control postranscripcional tal como una secuencia de WPRE, y el polinucleótido puede estar comprendido en un liposoma.

En un objeto adicional de la invención, existe un procedimiento de tratamiento de cáncer pancreático en un individuo que tiene el cáncer que comprende poner en contacto al menos una célula de cáncer pancreático del individuo con una cantidad terapéuticamente eficaz de un constructo polinucleotídico que comprenda una secuencia de control específica de células pancreáticas y una secuencia de amplificación transcripcional en dos etapas, estando ambas ligadas operativamente con un polinucleótido que codifica un producto génico eficaz para tratar cáncer pancreático.

10 El constructo puede comprender adicionalmente una secuencia de control postranscripcional tal como una secuencia de WPRE. El polinucleótido puede estar comprendido en un liposoma.

Lo anterior ha esbozado bastante ampliamente los rasgos y ventajas técnicas de la presente invención para que la descripción detallada de la invención siguiente pueda entenderse mejor. Se describirán de aquí en adelante los rasgos y ventajas adicionales de la invención que conforman las reivindicaciones en cuestión de la invención. Debería apreciarse por los especialistas en la materia que la concepción y realización específica dadas a conocer pueden utilizarse fácilmente como base para modificar o diseñar otras estructuras para llevar a cabo los mismos fines de la presente invención. Debería considerarse también por los especialistas en la materia que dichas construcciones equivalentes no se apartan del espíritu y alcance de la invención como se expone en las reivindicaciones adjuntas. Los rasgos novedosos que se creen característicos de la invención, tanto en cuanto a su organización como procedimiento operativo, junto con los objetos y ventajas adicionales, se entenderán mejor a partir de la siguiente descripción cuando se consideren en conexión con las figuras adjuntas. Sin embargo, ha de entenderse expresamente que cada una de las figuras se proporciona solo con fines de ilustración y descripción y no se pretende como definición de los límites de la presente invención.

15
20
25

Breve descripción de los dibujos

Para una comprensión más completa de la presente invención, se hace ahora referencia a las siguientes descripciones tomadas en conjunto con los dibujos acompañantes.

La FIG. 1 muestra la actividad del promotor de topoisomerasa II α completo (FL) con el ensayo informador de luciferasa en líneas celulares que incluyen células de epitelio de mama normales (184A1), células hepáticas normales (hígado de Chang), fibroblastos (WI38), células de cáncer de pulmón (A549), de cáncer pancreático (CAPAN-1), de cáncer de ovario (iP-1) y de cáncer de mama (MD-MBA-231, MD-MBA-468, MD-MBA-453, SKBR3, T47D, MCF-7).

30

La FIG. 2 demuestra la actividad del promotor de topoisomerasa II α completo (FL) con el ensayo informador de luciferasa en las líneas celulares descritas en la FIG. 10.

35

La FIG. 3 muestra la expresión de luciferasa *in vitro* entre CT572 y CT90 en diferentes líneas celulares mediante transfección transitoria, % significa en comparación con la actividad luciferasa del vector CMV-PGL3 en una línea celular individual.

La FIG. 4 demuestra la actividad del promotor CT90 respecto al promotor de CMV (CT90/CMV) en tejidos de ratones portadores de tumores MDA-MB-231. Se determinó la actividad promotora en cada tejido en el ensayo informador de luciferasa como se describe en el texto.

40

La FIG. 5 muestra el ensayo de eliminación *in vitro* de CT90-BikDD y CMV-BikDD en diferentes líneas celulares. El valor del eje Y indica el porcentaje de células vivas después del tratamiento.

La FIG. 6 muestra el efecto antitumoral *in vivo* de la terapia génica con CT90-BikDD. Se inoculó la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231 a $2,5 \times 10^6$ por ratón y se trataron los ratones una vez por semana con CT0-BikDD complejado con liposoma, CMV-BikDD, vector vacío pGL3 y tampón de dextrosa D5W como control sin tratamiento. Se midió el tamaño del tumor (valor del eje Y) dos veces por semana durante el tratamiento y se mostró en la figura. El eje X indica las fechas de tratamiento.

45

La FIG. 7 muestra las actividades promotoras de mutantes de delección de TR normalizadas por la actividad del promotor de CMV en cada línea celular. El porcentaje en el eje Y indica la relación de promotores T β R frente al promotor de CMV en líneas celulares individuales.

50

La FIG. 8 muestra la actividad del promotor CTR116 normalizada por la actividad del promotor de CMV en líneas celulares de cáncer de mama en condiciones normóxicas e hipóxicas. El porcentaje del eje Y indicaba la relación de actividad del promotor T β R116 frente a CMV.

Las FIG. 9A y 9B ilustran constructos de promotores específicos pancreáticos (FIG. 9A) y sus ensayos de luciferasa respectivos (FIG. 9B). Los datos representan la media de cuatro experimentos independientes; barra, DE.

5 La FIG. 10A ilustra un diagrama esquemático de constructos basados en CCKAR y basados en CMV que contienen el gen informador de luciferasa de luciérnaga bajo el control del promotor CCKAR mínimo con o sin WPRE, o de CCKAR/TSTA con o sin WPRE, o bajo el potenciador/promotor de CMV. La Fig. 10B demuestra la actividad de constructos transfectados transitoriamente en células de cáncer pancreático AsPC-1 y PANC-1. La FIG. 10C muestra la especificidad de tejido de los promotores combinados basados en CCKAR. Los datos representan la media de cuatro experimentos independientes; barra, DE.

10 La FIG. 11 muestra la expresión transgénica *in vivo* en el modelo de tumor ortotópico de células AsPC después del suministro sistémico de ADN del plásmido CTP-Luc y CMV-Luc. La FIG. 11A muestra la formación de imágenes *in vivo* de ratones. Se muestra la formación de imágenes representativas de ratones. La FIG. 11B muestra la actividad luciferasa de luciérnaga en extractos de tejido, que se cuantificó con un luminómetro y se expresó como unidades relativas de luciferasa por miligramos de proteína total. Se calculó la relación comparando el nivel de actividad luciferasa de ratones CTP con ratones CMV.

15 La FIG. 12 demuestra la comparación de actividad luciferasa de luciérnaga bajo el control del potenciador/promotor de CMV o promotores combinados basados en hTERTp. Los constructos de plásmido informador de luciferasa de luciérnaga que comprenden un potenciador/promotor de CMV o hTERTp con o sin WPRE, o hTERTp/TSTA con o sin WPRE, se ensayaron en células LNCaP (FIG. 12A), células de cáncer de próstata PC-3 (FIG. 12B) o células WI38 (FIG. 12C). Los datos representan la media de cuatro experimentos independientes; barra, DE.

20 La FIG. 13 muestra la actividad aumentada del promotor combinado basado en hTERTp sensible a andrógeno. La FIG. 13A muestra que se dispuso un elemento ARR2 sensible a andrógeno corriente arriba 5' de hTERT del combinado hTERTp-TSTA-Luc o hTERTp-TSTALuc-WPRE. Luc activada por ARR2PB era el control. La FIG. 13B demuestra la actividad de compuestos basados en hTERTp en células de cáncer de próstata. Los datos representan medias de cuatro experimentos independientes; barra, DE.

25 La FIG. 14 proporciona que el promotor CT90 activa la expresión de BikDD a un nivel comparable al del promotor de CMV. Las células MCF7 se transfectaron con CMV-BikDD y CT90-BikDD mediante el procedimiento de electroporación. Después de 24 horas, se recogieron las células de cada experimento y se lisaron para transferencia Western.

30 La FIG. 15 muestra el crecimiento tumoral durante el tratamiento con terapia génica. Los ratones portadores de xenoinjertos de cáncer de mama MDA-MB-231 (15A) o MDA-MB-468 (15B) recibieron tratamiento con 15 µg de lipoplejo de CT90-BikDD, CMV-BikDD, vector vacío pGL3, o dextrosa al 5% en agua mediante inyección intravenosa. Cada grupo de tratamiento tenía 10 ratones. Se trataron los ratones una vez por semana (QW) durante 8 semanas, y se midió el tamaño tumoral dos veces por semana.

35 La FIG. 16 proporciona los registros de supervivencia de ratones portadores de tumor de mama MDA-MB-231. Se detuvo el tratamiento la 8ª semana y se mantuvieron vivos los ratones hasta alcanzar el estado patológico definido por los reglamentos institucionales. Se registró el número de supervivientes para cada semana y se muestra en el panel superior. Se muestran el tiempo medio de supervivencia y la significación estadística a partir del análisis de Kaplan-Meier y la prueba del orden logarítmico en el panel inferior. N.S.: no significativo.

40 La FIG. 17 demuestra la expresión selectiva de Bik dirigida por CT90-BikDD en células de cáncer de mama *in vivo*. Se inyectó el lipoplejo CT90-BikDD o CMV-BikDD en ratones portadores del xenoinjerto de cáncer de mama MDA-MB-468. Se sacrificaron los ratones 72 horas después de la inyección, se extirparon tumor y corazón y se fijaron. Se efectuó la hibridación *in situ* en secciones de tejido para detectar la expresión de ARNm de BikDD como se describe en los Materiales y procedimientos. Se muestran portaobjetos representativos de corazón y tumor. En la FIG. 17A, se muestra la expresión de BikDD en tejidos cardíacos de ratones tratados con CMV-BikDD y CT90-BikDD (paneles izquierdo y derecho, respectivamente). Se tiñeron las muestras de los paneles superiores con sondas de BikDD anticodificante, y el color marrón oscuro indicó señales positivas. Los paneles inferiores mostraron los experimentos de control negativo teñidos con sondas de BikDD codificante. En la Fig. 17B, se muestra la expresión de BikDD en tejidos tumorales de ratones tratados con CMV-BikDD y CT90-BikDD (paneles izquierdo y derecho, respectivamente). Se tiñeron las muestras de los paneles superiores con sondas de BikDD anticodificante y las flechas indican las células positivas. Los paneles inferiores mostraban los experimentos de control negativo teñidos con sondas de BikDD codificante. En la Fig. 17C, el promotor CT90 activa la expresión de BikDD a un nivel comparable al del promotor de CMV. Las células MCF7 se transfectaron con CMV-BikDD y CT90-BikDD mediante el procedimiento de electroporación. Después de 24 horas, se recogieron las células de cada experimento y se lisaron para transferencia Western.

55 La FIG. 18 muestra que el promotor de receptor de colecistocinina humana de tipo A (CCKAR) es potencialmente específico de cáncer pancreático. En la FIG. 18A, se muestran constructos de candidatos a promotor específico de cáncer pancreático. Se amplificaron por reacción en cadena de la polimerasa CCKAR, receptor acoplado a proteína G huérfano (RDC1), receptor de activador de plasminógeno de tipo urocinasa (uPAR) y quimotripsinógeno B1

(CTRB1) y se subclonaron en el plásmido informador pGL3-básico, que activa un gen de luciferasa de luciérnaga. En la FIG. 18B, se cotransfectaron transitoriamente células PANC-1 y AsPC-1 con ADN del plásmido indicado y pRL-TK. 48 horas después, se midió la relación de luciferasa dual y se mostró como unidades lumínicas relativas (ULR) normalizadas por el control de luciferasa de *Renilla*. Los datos representan la media de cuatro experimentos independientes. Barra, DE.

La FIG. 19 demuestra que los promotores basados en colecistocinina de tipo A (CCKAR) genomanipulados son más activos y retienen la especificidad de cáncer pancreático. En la FIG. 19A, se muestra un diagrama esquemático de constructos basados en CCKAR genomanipulados que incluyen pGL3-CCKAR-Luc-WPRE (CCKAR-P-Luc), pGL3-CCKAR-TSTA-Luc (CCKAR-T-Luc) y pGL3-CCKAR-TSTA-Luc-WPRE (CTP-Luc). En la FIG. 19B, se muestra la actividad de los promotores basados en CCKAR en células de cáncer pancreático. Se cotransfectaron transitoriamente células AsPC-1, PANC-1 y PanO2 con ADN de plásmido y pRL-TK. 48 horas después, se midió la relación de luciferasa dual. Se muestra el porcentaje respecto a la actividad del promotor de CMV. Los datos representan la media de cuatro experimentos independientes. En la FIG. 19C, se muestra la especificidad de tejido de promotores combinados basados en CCKAR. Se cotransfectaron transitoriamente líneas celulares de cáncer no pancreático (LNCaP, PC-3, SKOV3.ip1, MDA-MB-468 y HeLa) y normales e inmortalizadas (WI-38, 184A1 y E6E7) con los plásmidos indicados y pRL-TK. 48 horas después, se midió la relación de luciferasa dual. Se muestra el porcentaje respecto a la actividad en células AsPC-1. Los datos representan la media de cuatro experimentos independientes. ULR, unidades lumínicas relativas.

La FIG. 20 muestra que el combinado de receptor de colecistocinina de tipo A (CCKAR)-activador transcripcional en dos etapas (TSTA)-elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis de marmota (WPRE), CTP, es robusto y específico de cáncer pancreático en un modelo animal ortotópico. Se administraron a ratones atímicos portadores de tumores AsPC-1 ortotópicos 50 µg de ADN en complejos de ADN:liposoma por la vena de la cola una vez al día durante 3 días consecutivos. En la FIG. 20A, se muestra la formación de imágenes *in vivo* de ratones. Se anestesiaron los ratones y se formaron imágenes durante 5 min usando un sistema de formación de imágenes IVIS 10 minutos después de la inyección intraperitoneal de D-luciferina. En la FIG. 20B, se muestra la distribución en tejido de la expresión de luciferasa. Se diseccionaron los especímenes de tejido de tumores y órganos como se muestra y se midió la actividad luciferasa con un luminómetro. Se expresaron los datos como unidades relativas de luciferasa por miligramo de proteína total. CMV, pGL3-CMV-Luc; CTP, pGL3-CTP-Luc; barra, DE; ULR, unidades lumínicas relativas; n=4 ratones por cada grupo.

La FIG. 21 proporciona la expresión de Bik mutante (BikDD) activada por CTP que elimina las células de cáncer pancreático eficaz y específicamente. En la FIG. 21A, se muestra un diagrama esquemático de constructos de expresión con la cadena principal de pUK21. CMV-BikDD, pUK21-CMV-BikDD; CTP-BikDD, pUK21-CTP-BikDD. En la FIG. 21B, se proporcionan los efectos eliminadores de BikDD activado por CMV o CTP. Se cotransfectaron un panel de células de cáncer pancreático (AsPC-1, PANC-1, MDA-Panc28 y PanO2) y células E6E7 epiteliales pancreáticas humanas inmortalizadas con 2 µg de pUK21 (control negativo), pUK21-CMV-BikDD (control positivo) o pUK21-CTP-BikDD, más 100 ng de pGL3-CMV-Luc. 48 horas después de la transfección, se formaron imágenes de la actividad luciferasa durante 2 min usando un sistema de formación de imágenes IVIS después de 5 minutos de incubación con D-luciferina 5 ng/ml. Se mostraron las imágenes representativas en el panel superior. Se calculó el porcentaje de señal en comparación con el control negativo (fijado en 100%) (panel inferior). Los datos representan la media de tres experimentos independientes. 1, pUK21; 2, CMV-BikDD; 3, CTP-BikDD; barra, DE.

La FIG. 22 muestra una comparación de la actividad luciferasa de luciérnaga bajo el control del promotor de CMV y el promotor combinado basado en hTERTp. En la FIG. 22A, se muestra un diagrama esquemático de constructos informadores. En la FIG. 22B, se cotransfectaron transitoriamente líneas celulares de cáncer de próstata LNCaP y PC-3 y de fibroblastos humanos normales WI-38 con ADN de plásmido informador y el vector de control interno pRL-TK. 48 horas después, se midió la relación de luciferasa dual. Se muestran las actividades luciferasa (en veces) con respecto a la del promotor de CMV (fijada en 1).

La FIG. 23 demuestra que un elemento ARR2 de acción en cis refuerza adicionalmente el hTERTp modificado con TSTA y/o WPRE en respuesta a la estimulación con andrógeno. En la FIG. 23A, se muestra un diagrama esquemático de constructos informadores. En la FIG. 23B, se cotransfectaron transitoriamente células con ADN de plásmido informador y el vector de control interno pRL-TK. 48 horas después de la incubación con R1881, se midió la relación de luciferasa dual. Se muestran las actividades luciferasa (en veces) con respecto a la del promotor de CMV (fijada en 1).

La FIG. 24 demuestra la expresión de luciferasa *in vivo* en xenoinjertos de LNCaP y PC-3 después del suministro sistémico de ADN de plásmido. Se inyectaron por vía i.v. en ratones atímicos portadores de tumores LNCaP s.c. complejos de ADN (CMV-Luc o ATTP-Luc):liposoma. Se anestesiaron los ratones y se formaron imágenes durante 2 min con un sistema de formación de imágenes IVIS™ después de la inyección i.p. de D-luciferina. Las imágenes mostradas son de 24 h después de la última inyección. En la FIG. 24A, se diseccionaron inmediatamente entonces los ratones y se tomaron imágenes *ex vivo* durante 2 min. En la FIG. 24B, se formaron inmediatamente imágenes de los tumores diseccionados durante 10 min (FIG. 24C). En la FIG. 24D, se formaron imágenes de tumores PC-3 *ex vivo* (como C) después del suministro sistémico de ADN del plásmido CMV-Luc o ATTP-Luc a ratones portadores de tumor PC-3. Se presentó la señal cuantitativa (derecha). En la FIG. 24E, se muestra la biodistribución *in vivo* de la

expresión de luciferasa en el modelo de tumor LNCaP. Se diseccionaron los especímenes de tejido de tumor y órganos como se muestra y se midió la actividad luciferasa con un luminómetro.

La FIG. 25 muestra que las ICB median la señalización específica de cáncer de mama. En la FIG. 25A, el mutante Cdk2 negativo dominante (Cdk2-dn) bloqueaba la actividad del promotor topolla en células de cáncer de mama. Se cotransfectó el vector de control o vector de expresión Cdk2-dn en células con el vector informador topolla-pGL3, y se efectuó entonces el ensayo de luciferasa para determinar la actividad del promotor topolla. Se mostró la relación de actividad del promotor topolla en el grupo de Cdk2-dn respecto a la del grupo de control. Las líneas celulares usadas se describen anteriormente. BC, células de cáncer de mama. En la FIG. 25B, la ciclina A activa el promotor topolla en células de cáncer de mama. Se cotransfectó el vector de control o de expresión de ciclina A (CCNA) en células SKBR3 con el vector informador topolla-pGL3 y se efectuó entonces el ensayo de luciferasa para determinar la actividad del promotor topolla. Se muestra la relación de actividad del promotor topolla en el grupo de Cdk2-dn respecto a la del grupo de control. En la FIG. 25C, se muestra el diseño de los mutantes de delección del promotor topolla (-572, -182, -90, -60) y el promotor topolla mutado en ICB1 (mICB1). X dentro de un círculo, la mutación en el sitio de ICB1. En la FIG. 25D, la ICB1 puede mediar la activación del promotor topolla mediante la señal ciclina A/cdk2 en células de cáncer de mama. Panel izquierdo. Se cotransfectaron los mutantes de delección del promotor topolla con el vector de expresión de ciclina A o el vector de control en varias líneas celulares, y se determinó su actividad mediante el ensayo de luciferasa. Se muestra la relación de la actividad promotora en el grupo de ciclina A con respecto a la del grupo de control (CCNA/Ctrl). Panel derecho. Se mutó el sitio de ICB1 del promotor topolla como se describe en los Materiales y procedimientos. Se cotransfectó el promotor mutado en ICB1 (mICB1-T2A) con el vector de expresión de ciclina A o el vector de control en diversas líneas celulares y se determinó la activación como se describe anteriormente. En la FIG. 25E, el mutante de delección -90 del promotor topolla retiene actividad específica de cáncer de mama. Panel superior. Se transfectó T2A90-pGL3 en líneas celulares y se determinó su actividad promotora usando el ensayo de luciferasa dual. BE, células epiteliales de mama normales; BC, células de cáncer de mama; LF fibroblastos pulmonares normales; HC, hepatocitos normales; PC, células de cáncer pancreático; OC, células de cáncer de ovario. Panel inferior. Actividad del promotor T2A-90 respecto a la del promotor de CMV en diversas líneas celulares. Se calculó la relación de actividad del promotor T2A-90 a CMV (topolla/CMV) en cada línea celular como se describe en la FIG. 25B.

La FIG. 26 demuestra que la secuencia potenciadora promotora de CMV potencia la actividad del promotor topolla -90 específicamente en células de cáncer de mama. En la FIG. 26A, se proporciona el diseño de CT572, CT182 y CT90. Se amplificó por PCR la secuencia potenciadora promotora de CMV a partir del vector pCDNA3.1 y se clonó en dirección 5' de los promotores topolla, -182, o -90 en un constructo informador pGL3, formando los promotores de fusión CT572, CT182 y CT90, respectivamente. En la FIG. 26B, se muestra la actividad de CT572, CT182 y CT90 en líneas celulares. Se determinó la actividad promotora en cada línea celular como se describe anteriormente. La FIG. 26C muestra la actividad de CT572, CT182 y CT90 respecto al promotor de CMV en líneas celulares. Se determinaron las relaciones de actividad de los promotores CT572 a CMV (CT572/CMV), CT182 a CMV (CT182/CMV) y CT90 a CMV (CT90/CMV) en cada línea celular como se describe anteriormente. La FIG. 26D muestra la actividad de CT90 *in vivo* en el modelo de ratón de xenoinjerto de cáncer de mama ortotópico MDA-MB-231. Se inyectaron constructos informadores de luciferasa complejados con liposoma controlados por el promotor CT90 (CT90-luc) o de CMV (CMV-luc) en ratones portadores de tumor por inyección en la vena de la cola. Se sacrificaron los ratones para extirpar el tumor y los órganos principales 48 horas después de la inyección. Panel superior. Valores absolutos de actividad luciferasa de promotores de CMV y CT90 en tumor y órganos normales. Panel inferior. Relación de actividad del promotor CT90 al promotor de CMV (CT90/CMV). Se calcularon todos los valores como se describe anteriormente en la FIG. 25B. La FIG. 26E muestra la actividad de CT90 en ratones con xenoinjerto de cáncer de mama MDA-MB-231 mediante inyección intratumoral. Se inyectó el constructo CT90-luc o CMV-luc complejado con liposoma de DOTAP:col en tumores MDA-MB-231 en ratones. Se sacrificaron los ratones para extirpar el tumor y los órganos principales 48 horas después de la inyección. Panel izquierdo. Valores absolutos de actividad luciferasa por los promotores de CMV y CT90 en tumor y órganos normales. Panel derecho. Relación de actividad de promotor CT90 a promotor de CMV (CT90/CMV). Se calcularon todos los valores como se describe anteriormente en la FIG. 25B.

50 Descripción detallada de la invención

Como se usa en la presente memoria, los términos “un” o “una” pueden significar uno o más. Como se usa en la presente memoria en las reivindicaciones, cuando se usan junto con la palabra “comprende”, las palabras “un” o “una” pueden significar uno o más de uno. Como se usa en la presente memoria, “otro” puede significar al menos un segundo o más. En realizaciones específicas, los aspectos de la invención pueden “consistir esencialmente en” una o más secuencias de la invención, por ejemplo.

En algunas realizaciones, se suministra un polinucleótido que comprende las secuencias de control de la invención, por ejemplo, mediante un sistema de suministro vírico o no vírico a un animal receptor apropiado para suprimir el crecimiento y desarrollo tumorales. En una realización ejemplar de la presente invención, el producto génico terapéutico suministrado actúa mediante un mecanismo apoptótico suprimiendo el crecimiento y desarrollo tumorales.

En un aspecto de la invención, se administra el polipéptido terapéutico comprendido en un constructo que incluye una secuencia de control específica de tejido en forma de polinucleótido orientado para expresión en cáncer de mama, cáncer pancreático o cáncer de próstata, por ejemplo. En ciertos aspectos de la invención, un promotor específico de cáncer de mama controla la expresión del polinucleótido terapéutico. Como se usa en la presente memoria, el término “polinucleótido terapéutico” designa un polinucleótido que codifica un producto génico terapéutico, que puede ser un ARN, proteína, polipéptido o péptido, por ejemplo.

En una realización específica, las secuencias de control de la presente invención comprenden un promotor combinado (quimérico). Por ejemplo, pueden utilizarse promotores específicos de cáncer de mama que comprenden una secuencia potenciadora promotora de CMV ligada con segmentos específicos de cáncer de mama del promotor de topoisomerasa II α (denominado CT90) o del promotor de receptor de transferrina (denominado CTR116). Ambos promotores quiméricos activan la expresión génica selectivamente en células de cáncer de mama y poseen niveles de actividad comparables con el promotor de CMV. Se usan constructos que emplean los promotores quiméricos CT90 o CTR116 en la transferencia génica para orientarse a y tratar cánceres de mama primarios y metastáticos con menos toxicidad para los tejidos normales, preferiblemente eliminando selectivamente las células de cáncer de mama y/o reduciendo significativamente el crecimiento y/o velocidad de crecimiento tumoral de mama.

En otros aspectos de la invención, un promotor específico de cáncer de próstata o específico de cáncer pancreático controla la expresión de un polinucleótido terapéutico. En una realización particular de la invención, existe un combinado específico de cáncer de próstata o específico de cáncer pancreático. Por ejemplo, el promotor específico de cáncer de próstata puede comprender una secuencia de control ARR2, mientras que el promotor específico de cáncer pancreático puede comprender una secuencia de control CCKAR.

Cualquier promotor o secuencia de control utilizado para regular la expresión de un polinucleótido terapéutico puede utilizar secuencias reguladoras específicas que potencian la expresión y/o procesos postranscripcionales, por ejemplo. Las secuencias particulares, pero ejemplares, incluyen potenciadores, un sistema de amplificación transcripcional en dos etapas, elementos que regulan la poliadenilación de ARN, la semivida y demás, tales como WPRE y/u otros en la materia.

En otras realizaciones de la presente invención, existen procedimientos de prevención del crecimiento de una célula en un individuo que comprenden administrar al individuo un constructo de la presente invención. En realizaciones específicas, el constructo se administra en un liposoma y/o el producto génico terapéutico puede comprender adicionalmente un dominio de transducción de proteína (Schwarze *et al.*, 1999), tal como Tat de VIH o penetratina, por ejemplo. El polinucleótido terapéutico puede administrarse en un vector tal como un plásmido, vector retroviral, vector adenoviral, vector vírico adenoasociado, liposoma o una combinación de los mismos, por ejemplo.

I. Sistemas de expresión basados en ácidos nucleicos

La presente invención utiliza, en algunas realizaciones, sistemas para expresar polinucleótidos terapéuticos, particularmente para el tratamiento del cáncer. Los aspectos ejemplares particulares de estos polinucleótidos se describen en la presente memoria.

A. Vectores

El término “vector” se usa para designar una molécula de ácido nucleico portadora en la que puede insertarse una secuencia de ácido nucleico para introducción en una célula, donde puede replicarse. Una secuencia de ácido nucleico puede ser “exógena”, lo que significa que es ajena a la célula en la que se está introduciendo el vector o que la secuencia es homóloga de una secuencia en la célula, pero en una posición en el ácido nucleico hospedador en que la secuencia no se encuentra normalmente. Los vectores incluyen plásmidos, cósmidos, virus (bacteriófagos, virus animales y virus vegetales) y cromosomas artificiales (por ejemplo, YAC). Un especialista en la materia estaría bien equipado para construir un vector mediante técnicas recombinantes estándares, que se describen en Maniatis *et al.*, 1988 y Ausubel *et al.*, 1994, ambos incorporados a la presente memoria por referencia.

El término “vector de expresión” designa un vector que contiene una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos parte de un producto génico capaz de transcripción. En algunos casos, se traducen entonces moléculas de ARN a una proteína, polipéptido o péptido. En otros casos, estas secuencias no se traducen, por ejemplo, en la producción de moléculas anticodificantes o ribozimas. Los vectores de expresión pueden contener una variedad de “secuencias de control”, que designan secuencias de ácido nucleico necesarias para la transcripción, y posiblemente la traducción, de una secuencia codificante ligada operativamente en un organismo hospedador particular. Además de secuencias de control que gobiernan la transcripción y traducción, los vectores y vectores de expresión pueden contener secuencias de ácido nucleico que sirven para otras funciones también y se describen a continuación.

1. Promotores y potenciadores

Un “promotor” es una secuencia de control que es una región de una secuencia de ácido nucleico en la que el inicio y velocidad de transcripción están controlados. En una realización específica, una secuencia de control, tal como un promotor, regula la especificidad de tejido en el que se expresa la secuencia de ácido nucleico. Un promotor, o secuencia de control, puede comprender elementos genéticos a los que pueden unirse proteínas y moléculas

reguladoras, tales como ARN polimerasa y otros factores de transcripción. Las frases “situado operativamente”, “ligado operativamente”, “bajo control” y “bajo control transcripcional” significan que un promotor u otra secuencia de control está en una localización y/o orientación funcional correcta con respecto a una secuencia de ácido nucleico para controlar el inicio transcripcional y/o la expresión de esa secuencia. Un promotor puede usarse o no junto con un “potenciador”, que designa una secuencia reguladora de acción en cis implicada en la activación transcripcional de una secuencia de ácido nucleico.

El promotor puede ser uno asociado naturalmente con un gen o secuencia, como puede obtenerse aislando las secuencias no codificantes 5' localizadas en dirección 5' del segmento de codificación y/o exón. Dicho promotor puede designarse como “endógeno”. De forma similar, un potenciador puede ser uno asociado naturalmente con una secuencia de ácido nucleico localizada en dirección 5' o 3' de esa secuencia. Como alternativa, se conseguirán ciertas ventajas al situar el segmento de ácido nucleico codificante bajo el control de un promotor recombinante o heterólogo, que designa un promotor que no está asociado normalmente con una secuencia de ácido nucleico en su entorno natural. Un potenciador recombinante o heterólogo designa también un potenciador no asociado normalmente con una secuencia de ácido nucleico en su entorno natural. Dichos promotores o potenciadores pueden incluir promotores o potenciadores de otros genes, y promotores o potenciadores aislados de cualquier otra célula procariótica, vírica o eucariótica, y promotores o potenciadores “de origen no natural”, concretamente, que contienen diferentes elementos de diferentes regiones reguladoras transcripcionales y/o mutaciones que alteran la expresión. Además de producirse sintéticamente las secuencias de ácido nucleico de promotores y potenciadores, las secuencias pueden producirse usando clonación recombinante y/o tecnología de amplificación de ácido nucleico, incluyendo PCR™, con respecto a las composiciones dadas a conocer en la presente memoria (véanse la patente de EE.UU. 4.683.202, patente de EE.UU. 5.928.906, incorporadas cada una a la presente memoria por referencia). Además, se contempla que puedan emplearse también secuencias de control que dirijan la transcripción y/o expresión de secuencias en orgánulos no nucleares tales como mitocondrias, cloroplastos y similares.

Naturalmente, será importante emplear un promotor y/o potenciador que dirija eficazmente la expresión del segmento de ADN en el tipo celular, orgánulo y organismo elegido para expresión. Los especialistas en la materia de la biología molecular conocen generalmente el uso de promotores, potenciadores y combinaciones de tipos celulares para la expresión de proteínas, por ejemplo, véase Sambrook *et al.* (1989), incorporado a la presente memoria por referencia. Los promotores empleados pueden ser constitutivos, específicos de tejido, inducibles y/o útiles en las condiciones apropiadas para dirigir un alto nivel de expresión del segmento de ADN introducido, tal como es ventajoso en la producción a gran escala de proteínas y/o péptidos recombinantes. El promotor puede ser heterólogo o endógeno.

La identidad de los promotores o elementos específicos de tejido, así como los ensayos para caracterizar su actividad, es bien conocida por los especialistas en la materia. Los promotores específicos de tejido utilizados para controlar la orientación de la expresión y/o los niveles de un producto génico terapéutico pueden comprender una secuencia de ácido nucleico de tipo silvestre, una secuencia de ácido nucleico mutante o una secuencia de ácido nucleico sintética, a condición de que la expresión del polinucleótido terapéutico se retenga preferiblemente en uno o más tejidos de interés, en comparación con tejidos que no son la diana deseada. Las secuencias de control, tales como promotores, pueden ser secuencias combinadas en las que múltiples regiones derivan de fuentes diferentes. Las secuencias de control sintéticas pueden definirse adicionalmente como promotores combinados, en los que al menos dos regiones separadas se originan en diferentes promotores endógenos y/o sintéticos aunque ligadas operativamente para controlar la expresión de un polinucleótido terapéutico. En una realización particular, la especificidad de tejido designa la especificidad por tejido canceroso, en contraposición al tejido no canceroso. El término “tejido canceroso” como se usa en la presente memoria designa un tejido que comprende al menos una célula cancerosa.

45 a. Promotor específico de tejido de cáncer de mama

La mayoría de promotores actualmente usados en la terapia génica poseen una actividad fuerte pero no selectiva (por ejemplo, los promotores de CMV y β -actina) tanto en células normales como tumorales. Por tanto, en algunos aspectos de la presente invención, se utiliza en la invención un promotor específico de tejido de mama, tal como para controlar la expresión de un polinucleótido terapéutico, incluyendo una forma mutante de Bik tal como los mutantes BikT33D, BikS35D y BikT33DS35D ejemplares. Estos mutantes de Bik se describen en la presente memoria, pero se proporcionan con más detalle en la solicitud no provisional de patente de EE.UU. 10/816.698 titulada “Efecto antitumoral de Bik mutante” de Mien-Chie Hung, Yan Li y Yong Wen, incorporada por referencia a la presente memoria en su totalidad. En un aspecto particular, el promotor específico de cáncer de mama de la presente invención orienta la expresión de un polinucleótido que codifica un producto génico terapéutico específicamente a tejido de cáncer de mama.

En una realización particular de la presente invención, se emplean promotores combinados que utilizan las secuencias de control específicas de cáncer de mama de topoisomerasa II α (topoll α) y receptor de transferrina (TfR). Los niveles de topoisomerasa II α (topoll α) y receptor de transferrina (TfR) son elevados en cáncer de mama, como se determinan usando análisis de SAGE y una micromatriz de ADNc, por ejemplo. Los presentes inventores identificaron un segmento de 90 pares de bases (SEQ ID NO: 12) y un segmento de 116 pares de bases (SEQ ID NO: 13) en el extremo 5' del promotor topoll α y TfR, respectivamente, como la secuencia de control específica de

cáncer de mama mínima necesaria. Como se describe en los ejemplos de la presente memoria, se potenció la actividad promotora conectando estos dos promotores cortos con una secuencia potenciadora, tal como la secuencia promotora potenciadora de citomegalovirus (CMV) (SEQ ID NO: 11); estos promotores quiméricos se designan en la presente memoria como CT90 y CTR116, respectivamente. El promotor CT90 completo está comprendido en la SEQ ID NO: 23 y el promotor CTR116 completo está comprendido en la SEQ ID NO: 24.

El ensayo informador de CT90 y CTR116 en líneas celulares de cáncer de mama y/o en modelos de xenoinjerto en ratón mostraron que estos dos promotores poseían no solo una fuerte actividad, sino también especificidad por tejido de cáncer de mama y las células del mismo. En realizaciones específicas, la actividad del promotor CTR116 en células se potencia adicionalmente en condiciones hipóxicas, que aparecen habitualmente dentro de tumores sólidos. Para demostrar su uso en la terapia génica del cáncer, los presentes inventores generaron un constructo de ADN usando CT90 para activar la expresión génica apoptótica. Cuando se transfectaba a líneas celulares, este constructo eliminaba selectivamente las células de cáncer de mama. Además, los presentes inventores demostraron que este constructo tenía efecto antitumoral sobre xenoinjertos tumorales de mama en ratón mediante inyección intravenosa con un sistema de suministro no vírico ejemplar. Esto indica que el CT90 puede activar la expresión de un gen terapéutico, tal como Bik mutante, selectivamente en células de cáncer de mama.

Con respecto a la especificidad tumoral, dado que la mayoría de los promotores específicos de cáncer actuales tienen una actividad bastante débil en comparación con el promotor de CMV (por ejemplo, Anderson *et al.*, 2000; Katabi *et al.*, 1999; Lu *et al.*, 2002; Maeda *et al.*, 2001) o una especificidad tumoral insuficiente (por ejemplo, GAPDH potenciado por CMV (Qiao *et al.*, 2002), no son clínicamente útiles. Por el contrario, las actividades de los promotores CT90 y CTR116 inducido por la hipoxia son comparables con el promotor de CMV (de aproximadamente 0,5 a 2 veces), siendo específicas de células de cáncer de mama. Por tanto, la presente invención engloba promotores específicos de cáncer de mama para el control de la expresión de Bik mutante para orientar a células de cáncer de mama para un tratamiento que es menos tóxico o no tóxico para tejidos normales.

b. Promotor específico de tejido de cáncer pancreático

Los promotores específicos de cáncer pancreático son útiles para orientar a células de cáncer pancreático, dejando las células no cancerosas intactas. Los presentes inventores han desarrollado promotores fuertes y específicos de cáncer pancreático para la expresión orientada de polinucleótidos que codifican productos génicos terapéuticos, incluyendo Bik mutantes tales como los mutantes BikT33D, BikS35D y Bik T33DS35D ejemplares. Estos mutantes de Bik se describen en la presente memoria, pero se proporcionan con más detalle en la solicitud de patente provisional de EE.UU. 10/816.698 titulada "Efecto antitumoral de Bik mutante" de Mien-Chie Hung, Yan Li y Yong Wen, incorporada por referencia a la presente memoria en su totalidad.

Sin embargo, los presentes inventores han desarrollado un promotor específico de cáncer pancreático como sigue. Según la bibliografía y la base de datos de Series Analysis of Gene Expression del National Center for Biotechnology Information, los presentes inventores cribaron preliminarmente una serie de promotores que orientan a genes sobreexpresados en cáncer pancreático humano, incluyendo receptor de colecistocinina A (CCKAR), receptor acoplado a proteína G huérfano (RDC1), receptor de activador de plasminógeno de tipo urocinasa (uPAR), carboxipeptidasa A1 (CPA1) y quimotripsinógeno B1 (CTRB1), por ejemplo. Se ensayó en estos el control de la expresión de luciferasa de luciérnaga mediante la actividad luciferasa en células de cáncer pancreático, así como células normales inmortalizadas. Se identificó el promotor CCKAR en el intervalo de nt -726 a + 1 (SEQ ID NO: 14) por tener la actividad y especificidad óptimas entre estos promotores. Sin embargo, la actividad de este promotor CCKAR mínimo era mucho más débil que la del potenciador/promotor de CMV usado habitualmente. Los presentes inventores genomanipularon entonces una serie de combinados basados en el promotor CCKAR usando la proteína de fusión GAL4-VP16 o GAL4-VP2 ejemplar, designado como un sistema de amplificación transcripcional en dos etapas (TSTA) (Iyer *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2002; Sato *et al.*, 2003 y las referencias citadas en los mismos), para aumentar la actividad transcripcional; se utilizó el elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis de marmota (WPRE) (SEQ ID NO:15) para modificar la señal de poliadenilación de ARN, la exportación de ARN y/o la traducción de ARN. Un especialista en la materia reconocerá que el término "sistema de amplificación transcripcional en dos etapas" (TSTA) puede designarse también como "sistema de activación transcripcional en dos etapas (TSTA)" o "enfoque de activación transcripcional recombinante" (Nettelbeck *et al.*, 2000). En un aspecto particular, se utiliza el promotor CCKAR-TSTA-WPRE (CTP), y un ejemplo de dicho promotor combinado está comprendido en la SEQ ID NO: 20. Por tanto, el promotor CTP genomanipulado se emplea para modalidades de tratamiento eficaces para terapia génica de cáncer pancreático.

La actividad del promotor CCKAR aumentó 3,9 veces y 820 veces por WPRE y TSTA, respectivamente. Sorprendentemente, para TSTA y WPRE combinados, la actividad de CCKAR-TSTA-WPRE (CTP) fue de 0,7 veces en células PANC-1 e incluso de 2,8 veces en células AsPC-1 en comparación con el promotor de CMV, reteniendo especificidad por cáncer pancreático rigurosa. Adicionalmente, para determinar si el CTP tenía una alta actividad y especificidad rigurosa *in vivo* después del suministro sistémico, se inyectaron por la vena de la cola en ratones atímicos nu/nu portadores de tumor pancreático subcutáneo (s.c.) u ortotópico (o.t.) de células AsPC-1 una vez al día durante tres días consecutivos complejos de ADN de plásmido CTP-Luc o CMC-Luc-DOTOP:col, y se obtuvieron imágenes bioluminiscentes *in vivo* y *ex vivo* con un sistema de formación de imágenes IVIS™ no invasivo. La formación de imágenes bioluminiscentes mostró gran brillantez en las zonas del tórax (pulmón/corazón) de ratones

inyectados con CMV-Luc, pero casi no se capturaron en ratones inyectados con CTP-Luc. La actividad luciferasa, detectada con un luminómetro, demostró una actividad 1,4 y 2,0 veces mayor en los tumores o.t. y los tumores s.c. respectivamente. La relación de nivel de expresión de luciferasa de CTP a nivel de expresión de luciferasa de CMV es de 0,37, 0,006, 0,04, 0,37, 0,63 y 0,19 en páncreas, pulmón, corazón, hígado, bazo y riñón, respectivamente, en el modelo de o.t., demostrando una especificidad de tejido mejorada. Tomado en conjunto, el promotor CTP genomanipulado supera al potenciador/promotor de CMV en actividad en las células de cáncer pancreático y retiene su especificidad *in vitro* e *in vivo*, proporcionando así modalidades de tratamiento más seguras y eficaces para la terapia génica de cáncer pancreático.

c. Promotor específico de tejido de cáncer de próstata

Los promotores específicos de cáncer de próstata pueden usarse para controlar la expresión de polinucleótidos que codifican productos génicos terapéuticos, incluyendo Bik mutante. Estos mutantes de Bik se describen en la presente memoria, pero se proporcionan con más detalle en la solicitud de patente no provisional de EE.UU. 10/816.698, titulada "Efecto antitumoral de Bik mutante" de Mien-Chie Hung, Yan Li y Yong Wen, incorporada por referencia a la presente memoria en su totalidad. Las actividades de estos promotores son dependientes de andrógeno. Para numerosas etapas de la enfermedad, los pacientes son dependientes de andrógeno (CPDA), permitiendo el uso de vectores sensibles a andrógenos para dirigir la expresión de genes terapéuticos al tejido prostático. Aunque se han desarrollado promotores específicos de próstata robustos sensibles a receptor de andrógeno por los presentes inventores (Xie *et al.*, Cancer Res. 2001) y otros grupos (Zhang *et al.*, Mol. Endocrinol. 2000), estos promotores dependientes de andrógeno pueden ser menos activos después de castración o terapia de ablación androgénica, que son las modalidades principales de tratamiento de cáncer de próstata progresivo. En los pacientes tratados con composiciones que comprendan estos promotores, este tipo de terapia puede fracasar y morir de cáncer de próstata independiente de andrógeno (CPIA) recurrente.

Los inventores han desarrollado promotores novedosos para terapia génica que serán activos tanto en CPDA como CPIA para tratar cáncer de próstata refractario a hormonas metastásico y recurrente. El promotor, designado en la presente memoria como ATTP, comprende al menos una secuencia de control específica de célula de próstata tal como el elemento regulador ARR2 ejemplar (SEQ ID NO: 17) del gen ARR2. El promotor puede comprender también al menos el fragmento promotor mínimo (hTERTp) de la transcriptasa inversa de telomerasa humana (hTERT) (SEQ ID NO: 18) ligado operativamente con un sistema de amplificación transcripcional en dos etapas (TSTA), tal como las secuencias codificantes de proteínas de fusión GAL4-VP16 o GAL4-VP2 ejemplares (dos ejemplos de GAL4-VP2 están comprendidos en las SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 19). El polinucleótido terapéutico puede estar también ligado operativamente con una secuencia de control postranscripcional tal como el elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis de marmota (WPRE) para modificar la señal de poliadenilación del ARN, la exportación de ARN y/o la traducción de ARN. Estas secuencias reguladoras son eficaces tanto en líneas celulares de CPDA como CPIA. Dado que en la mayoría de casos de cánceres de próstata recurrentes el gen AR está amplificado y/o AR está sobreexpresado, este promotor particular mejora en gran medida el índice de eficacia de la realización en la que la actividad de este sistema se estimula por andrógeno. En realizaciones particulares, se utilizan los elementos TSTA-hTERT-ARR2 y WPRE como secuencias de control específicas de cáncer de próstata, que en realizaciones específicas están comprendidos en la SEQ ID NO: 21.

Para la generación de este promotor, se amplificó por PCR el fragmento promotor mínimo (hTERTp) de transcriptasa inversa de telomerasa humana (hTERT) (SEQ ID NO: 18) a partir de extractos de ADN de células LNCaP y se ensayó la actividad en un sistema informador de luciferasa. El hTERTp es activo tanto en células LNCaP como PC-3, pero su actividad era muy débil en comparación con el potenciador/promotor de CMV. Se genomanipuló entonces una serie de combinados basados en el promotor hTERTp usando la proteína de fusión GAL4-VP16 o GAL4-VP2 mediante un sistema de amplificación transcripcional en dos etapas (TSTA) para aumentar la actividad transcripcional y el elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis de marmota (WPRE) para modificar la señal de poliadenilación de ARN, la exportación de ARN y/o la traducción de ARN. La proteína de fusión GAL4-VP2 ejemplar está codificada por un polinucleótido que comprende la SEQ ID NO: 16 o la SEQ ID NO: 19.

El WPRE aumentaba la actividad aproximadamente 2 veces. Sorprendentemente, el sistema TSTA puede reforzar la actividad hasta un 67% de la actividad de CMV en células LNCaP y un 90% en células PC-3. Cuando se utiliza el sistema TSTA en combinación con WPRE, la actividad es comparable a la de CMV en PC-3 y es incluso 1,5 veces mayor en células LNCaP. En contraposición, su actividad permanece oculta en células WI-38 de fibroblasto pulmonar. Esto demostró que el sistema hTERTp-TSTA-WPRE funciona tanto en líneas celulares de CPDA como CPIA. En la mayoría de casos de cánceres de próstata recurrentes, el gen AR está amplificado y/o AR está sobreexpresado. Por lo tanto, en realizaciones específicas mejora en gran medida el índice de eficacia si la actividad de este sistema puede estimularse por andrógeno.

Para lograr este objetivo, se fusionó el elemento ARR2 (SEQ ID NO: 17) derivado del plásmido ARR2PB con el promotor hTERTp de pHERTp-TSTA-Luc y pHERTp-TSTA-Luc-WPRE, produciendo el plásmido pARR2.hTERTp-TSTALuc y pARR2.hTERTp-TSTA-Luc-WPRE (ATTP-Luc). Como se esperaba, aumentó la actividad de los combinados ARR2.hTERTp-TSTA y ARR2.hTERTp-TSTA-WPRE de manera dependiente de andrógeno con el análogo androgénico R1881 10 nm en 15 y 24 veces más, respectivamente, que la de CMV en células LNCaP, sin que hubiera aquí un cambio significativo en las células PC-3.

Por tanto, los presentes inventores han desarrollado un sistema regulador específico de cáncer de próstata novedoso que orientará polinucleótidos que codifican productos génicos terapéuticos no solo a CPDA sino también a CPIA.

2. Señales de inicio y sitios internos de unión al ribosoma

- 5 Puede requerirse también una señal de inicio específica para la traducción eficaz de secuencias de codificación. Estas señales incluyen el codón de inicio ATG o secuencias adyacentes. Pueden tener que proporcionarse señales de control traduccional exógenas, incluyendo el codón de inicio ATG. Un especialista en la materia sería fácilmente capaz de determinar esto y proporcionar las señales necesarias. Es bien conocido que el codón de inicio debe estar “en fase” con el marco de lectura de la secuencia codificante deseada para asegurar la traducción de todo el inserto.
- 10 Las señales de control traduccional exógenas y codones de inicio pueden ser naturales o sintéticos. La eficacia de expresión puede potenciarse por la inclusión de elementos potenciadores de la transcripción apropiados.

- En ciertas realizaciones de la invención, se usan elementos de sitios internos de entrada al ribosoma (IRES) para crear mensajes multigénicos o policistrónicos. Los elementos IRES son capaces de superar el modelo de barrido de ribosoma de la traducción dependiente de Cap metilado en 5' y de empezar la traducción en sitios internos (Pelletier y Sonenberg, 1988). Se han descrito elementos IRES de dos miembros de la familia de picornavirus (polio y encefalomiocarditis) (Pelletier y Sonenberg, 1988), así como un IRES de un mensaje de mamífero (Macejak y Sarnow, 1991). Los elementos IRES pueden ligarse con marcos de lectura abiertos heterólogos. Pueden transcribirse conjuntamente múltiples marcos de lectura abiertos, cada uno separado por un IRES, creando mensajes policistrónicos. En virtud del elemento IRES, cada marco de lectura abierto es accesible a los ribosomas
- 15 para una traducción eficaz. Pueden expresarse eficazmente múltiples genes usando un solo promotor/potenciador para transcribir un solo mensaje (véanse las patentes de EE.UU. 5.925.565 y 5.935.819, incorporadas a la presente memoria por referencia).

3. Sitios de clonación múltiple

- Los vectores pueden incluir un sitio de clonación múltiple (MCS), que es una región de ácido nucleico que contiene múltiples sitios de enzima de restricción, cualquiera de los cuales puede usarse junto con la tecnología recombinante estándar para digerir el vector (véanse Carbonelli *et al.*, 1999, Levenson *et al.*, 1998 y Cocea, 1997, incorporados a la presente memoria por referencia). “Digestión con enzima de restricción” designa la escisión catalítica de una molécula de ácido nucleico con una enzima que funciona solo en localizaciones específicas de una molécula de ácido nucleico. Muchas de estas enzimas de restricción están comercialmente disponibles. El uso de dichas enzimas es ampliamente entendido por los especialistas en la materia. Frecuentemente, se linealiza o fragmenta un vector usando una enzima de restricción que corta en el MCS, posibilitando ligar secuencias exógenas con el vector. “Ligamiento” designa el proceso de formación de enlaces fosfodiéster entre dos fragmentos de ácido nucleico, que pueden ser contiguos o no entre sí. Las técnicas que implican las enzimas de restricción y reacciones de ligamiento sin bien conocidas por los especialistas en la materia de la tecnología recombinante.

4. Sitios de corte y empalme

La mayoría de moléculas de ARN eucarióticas transcritas experimentarán corte y empalme de ARN para retirar los intrones de los transcritos primarios. Los vectores que contienen secuencias eucarióticas genómicas pueden requerir sitios de corte y empalme donantes y/o aceptores para asegurar el procesamiento apropiado del transcrito para la expresión de proteína (véase Chandler *et al.*, 1997, incorporado a la presente memoria por referencia).

5. Señales de poliadenilación

- En la expresión, se incluirá típicamente una señal de poliadenilación para efectuar la poliadenilación apropiada del transcrito. La naturaleza de la señal de poliadenilación no se cree que sea crucial para la práctica exitosa de la invención y/o puede emplearse cualquiera de dichas secuencias. Las realizaciones preferidas incluyen la señal de poliadenilación de SV40 y/o la señal de poliadenilación de hormona de crecimiento bovina, convenientes y/o conocidas por funcionar bien en diversas células diana. Se contempla también como elemento del módulo de expresión un sitio de terminación transcripcional. Estos elementos pueden servir para potenciar los niveles del mensaje y/o minimizar la lectura del módulo en otras secuencias.

6. Orígenes de replicación

- Para propagar un vector en una célula hospedadora, puede contener uno o más sitios orígenes de replicación (a menudo denominados “ori”), que son secuencias de ácido nucleico específicas en las que se inicia la replicación. Como alternativa, puede emplearse una secuencia de replicación autónoma (ARS) si la célula hospedadora es una levadura.

7. Marcadores seleccionables y cribables

- En ciertas realizaciones de la invención, en células contienen un constructo de ácido nucleico de la presente invención, puede identificarse una célula *in vitro* o *in vivo* incluyendo un marcador en el vector de expresión. Dichos

marcadores conferirían un cambio identificable a la célula, permitiendo una fácil identificación de las células que contengan el vector de expresión. Generalmente, es un marcador seleccionable aquel que confiere una propiedad que permita la selección. Es un marcador seleccionable positivo aquel en que la presencia del marcador permite su selección, mientras que es un marcador seleccionable negativo aquel en que su presencia evita su selección. Es un ejemplo de marcador seleccionable positivo un marcador de resistencia a fármaco.

Habitualmente, la inclusión de un marcador de selección de fármaco ayuda a la clonación e identificación de transformantes, por ejemplo, los genes que confieren resistencia a neomicina, puromicina, higromicina, DHFR, GPT, zeocina e histidinol son marcadores seleccionables útiles. Además de marcadores que confieren un fenotipo que permite la discriminación de transformantes basándose en la implementación de condiciones, se contemplan también otros tipos de marcadores, incluyendo marcadores cribables tales como GFP, cuya base es el análisis colorimétrico. Como alternativa, pueden utilizarse enzimas cribables tales como timidina cinasa (tk) de herpesvirus simple o cloramfenicol acetiltransferasa (CAT). Un especialista en la materia sabría también cómo emplear marcadores inmunológicos, posiblemente junto con análisis por FACS. El marcador usado no se cree que sea importante, a condición de que pueda expresarse simultáneamente con el ácido nucleico que codifica un producto génico. Son bien conocidos por un especialista en la materia ejemplos adicionales de marcadores seleccionables y cribables.

B. Células hospedadoras

Los promotores de la presente invención pueden usarse de cualquier manera a condición de que regulen la expresión de un polinucleótido particular. Aunque son útiles para la expresión específica de tejido, son por naturaleza promotores/secuencias de control y, por tanto, pueden usarse en cualquier entorno celular para expresar cualquier polinucleótido.

Como se usan en la presente memoria, los términos "célula", "línea celular" y "cultivo celular" pueden usarse intercambiamente. Todos estos términos incluyen también su progenie, que es una cualquiera de todas las generaciones posteriores. Se entiende que toda la progenie puede no ser idéntica debido a mutaciones deliberadas o inadvertidas. En el contexto de expresión de una secuencia de ácido nucleico heterólogo, "célula hospedadora" designa una célula procariótica o eucariótica, e incluye cualquier organismo transformable que sea capaz de replicar un vector y/o expresar un gen heterólogo codificado por un vector. Una célula hospedadora puede usarse, y se ha usado, como receptor para vectores. Una célula hospedadora puede "transfectarse" o "transformarse", lo que designa un proceso mediante el cual un ácido nucleico exógeno se transfiere a o introduce en la célula hospedadora. Una célula transformada incluye la célula primaria en cuestión y su progenie.

Las células hospedadoras pueden derivar de procariotas o eucariotas, dependiendo de si el resultado deseado es la replicación del vector o la expresión de parte o todas las secuencias de ácido nucleico codificadas por el vector. Están disponibles numerosas líneas celulares y cultivos para uso como célula hospedadora, y pueden obtenerse mediante la American Type Culture Collection (ATCC), que es una organización que sirve como archivo para cultivos vivos y materiales genéticos. Puede determinarse el hospedador apropiado por un especialista en la materia basándose en la cadena principal vectorial y el resultado deseado. Puede introducirse un plásmido o cósmido, por ejemplo, en una célula hospedadora procariótica para la replicación de muchos vectores. Las células bacterianas usadas como células hospedadoras para replicación y/o expresión vectorial incluyen DH5 α , JM109 y KC8, así como una serie de hospedadores bacterianos disponibles comercialmente tales como SURE $\text{\textcircled{R}}$ Competent Cells and Solopack TM Gold Cells (Stratagene $\text{\textcircled{R}}$, La Jolla). Como alternativa, podrían usarse células bacterianas tales como *E. coli* LE392 como células hospedadoras para virus de fago.

Los ejemplos de células hospedadoras eucarióticas para replicación y/o expresión de un vector incluyen HeLa, NIH3T3, Jurkat, 293, Cos, CHO, Saos y PC12. Están disponibles muchas células hospedadoras de diversos tipos celulares y organismos y serán conocidas por un especialista en la materia. De forma similar, puede usarse un vector vírico junto con una célula hospedadora eucariótica o procariótica, particularmente aquel que sea permisivo para la replicación o expresión del vector.

Algunos vectores pueden emplear secuencias de control que le permitan replicarse y/o expresarse tanto en células procarióticas como eucarióticas. Un especialista en la materia entendería adicionalmente las condiciones en que incubar todas las células hospedadoras anteriormente descritas para mantenerlas y permitir la replicación de un vector. Son también entendidas y conocidas las técnicas y condiciones que permitirían la producción a gran escala de vectores, así como la producción de los ácidos nucleicos codificados por vectores y sus polipéptidos, proteínas o péptidos asociados.

C. Sistemas de expresión

Existen numerosos sistemas de expresión que comprenden al menos una parte o todas las composiciones discutidas anteriormente. Los sistemas basados en procariotas y/o eucariotas pueden emplearse para uso con la presente invención para producir secuencias de ácido nucleico, o sus polipéptidos, proteínas y péptidos asociados. Muchos de dichos sistemas están comercial y ampliamente disponibles. Aunque los promotores de la presente invención son útiles para expresión específica de tejido, son por naturaleza promotores/secuencias de control y, por

tanto, pueden usarse en cualquier sistema de expresión a condición de que regulen la expresión de un polinucleótido particular.

El sistema de célula de insecto/baculovirus puede producir un alto nivel de expresión de proteína de un segmento de ácido nucleico heterólogo, tal como se describe en las patentes de EE.UU. nº 5.871.986, 4.879.236, ambas incorporadas a la presente memoria por referencia, y que puede adquirirse, por ejemplo, con el nombre MaxBac® 2.0 en Invitrogen® y BacPack™ Baculovirus Expression System en Clontech®.

Otros ejemplos de sistemas de expresión incluyen el sistema de expresión de mamífero inducible Complete Control™ de Stratagene®, que implica un receptor inducible por ecdisona sintético, o su sistema de expresión pET, un sistema de expresión en *E. coli*. Otro ejemplo de un sistema de expresión inducible está disponible en Invitrogen®, y porta el sistema T-Rex™ (expresión regulada por tetraciclina), un sistema de expresión de mamífero inducible que usa el promotor de CMV completo. Invitrogen® proporciona también un sistema de expresión de levadura llamado el sistema de expresión de *Pichia methanolica*, que está diseñado para la producción a alto nivel de proteínas recombinantes en la levadura metilotrófica *Pichia methanolica*. Un especialista en la materia sabría cómo expresar un vector, tal como un constructo de expresión, para producir una secuencia de ácido nucleico o su polipéptido, proteína o péptido asociado.

II. Composiciones de ácido nucleico

En ciertas realizaciones de la presente invención, se emplean secuencias particulares en los constructos polinucleotídicos de la invención y los usos de los mismos. Aunque un especialista en la materia reconocerá que estas secuencias específicas pueden emplearse exactamente como se proporcionan en la presente memoria, en otras realizaciones son útiles secuencias que son similares a las secuencias ejemplares proporcionadas en la presente memoria al menos en parte como secuencias reguladoras de cáncer específicas de tejido.

Ciertas realizaciones de la presente invención se refieren a un ácido nucleico regulador específico de tejido (que puede usarse intercambiablemente con el término "polinucleótido"). En otros aspectos, un ácido nucleico de constructo de expresión comprende un segmento de ácido nucleico de SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 ejemplares o un equivalente biológicamente funcional del mismo.

El término "ácido nucleico" es bien conocido en la materia. Un "ácido nucleico" como se usa en la presente memoria designará generalmente una molécula (concretamente una hebra) de ADN, ARN o un derivado o análogo de la misma que comprenda una nucleobase. Una nucleobase incluye, por ejemplo, una base de purina o pirimidina de origen natural encontrada en el ADN (por ejemplo, una adenina "A", una guanina "G", una timina "T" o una citosina "C") o el ARN (por ejemplo, una A, una G, un uracilo "U" o una C". El término "ácido nucleico" engloba los términos "oligonucleótido" y "polinucleótido", cada uno como subgénero del término "ácido nucleico". El término "oligonucleótido" designa una molécula de entre aproximadamente 3 y aproximadamente 100 nucleobases de longitud. El término "polinucleótido" designa al menos una molécula de más de aproximadamente 100 nucleobases de longitud.

Estas definiciones designan generalmente una molécula monocatenaria, pero en realizaciones específicas, englobarán también una hebra adicional que es parcial, sustancial o totalmente complementaria de la molécula monocatenaria. Por tanto, un ácido nucleico puede englobar una molécula bicatenaria o una molécula tricatenaria que comprende una o más hebras complementarias o "complementos" de una secuencia particular que comprende una molécula. Como se usa en la presente memoria, un ácido nucleico monocatenario puede designarse por el sufijo "mc", un ácido nucleico bicatenario por el sufijo "bc" y un ácido nucleico tricatenario por el sufijo "tc".

1. Nucleobases

Como se usa en la presente memoria, una "nucleobase" designa una base heterocíclica, tal como por ejemplo una nucleobase de origen natural (concretamente una A, T, G, C o U) encontrada en al menos un aminoácido de origen natural (concretamente, ADN y ARN) y derivados y análogos de origen natural o no natural de dicha nucleobase. Una nucleobase puede formar generalmente uno o más enlaces de hidrógeno ("asociarse" o "hibridar") con al menos una nucleobase de origen natural de manera que pueda sustituir el apareamiento de nucleobases de origen natural (por ejemplo, el enlace de hidrógeno entre A y T, G y C y A y U).

Las nucleobases de "purina" y/o "pirimidina" engloban las nucleobases de purina y/o pirimidina de origen natural y también los derivados y análogos de las mismas incluyendo, pero sin limitación, aquellas de purina o pirimidina sustituidas con uno o más de un resto alquilo, carboxialquilo, amino, hidroxilo, halógeno (concretamente, flúor, cloro, bromo o yodo), tiol o alquiltiol. Los restos alquilo preferidos (por ejemplo, alquilo, carboxialquilo, etc.) comprenden de aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5 a aproximadamente 6 átomos de carbono. Otros ejemplos no limitantes de una purina o pirimidina incluyen una desazapurina, una 2,6-diaminopurina, un 5-fluorouracilo, una xantina, una hipoxantina, una 8-bromoguanina, una 8-cloroguanina, una bromotimina, una 8-aminoguanina, una 8-hidroxiguanina, una 8-metilguanina, una 8-tioguanina, una azaguanina, una 2-aminopurina, una 5-etilcitosina, una 5-metilcitosina, un 5-bromouracilo, un 5-etiluracilo, un 5-yodouracilo, un 5-clouracilo, un 5-propiluracilo, un tiouracilo, una 2-metiladenina, una metiltioadenina, una *N,N*-

dimetiladenina, una azadenina, una 8-bromoadenina, una 8-hidroxiadenina, una 6-hidroxiainopurina, una 6-tiopurina, una 4-(6-aminohexilcitosina) y similares

Una nucleobase puede estar comprendida en un nucleósido o nucleótido, usando cualquier procedimiento de síntesis química o natural descrito en la presente memoria o conocido por un especialista en la materia.

5 2. Nucleósidos

Como se usa en la presente memoria, un "nucleósido" designa una unidad química individual que comprende una nucleobase unida covalentemente con un resto ligador de nucleobase. Es un ejemplo no limitante de "resto ligador de nucleobase" un azúcar que comprende 5 átomos de carbono (concretamente, un "azúcar de 5 carbonos") que incluye, pero sin limitación, una desoxirribosa, una ribosa, una arabinosa o un derivado o análogo de un azúcar de 5 carbonos. Los ejemplos no limitantes de derivado o análogo de un azúcar de 5 carbonos incluyen una 2'-fluoro-2'-desoxirribosa o un azúcar carbocíclico en que un carbono esté sustituido por un átomo de oxígeno en el anillo de azúcar.

Son conocidos en la materia diferentes tipos de uniones covalentes de una nucleobase con un resto ligador de nucleobase. A modo de ejemplos no limitantes, típicamente un nucleósido que comprende una purina (concretamente A o G) o una nucleobase de 7-desazapurina une covalentemente la posición 9 de una purina o una 7-desazapurina con la posición 1' de un azúcar de 5 carbonos. En otro ejemplo no limitante, típicamente un nucleósido que comprende una nucleobase de pirimidina (concretamente C, T o U) une covalentemente la posición 1 de una pirimidina con la posición 1' de un 5 azúcar de 5 carbonos (Kornberg y Baker, 1992).

3. Nucleótidos

Como se usa en la presente memoria, un "nucleótido" designa un nucleósido que comprende adicionalmente un "resto de cadena principal". Generalmente, el resto de cadena principal une covalentemente un nucleótido con otra molécula que comprende un nucleótido, o con otro nucleótido, formando un ácido nucleico. El "resto de cadena principal" en nucleótidos de origen natural comprende típicamente un resto de fósforo, que se une covalente con un azúcar de 5 carbonos. La unión del resto de cadena principal ocurre típicamente en la posición 3' o 5' del azúcar de 5 carbonos. Sin embargo, son conocidos en la materia otros tipos de uniones, particularmente cuando un nucleótido comprende derivados o análogos de un azúcar de 5 carbonos de origen natural o un resto de fósforo.

4. Análogos de ácido nucleico

Un ácido nucleico puede comprender, o estar compuesto enteramente por, un derivado o análogo de una nucleobase, un resto ligador de nucleobase y/o un resto de cadena principal que puede estar presente en un ácido nucleico de origen natural. Como se usa en la presente memoria, un "derivado" designa una forma químicamente modificada o alterada de una molécula de origen natural, mientras que los términos "mimético" o "análogo" designan una molécula que puede parecerse estructuralmente o no a una molécula o resto de origen natural, pero que posee funciones similares. Como se usa en la presente memoria, un "resto" designa generalmente un componente químico o componente molecular menor de una estructura química o molecular mayor. Los análogos o derivados de nucleobases, nucleósidos y nucleótidos son bien conocidos en la materia, y se han descrito (véase, por ejemplo, Scheit, 1980, incorporada a la presente memoria por referencia).

Los ejemplos no limitantes adicionales de nucleósidos, nucleótidos o ácidos nucleicos que comprenden un azúcar de 5 carbonos y/o derivados o análogos del resto de cadena principal incluyen aquellos de la patente de EE.UU. nº 5.681.947, que describe oligonucleótidos que comprenden derivados de purina que forman triples hélices y/o que evitan la expresión de ADNbc; las patentes de EE.UU. 5.652.099 y 5.763.167, que describen ácidos nucleicos que incorporan análogos fluorescentes de nucleósidos encontrados en ADN o ARN, particularmente para uso como sondas de ácido nucleico fluorescentes; la patente de EE.UU. 5.614.617, que describe análogos oligonucleotídicos con sustituciones en los anillos de pirimidina que poseen una estabilidad a la nucleasa potenciada; las patentes de EE.UU. 5.670.663, 5.872.232 y 5.859.221, que describen análogos oligonucleotídicos con azúcares de 5 carbonos modificados (concretamente, restos de 2'-desoxifuranosilo modificados) usados en la detección de ácido nucleico; la patente de EE.UU. 5.446.137, que describe oligonucleótidos que comprenden al menos un resto de azúcar de 5 carbonos sustituido en la posición 4' con un sustituyente distinto de hidrógeno que pueden usarse en ensayos de hibridación; la patente de EE.UU. 5.886.165, que describe oligonucleótidos tanto con desoxirribonucleótidos con ligamientos internucleotídicos 3'-5' como ribonucleótidos con ligamientos internucleotídicos 2'-5'; la patente de EE.UU. 5.714.606, que describe un ligamiento internucleotídico modificado en el que se reemplaza el oxígeno en posición 3' del ligamiento internucleotídico por un carbono para potenciar la resistencia a nucleasa de los ácidos nucleicos; la patente de EE.UU. 5.672.697, que describe oligonucleótidos que contienen uno o más ligamientos internucleotídicos de 5'-metilfosfonato que potencian la resistencia a nucleasa; las patentes de EE.UU. 5.466.786 y 5.792.847, que describen el ligamiento de un resto sustituyente que puede comprender un fármaco o marcador con el carbono 2' de un oligonucleótido para proporcionar una estabilidad a nucleasa potenciada y la capacidad de suministrar fármacos o restos de detección; la patente de EE.UU. 5.223.618, que describe análogos oligonucleotídicos con un ligamiento de cadena principal de 2 o 3 carbonos que une la posición 4' y la posición 3' del resto de azúcar de 5 carbonos adyacente para potenciar la captación celular, la resistencia a nucleasas y la

hibridación con ARN diana; la patente de EE.UU. 5.470.967, que describe oligonucleótidos que comprenden al menos un ligamiento internucleotídico sulfamato o sulfamida que son útiles como sondas de hibridación de ácido nucleico; las patentes de EE.UU. 5.378.825, 5.777.092, 5.623.070, 5.610.289 y 5.602.240, que describen oligonucleótidos con un resto ligador de 3 o 4 átomos que reemplaza al resto de cadena principal de fosfodiéster, usado para una resistencia a nucleasa, captación celular y regulación de la expresión de ARN mejoradas; la patente de EE.UU. 5.858.988, que describe un agente portador hidrófobo unido a la posición 2'-O de oligonucleótidos para potenciar su permeabilidad por membrana y estabilidad; la patente de EE.UU. 5.214.136, que describe oligonucleótidos conjugados con antraquinona en el extremo 5' que poseen una hibridación a ADN o ARN potenciada y una estabilidad potenciada a nucleasas; la patente de EE.UU. 5.700.922, que describe quimeras de APN-ADN-APN en las que el ADN comprende nucleótidos de 2'-desoxieritropentofuranosilo para una resistencia a nucleasa, afinidad de unión y capacidad de activar ARNasa H potenciadas y la patente de EE.UU. 5.708.154, que describe ARN ligado con ADN formando un híbrido de ADN-ARN.

5. Preparación de ácidos nucleicos

Un ácido nucleico puede prepararse mediante cualquier técnica conocida por un especialista en la materia tal como, por ejemplo, síntesis química, producción enzimática o producción biológica. Los ejemplos no limitantes de ácido nucleico sintético (por ejemplo, un oligonucleótido sintético) incluyen un ácido nucleico preparado mediante síntesis química *in vitro* usando la química de fosfortriéster, fosfita o fosforamidita y técnicas de fase sólida tales como las descritas en el documento EP 266.032, incorporado a la presente memoria por referencia, o mediante intermedios de H-fosfonato de desoxinucleósido como se describen por Froehler *et al.*, 1986 y en la patente de EE.UU. nº de serie 5.705.629, incorporada cada una a la presente memoria por referencia. En los procedimientos de la presente invención, pueden usarse uno o más oligonucleótidos. Se han dado a conocer diversos mecanismos diferentes de síntesis oligonucleotídica, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. 4.659.774, 4.816.571, 5.141.813, 5.264.566, 4.959.463, 5.428.148, 5.554.744, 5.574.146, 5.602.244, cada una de las cuales se incorpora a la presente memoria por referencia.

Un ejemplo no limitante de un ácido nucleico producido enzimáticamente incluye aquel producido por enzimas en reacciones de amplificación tales como PCRTM (véanse, por ejemplo, la patente de EE.UU. 4.683.202 y la patente de EE.UU. 4.682.195, cada una incorporada a la presente memoria por referencia), o la síntesis de un oligonucleótido descrita en la patente de EE.UU. nº 5.645.897, incorporada a la presente memoria por referencia. Un ejemplo no limitante de ácido nucleico producido biológicamente incluye un ácido nucleico recombinante producido (concretamente replicado) en una célula viva, tal como un vector de ADN recombinante replicado en bacterias (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.* 1989, incorporado a la presente memoria por referencia).

6. Purificación de ácidos nucleicos

Un ácido nucleico puede purificarse en geles de poliacrilamida, gradientes de centrifugación de cloruro de cesio o mediante cualquier otro medio conocido por los especialistas en la materia (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, 1989, incorporado a la presente memoria por referencia).

En cierto aspecto, la presente invención se refiere a un ácido nucleico que es un ácido nucleico aislado. Como se usa en la presente memoria, el término "ácido nucleico aislado" designa una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, una molécula de ARN o ADN) que se ha aislado exenta, o está de otro modo exenta, del conjunto de ácidos nucleicos genómicos totales y transcritos de una o más células. En ciertas realizaciones, "ácido nucleico aislado" designa un ácido nucleico que se ha aislado exento, o está de otro modo exento, del conjunto de componentes celulares o los componentes de reacción *in vitro* tales como, por ejemplo, macromoléculas tales como lípidos o proteínas, moléculas biológicas pequeñas y similares.

7. Segmentos de ácido nucleico

En ciertas realizaciones, el ácido nucleico es un segmento de ácido nucleico. Como se usa en la presente memoria, el término "segmento de ácido nucleico" son fragmentos menores de un ácido nucleico tales como, para ejemplos no limitantes, aquellos que comprenden solo parte de las secuencias reguladoras para un polinucleótido transcrito dado.

8. Complementos de ácido nucleico

La presente invención engloba también un ácido nucleico que es complementario de un ácido nucleico de la invención. En realizaciones particulares, la invención engloba un ácido nucleico o un segmento de ácido nucleico complementario de la secuencia expuesta en las SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 18, por ejemplo. Un ácido nucleico es "complemento" o es "complementario" de otro ácido nucleico cuando puede aparearse por bases con otro ácido nucleico según las reglas de complementariedad de unión estándares de Watson-Crick, Hoogsteen o Hoogsteen inverso. Como se usa en la presente memoria, "otro ácido nucleico" puede designar una molécula separada o una secuencia espacialmente separada de la misma molécula.

Como se usa en la presente memoria, "complementario" o "complemento" designa también un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleobases consecutivas o nucleobases semiconsecutivas (por ejemplo, uno o más

- restos de nucleobases no están presentes en la molécula) capaces de hibridar con otra hebra de ácido nucleico o dúplex incluso si no todas las nucleobases se aparean por bases con la contrapartida nucleobásica. En ciertas realizaciones, un ácido nucleico “complementario” comprende una secuencia en que aproximadamente 70%, aproximadamente 71%, aproximadamente 72%, aproximadamente 73%, aproximadamente 74%, aproximadamente 75%, aproximadamente 76%, aproximadamente 77%, aproximadamente 78%, aproximadamente 79%, aproximadamente 80%, aproximadamente 81%, aproximadamente 82%, aproximadamente 83%, aproximadamente 84%, aproximadamente 85%, aproximadamente 86%, aproximadamente 87%, aproximadamente 88%, aproximadamente 89%, aproximadamente 90%, aproximadamente 91%, aproximadamente 92%, aproximadamente 93%, aproximadamente 94%, aproximadamente 95%, aproximadamente 96%, aproximadamente 97%, aproximadamente 98%, aproximadamente 99% hasta aproximadamente 100%, y cualquier intervalo derivable de los mismos, de la secuencia nucleobásica puede aparearse por bases con una molécula de ácido nucleico mono- o bicatenaria durante la hibridación. En ciertas realizaciones, el término “complementario” designa un ácido nucleico que puede hibridar con otra hebra o dúplex de ácido nucleico en condiciones rigurosas, como entenderá un especialista en la materia.
- 15 En ciertas realizaciones, un ácido nucleico “parcialmente complementario” comprende una secuencia que puede hibridar en condiciones de bajo rigor con un ácido nucleico mono- o bicatenario o que contiene una secuencia en que menos de aproximadamente un 70% de la secuencia nucleobásica es capaz de apareamiento por bases con una molécula de ácido nucleico mono- o bicatenaria durante la hibridación.

9. Hibridación

- 20 Como se usa en la presente memoria, “hibridación”, “hibrida” o “capaz de hibridar” se entiende que significa la formación de una molécula bi- o tricatenaria o una molécula de naturaleza bi- o tricatenaria parcial. El término “se asocia” como se usa en la presente memoria es sinónimo de “hibrida”. El término “hibridación”, “hibrida” o “capaz de hibridación” engloba los términos “condiciones rigurosas” o “alto rigor” y los términos “bajo rigor” o “condiciones de bajo rigor”.
- 25 Como se usa en la presente memoria, “condiciones rigurosas” o de “alto rigor” son aquellas condiciones que permiten la hibridación entre o en una o más hebras de ácido nucleico que contienen secuencias complementarias, pero impide la hibridación de secuencias aleatorias. Las condiciones rigurosas toleran poco desapareamiento, o ninguno, entre un ácido nucleico y una hebra diana. Dichas condiciones son bien conocidas por los especialistas en la materia, y se prefieren para aplicaciones que requieran una alta selectividad. Las aplicaciones no limitantes incluyen aislar un ácido nucleico, tal como un gen o segmento de ácido nucleico del mismo, o detectar al menos un transcrito de ARNm específico o un segmento de ácido nucleico del mismo, y similares.
- 30 Las condiciones rigurosas pueden comprender condiciones pobres en sales y/o de alta temperatura, tales como las proporcionadas por NaCl de aproximadamente 0,02 M a aproximadamente 0,15 M a temperaturas de aproximadamente 50°C a aproximadamente 70°C. Se entiende que la temperatura y la fuerza iónica de un rigor deseado se determinan en parte por la longitud del ácido o ácidos nucleicos particulares, la longitud y contenido de nucleobases de la secuencia o secuencias diana, la composición de carga del ácido o ácidos nucleico y la presencia o concentración de formamida, cloruro de tetrametilamonio u otro disolvente o disolventes en una mezcla de hibridación.
- 35 Se entiende también que estos intervalos, composiciones y condiciones de hibridación se mencionan a modo de ejemplos no limitantes solo, y que el rigor deseado para una reacción de hibridación particular se determina a menudo empíricamente por comparación con uno o más controles positivos o negativos. Dependiendo de la aplicación prevista, se prefiere emplear condiciones de hibridación variables para conseguir grados variables de selectividad de un ácido nucleico hacia una secuencia diana. En un ejemplo no limitante, la identificación o aislamiento de un ácido nucleico diana relacionado que no hibrida con un ácido nucleico en condiciones rigurosas puede conseguirse mediante hibridación a baja temperatura y/o alta fuerza iónica. Dichas condiciones se denominan de “bajo rigor” o condiciones de bajo rigor”, y los ejemplos no limitantes de bajo rigor incluyen la hibridación efectuada en NaCl de aproximadamente 0,15 M a aproximadamente 0,9 M en un intervalo de temperatura de aproximadamente 20 a aproximadamente 50°C. Por supuesto, está dentro de las habilidades de un especialista en la materia modificar adicionalmente las condiciones de alto o bajo rigor para adecuarlas a una aplicación particular.
- 40 El ácido o ácidos nucleicos de la presente invención, independientemente de la longitud de la secuencia misma, pueden combinarse con otras secuencias de ácido nucleico incluyendo, pero sin limitación, promotores, potenciadores, señales de poliadenilación, sitios de enzima de restricción, sitios de clonación múltiple, segmentos codificantes y similares, para crear uno o más constructos de ácido nucleico. Como se usa en la presente memoria, un “constructo de ácido nucleico” es un ácido nucleico genomanipulado o alterado por la mano del hombre, y
- 45 comprende generalmente una o más secuencias de ácido nucleico organizadas por la mano del hombre.
- 50 En un ejemplo no limitante, puede prepararse uno o más constructos de ácido nucleico que incluyen un tramo contiguo de nucleótidos idéntico a o complementario de las SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13; SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 18, por ejemplo, Un constructo de ácido nucleico puede ser de aproximadamente 3, aproximadamente 5, aproximadamente 8, aproximadamente 10 a aproximadamente 14 o aproximadamente 15, aproximadamente 20,

aproximadamente 30, aproximadamente 40, aproximadamente 50, aproximadamente 100, aproximadamente 200, aproximadamente 500, aproximadamente 1.000, aproximadamente 2.000, aproximadamente 3.000, aproximadamente 5.000, aproximadamente 10.000, aproximadamente 15.000, aproximadamente 20.000, aproximadamente 30.000, aproximadamente 50.000, aproximadamente 100.000, aproximadamente 250.000, aproximadamente 500.000, aproximadamente 750.000 hasta aproximadamente 1.000.000 nucleótidos de longitud, así como constructos de mayor tamaño, hasta e incluyendo tamaños cromosómicos (incluyendo todas las longitudes intermedias e intervalos intermedios), dado que la aparición de constructos de ácido nucleico tales como cromosomas artificiales de levadura es conocida por los especialistas en la materia. Se entenderá fácilmente que las “longitudes intermedias” e “intervalos intermedios”, como se usan en la presente memoria, significan cualquier longitud o intervalo incluido o entre los valores indicados (concretamente, todos los enteros incluidos y entre dichos valores). Los ejemplos no limitantes de longitudes intermedias incluyen aproximadamente 11, aproximadamente 12, aproximadamente 13, aproximadamente 16, aproximadamente 17, aproximadamente 18, aproximadamente 19, etc.; aproximadamente 21, aproximadamente 22, aproximadamente 23, etc.; aproximadamente 31, aproximadamente 32, etc.; aproximadamente 51, aproximadamente 52, aproximadamente 53, etc.; aproximadamente 101, aproximadamente 102, aproximadamente 103, etc.; aproximadamente 151, aproximadamente 152, aproximadamente 153, etc.; aproximadamente 1.001, aproximadamente 1.002, etc.; aproximadamente 50.001, aproximadamente 50.002, etc.; aproximadamente 750.001, aproximadamente 750.002, etc.; aproximadamente 1.000.001, aproximadamente 1.000.002, etc. Los ejemplos no limitantes de intervalos intermedios incluyen de aproximadamente 3 a aproximadamente 32, de aproximadamente 150 a aproximadamente 500.001, de aproximadamente 3.032 a aproximadamente 7.145, de aproximadamente 5.000 a aproximadamente 15.000, de aproximadamente 20.007 a aproximadamente 1.000.003, etc.

La expresión “una secuencia esencialmente como se expone en la SEQ ID NO: 12” o “una secuencia esencialmente como se expone en la SEQ ID NO: 13”, por ejemplo, significa que la secuencia corresponde sustancialmente con una porción de la SEQ ID NO: 12 y la SEQ ID NO: 13 y que tiene relativamente pocos nucleótidos que no son idénticos a, o un equivalente funcional biológico de, los nucleótidos respectivos de la SEQ ID NO: 12 y/o SEQ ID NO: 13. Por tanto, “una secuencia esencialmente como se expone en la SEQ ID NO: 12” o “una secuencia esencialmente como se expone en la SEQ ID NO: 13” engloba ácidos nucleicos, segmentos de ácido nucleico y genes que comprenden parte o todas las secuencias de ácido nucleico como se exponen la SEQ ID NO: 12 y/o la SEQ ID NO: 13.

La expresión “equivalente biológicamente funcional” es bien entendido en la materia y se define adicionalmente con detalle en la presente memoria. Por consiguiente, una secuencia que tenga entre aproximadamente 70% y aproximadamente 80%; o más preferiblemente entre aproximadamente 81% y aproximadamente 90%; o incluso más preferiblemente, entre aproximadamente 91% y aproximadamente 99% de nucleótidos que son idénticos o funcionalmente equivalentes a los nucleótidos de las secuencias designadas en la presente memoria, tales como las SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 18 ejemplares, será una secuencia que es respectivamente “esencialmente como se expone en las SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 18”, a condición de que se mantenga la actividad biológica de las secuencias.

En ciertas otras realizaciones, la invención se refiere al menos a un vector recombinante que incluye en su secuencia una secuencia de ácido nucleico esencialmente como se expone en las SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 18.

III. Polinucleótidos terapéuticos

El polinucleótido terapéutico cuya expresión está controlada por las secuencias de control de la invención englobadas por la invención puede ser de cualquier tipo, a condición de que el producto génico codificado genere así un efecto anticanceroso. Los efectos anticancerosos incluyen apoptosis en al menos una célula cancerosa, inhibición de la proliferación de al menos una célula cancerosa, mejora de al menos un síntoma de cáncer en un individuo y demás. En realizaciones particulares, el polinucleótido terapéutico codifica una forma mutante de Bik, incluyendo los mutantes BikT33D, BikS35D y Bik T33DS35D ejemplares, que se describen en la solicitud de patente de EE.UU. nº 10/816.698, incorporada por referencia a la presente memoria en su totalidad.

El polinucleótido terapéutico puede ser de cualquier tipo conocido por los especialistas en la materia o descubierto después. En realizaciones particulares, codifica inhibidores de la proliferación celular, reguladores de la muerte celular programada, supresores tumorales y/o secuencias anticodificantes de inductores de la proliferación celular. El polinucleótido terapéutico puede codificar ARN interferentes pequeños o secuencias anticodificantes. Los ejemplos de polinucleótidos terapéuticos incluyen aquellos que codifican TNF α o p53 o que codifican inductores polipeptídicos de la apoptosis incluyendo, pero sin limitación, Bik, p53, Bax, Bak, Bcl-x, Bad, Bim, Bok, Bid, Harakiri, Ad E1B, Bad y proteasas ICE-CED3. Otros polinucleótidos terapéuticos ejemplares incluyen aquellos que codifican retinoblastoma, Blk, IL-12, IL-10, IFN- α , citosina desaminasa, GM-CSF, E1A y otras proteínas proapoptóticas, por ejemplo. Puede utilizarse un polinucleótido que codifica una sustitución aminoacídica en la treonina 33, serina 35 o ambas de Bik mutante. En aspectos particulares de estas realizaciones, los aminoácidos del polipéptido Bik mutante están sustituidos con aspartato. En otros aspectos particulares, un Bik mutante es defectivo de uno o más sitios de fosforilación. Los polinucleótidos terapéuticos adicionales incluyen TNF α o p53 o inductores de la apoptosis,

incluyendo, pero sin limitación, Bik, p53, Bax, Bak, Bcl-x, Bad, Bim, Bok, Bid, Harakiri, Ad E1B, Bad y proteasas ICE-CED3.

IV. Suministro de ácido nucleico

5 El enfoque general de los aspectos de la presente invención respecto a las composiciones y/o productos terapéuticos es proporcionar una célula con un constructo génico que codifique una proteína, polipéptido o péptido de Bik mutante específico y/o deseado, permitiendo así que tenga efecto la actividad deseada de la proteína, polipéptido o péptido. Aunque es concebible poder suministrar directamente el constructo génico y/o proteína, una realización preferida implica proporcionar un ácido nucleico que codifica una proteína, polipéptido o péptido específico y deseado a la célula. Siguiendo esta provisión, la composición proteica se sintetiza mediante la
10 maquinaria transcripcional y traduccional de la célula, así como cualquiera que pueda proporcionarse por el constructo de expresión. Al proporcionar secuencias anticodificantes, ribozimas y otros inhibidores, el modo preferido es también proporcionar un ácido nucleico que codifique el constructo a la célula.

En ciertas realizaciones de la invención, el ácido nucleico que codifica el gen puede integrarse establemente en el genoma de la célula. En otras realizaciones adicionales, el ácido nucleico puede mantenerse establemente en la
15 célula como un segmento episómico separado de ADN. Dichos segmentos de ácido nucleico y "episomas" codifican secuencias suficientes para permitir el mantenimiento y replicación independientes y en sincronización con el ciclo de la célula hospedadora. Cómo se suministra el constructo de expresión a una célula y/o dónde permanece el ácido nucleico en la célula depende del tipo de constructo de expresión empleado.

A. Suministro de ADN usando vectores víricos

20 La capacidad de ciertos virus de infectar células y entrar en células mediante endocitosis mediada por receptor, y de integrarse en el genoma de la célula hospedadora y/o expresar genes víricos estable y/o eficazmente los ha hecho candidatos atractivos para la transferencia de genes ajenos a células de mamífero. Los vectores de terapia génica preferidos de la presente invención serán generalmente vectores víricos.

Aunque algunos virus que pueden aceptar material genético ajeno están limitados en el número de nucleótidos que
25 pueden acomodar y/o en el intervalo de células que infectan, se ha demostrado que estos virus efectúan exitosamente la expresión génica. Sin embargo, los adenovirus no integran su material genético en el genoma del hospedador y/o por lo tanto no requieren la replicación del hospedador para la expresión génica, haciéndolos idealmente adecuados para una expresión génica heteróloga rápida y eficaz. Las técnicas para la preparación de virus infecciosos defectivos de replicación son bien conocidas en la materia.

30 Por supuesto, al usar sistemas de suministro vírico, se deseará purificar suficientemente el virión para volverlo esencialmente exento de contaminantes indeseados, tales como partículas víricas interferentes defectivas y endotoxinas y otros pirógenos, de tal modo que no causen reacciones indeseadas en la célula, animal y/o individuo receptor del constructo vectorial. Un medio preferido de purificación del vector implica el uso de gradientes de densidad flotantes tales como centrifugación en gradiente de cloruro de cesio.

35 1. Vectores adenovíricos

Un procedimiento particular para el suministro de los constructos de expresión implica el uso de un vector de expresión adenovírico. Aunque los vectores adenovíricos son conocidos por tener una baja capacidad de integración en ADN genómico, este rasgo está compensado por la alta eficacia de la transferencia génica proporcionada por
40 estos vectores. "Vector de expresión adenovírico" se pretende que incluya aquellos constructos que contienen secuencias adenovíricas suficientes para (a) apoyar el empaquetamiento del constructo y/o (b) expresar en última instancia un constructo específico de tejido y/o célula que se ha clonado en el mismo.

El vector de expresión comprende una forma genomanipulada de adenovirus. El conocimiento de la organización genética del adenovirus, un virus de ADN bicatenario lineal de 36 kb, permite la sustitución de grandes trozos de
45 ADN adenovírico por secuencias ajenas de hasta 7 kb (Grunhaus y Horwitz, 1992). En contraposición con los retrovirus, la infección adenovírica de células hospedadoras no da como resultado la integración cromosómica, porque el ADN adenovírico puede replicar de manera episómica sin genotoxicidad potencial. También los adenovirus son estructuralmente estables y/o no se ha detectado redistribución genómica después de una extensa amplificación.

El adenovirus es particularmente adecuado para uso como vector de transferencia génica debido a su genoma de
50 tamaño medio, facilidad de manipulación, alta valoración, amplio intervalo de células diana y/o alta infectividad. Ambos extremos del genoma vírico contienen 100-200 repeticiones invertidas de pares de bases (ITR), que son elementos en cis necesarios para la replicación y/o empaquetamiento de ADN vírico. Las regiones temprana (E) y/o tardía (L) del genoma contienen diferentes unidades de transcripción que están divididas por el inicio de la replicación de ADN vírico. La región E1 (E1A y/o E1B) codifica proteínas responsables de la regulación de la transcripción del genoma vírico y/o unos pocos genes celulares. La expresión de la región E2 (E2A y/o E2B) da
55 como resultado la síntesis de las proteínas para replicación de ADN vírico. Estas proteínas están implicadas en la replicación de ADN, la expresión de genes tardíos y/o la desactivación de células hospedadoras (Renan, 1990). Los

productos de los genes tardíos, incluyendo la mayoría de proteínas de cápsida vírica, se expresan solo después de un procesamiento significativo de un único transcrito primario originado por el promotor tardío principal (MLP). El MLP (localizado a 16,8 u.m.) es particularmente eficaz durante la infección de fase tardía y/o todos los ARNm originados por este promotor poseen una secuencia líder tripartita 5' (TPL) que los hace ARNm preferidos para traducción.

5 En un sistema actual, el adenovirus recombinante se genera a partir de recombinación homóloga entre un vector lanzadera y un vector provírico. Debido a la posible recombinación entre dos vectores províricos, pueden generarse adenovirus de tipo silvestre en este proceso. Por lo tanto, es crítico aislar un único clon del virus a partir de una placa individual y/o examinar su estructura genómica.

10 La generación y/o propagación de los vectores adenovíricos actuales, que son deficientes en replicación, dependen de una única línea celular auxiliar, designada 293, que se ha transformado a partir de células de riñón embrionarias humanas por fragmentos de ADN de Ad5 y que expresa constitutivamente proteínas E1 (E1A y/o E1B; Graham *et al.*, 1977). Puesto que la región E3 es prescindible en el genoma adenovírico (Jones y Shenk, 1978), los actuales vectores adenovíricos, con la ayuda de células 293, portan ADN ajeno en las regiones E1, D3 y ambas (Graham y Prevec, 1991). Recientemente, se han descrito vectores adenovíricos que comprenden deleciones en la región E4 (patente de EE.UU. 5.670,488, incorporada a la presente memoria por referencia).

15 En la naturaleza, los adenovirus pueden empaquetar aproximadamente un 105% del genoma de tipo silvestre (Ghosh-Choudhury *et al.*, 1987), proporcionando la capacidad para aproximadamente 2 kb extra de ADN. Combinado con los aproximadamente 5,5 kb de ADN que son reemplazables en las regiones E1 y/o E3, la capacidad máxima del vector adenovírico actual es inferior a 7,5 kb y/o aproximadamente un 15% de la longitud total del vector. Más de un 80% del genoma vírico adenovírico permanece en la cadena principal vectorial.

20 Las líneas celulares auxiliares pueden derivar de células humanas tales como células de riñón embrionarias, células musculares, células hematopoyéticas humanas y otras células mesenquimáticas y epiteliales humanas. Como alternativa, las células auxiliares pueden derivar de células de otras especies de mamífero que sean permisivas de adenovirus humanos. Dichas células incluyen, por ejemplo, células Vero y otras células mesenquimáticas y/o epiteliales embrionarias de mono. Como se afirma anteriormente, la línea celular auxiliar preferida es 293.

25 Recientemente, Racher *et al.* (1995) han dado a conocer procedimientos mejorados para el cultivo de células 293 y/o la propagación de adenovirus. En un formato, se cultivan agregados de células naturales inoculando células individuales a matraces giratorios siliconizados de 1 l (Techne, Cambridge, RU) que contienen 100-200 ml de medio. Después de agitar a 40 rpm, se estima la viabilidad celular con azul de tripano. En otro formato, se emplean microportadores Fibra-Cel (Bibby Sterlin, Stone, RU) (5 g/l) como sigue. Se añade un inóculo celular, resuspendido en 5 ml de medio, al portador (50 ml) en un matraz Erlenmeyer de 250 ml y/o se deja estacionario con agitación ocasional durante 1 a 4 h. Se reemplaza entonces el medio con 50 ml de medio reciente y/o se inicia la agitación. Para la producción de virus, se dejan crecer las células hasta aproximadamente un 80% de confluencia, después de dicho tiempo se reemplaza el medio (hasta un 25% del volumen final) y/o se añade adenovirus a una MOI de 0,05. Se dejan los cultivos estacionarios durante una noche, después de lo cual se aumenta el volumen a 100% y/o se inicia la agitación durante otras 72 h.

30 Aparte del requisito de que el vector adenovírico sea defectivo de replicación, y al menos condicionalmente defectivo, no se cree que la naturaleza del vector adenovírico sea crucial para la práctica exitosa de la invención. El adenovirus puede ser de cualquiera de los 42 serotipos diferentes conocidos y los subgrupos A-F. El adenovirus de tipo 5 del subgrupo C es el material de partida preferido para obtener el vector adenovírico defectivo de replicación condicional para uso en la presente invención. Esto es debido a que el adenovirus de tipo 5 es un adenovirus humano del que se conoce una gran cantidad de información bioquímica y genética, y se ha usado históricamente para la mayoría de construcciones que emplean adenovirus como vector.

35 Como se afirma anteriormente, el vector típico según la presente invención es defectivo de replicación y no tendrá una región E1 adenovírica. Por tanto, lo más conveniente será introducir el constructo transformante en la posición en que se han eliminado las secuencias codificantes de E1. Sin embargo, la posición de inserción del constructo en las secuencias adenovíricas no es crítica para la invención. El polinucleótido que codifica el gen de interés puede insertarse también en lugar de la región E3 eliminada en vectores de reemplazo de E3 como se describe por Karlsson *et al.* (1986) y en la región E4 cuando una línea celular auxiliar y un virus auxiliar complementen el defecto de E4.

40 El crecimiento y/o manipulación de adenovirus son conocidos por los especialistas en la materia y/o exhiben un amplio intervalo de hospedadores *in vitro* e *in vivo*. Este grupo de virus puede obtenerse con altas valoraciones, por ejemplo, de 10^9 a 10^{11} unidades de formación de placa por ml, y son altamente infecciosos. El ciclo vital del adenovirus no requiere la integración en el genoma de la célula hospedadora. Los genes ajenos suministrados por vectores adenovíricos son episómicos y, por lo tanto, tienen una baja genotoxicidad para las células hospedadoras. No se han reseñado efectos secundarios en estudios de vacunación con adenovirus de tipo silvestre (Couch *et al.*, 1963; Top *et al.*, 1971), demostrando su seguridad y/o potencial terapéutico como vectores de transferencia génica *in vivo*.

Los vectores adenovíricos se han usado en la expresión de genes eucarióticos (Levrero *et al.*, 1991; Gómez-Foix *et al.*, 1992) y en el desarrollo de vacunas (Grunhaus y Horwitz, 1992; Graham y Prevec, 1992). Recientemente, estudios animales han sugerido que los adenovirus recombinantes podrían usarse para terapia génica (Stratford-Perricaudet y Perricaudet, 1991a; Stratford-Perricaudet *et al.*, 1991b; Rich *et al.*, 1993). Los estudios de administración de adenovirus recombinantes a diferentes tejidos incluyen la instilación traqueal (Rosenfeld *et al.*, 1991; Rosenfeld *et al.*, 1992), inyección muscular (Ragot *et al.*, 1993), inyecciones intravenosas periféricas (Herz y Gerard, 1993) y/o inoculación estereotáctica en el cerebro (Le Gal La Salle *et al.*, 1993). Los adenovirus recombinantes y virus adenoasociados (véase anteriormente) pueden tanto infectar como transducir células primarias humanas no en división.

10 2. Vectores de VAA

El virus adenoasociado (VAA) es un sistema vectorial atractivo para uso en la transducción celular de la presente invención ya que tiene una alta frecuencia de integración y puede infectar células no en división, haciéndolo así útil para el suministro de genes a células de mamífero, por ejemplo, en cultivo de tejido (Muzyczka, 1992) e *in vivo*. El VAA tiene un amplio intervalo de infectividad por hospedadores (Tratschin *et al.*, 1984; Laughlin *et al.*, 1986; Lebkowski *et al.*, 1988; McLaughlin *et al.*, 1988). Los detalles referentes a la generación y uso de vectores de VAA se describen en la patente de EE.UU. n° 5.139.941 y/o la patente de EE.UU. n° 4.797.368, cada una incorporada a la presente memoria por referencia.

Los estudios que demuestran el uso de VAA en el suministro génico incluyen LaFace *et al.* (1988); Zhou *et al.* (1993); Flotte *et al.* (1993) y Walsh *et al.* (1994). Los vectores de VAA recombinantes se han usado exitosamente para la transducción *in vitro* y/o *in vivo* de genes marcadores (Kaplitt *et al.*, 1994; Lebkowski *et al.*, 1988; Samulski *et al.*, 1989; Yoder *et al.*, 1994; Zhou *et al.*, 1994; Hermonat y Muzyczka, 1984; Tratschin *et al.*, 1985; McLaughlin *et al.*, 1988) y genes implicados en enfermedades humanas (Flotte *et al.*, 1992; Luo *et al.*, 1994; Ohi *et al.*, 1990; Walsh *et al.*, 1994; Wei *et al.*, 1994). Recientemente, se ha aprobado un vector de VAA para ensayos humanos de fase I para el tratamiento de fibrosis quística.

El VAA es un parvovirus dependiente porque requiere la coinfección con otro virus (o adenovirus o un miembro de la familia de herpesvirus) para experimentar una infección productiva en células cultivadas (Muzyczka, 1992). En ausencia de coinfección con virus auxiliar, el genoma de VAA de tipo silvestre se integra a través de sus extremos en el cromosoma 19 humano, donde reside en estado latente como provirus (Kotin *et al.*, 1990; Samulski *et al.*, 1991). El VAAr, sin embargo, no está limitado al cromosoma 19 para integración, a menos que se exprese también la proteína Rep de VAA (Shelling y Smith, 1994). Cuando una célula portadora de un provirus VAA se superinfecta con un virus auxiliar, el genoma de VAA se "rescata" del cromosoma y de un plásmido recombinante y/o se establece una infección productiva normal (Samulski *et al.*, 1989; McLaughlin *et al.*, 1988; Kotin *et al.*, 1990; Muzyczka, 1992).

Típicamente, el virus VAA recombinante (VAAr) se prepara cotransfectando un plásmido que contiene el gen de interés flanqueado por las dos repeticiones terminales de VAA (McLaughlin *et al.*, 1988; Samulski *et al.*, 1989; cada uno incorporado a la presente memoria como referencia) y/o un plásmido de expresión que contiene las secuencias codificantes de VAA de tipo silvestre sin las repeticiones terminales, por ejemplo, pIM45 (McCarty *et al.*, 1991; incorporado a la presente memoria como referencia). Las células se infectan y transfectan también con adenovirus y plásmidos portadores de los genes adenovíricos requeridos para la función auxiliar de VAA. Los conjuntos de virus VAAr preparados de dicho modo están contaminados con adenovirus, que deben separarse físicamente de las partículas de VAAr (por ejemplo, mediante centrifugación por densidad de cloruro de cesio). Como alternativa, podrían usarse los vectores adenovíricos que contienen las regiones codificantes de VAA y las líneas celulares que contienen las regiones codificantes de VAA y algunos o todos los genes auxiliares de adenovirus (Yang *et al.*, 1994; Clark *et al.*, 1995). Pueden usarse también líneas celulares portadoras de ADN de VAAr como provirus integrados (Flotte *et al.*, 1995).

3. Vectores retrovíricos

Los retrovirus son prometedores como vectores de suministro génico debido a su capacidad de integrar sus genes en el genoma hospedador, transfiriendo una gran cantidad de material genético ajeno, infectando un amplio espectro de especies y tipos celulares y empaquetándose en líneas celulares especiales (Miller, 1992).

Los retrovirus son un grupo de virus de ARN monocatenarios caracterizados por la capacidad de convertir su ARN en ADN bicatenario en células infectadas mediante un proceso de transcripción inversa (Coffin, 1990). El ADN resultante se integra establemente entonces en los cromosomas celulares como provirus y/o dirige la síntesis de proteínas víricas. La integración da como resultado la retención de las secuencias génicas víricas en la célula receptora y/o sus descendientes. El genoma retrovírico contiene tres genes, gag, pol, y/o env, que codifican las proteínas de cápsida, enzima polimerasa y componentes de cubierta, respectivamente. Una secuencia encontrada en dirección 5' del gen gag contiene una señal para el empaquetamiento del genoma en viriones. Están presentes dos secuencias de repetición terminal larga (LTR) en los extremo 5' y 3' del genoma vírico. Estas contienen secuencias promotoras y potenciadoras fuertes y son también necesarias para la integración en el genoma de la célula hospedadora (Coffin, 1990).

Para construir un vector retrovívico, se inserta un ácido nucleico que codifica un gen de interés en el genoma vírico en el lugar de ciertas secuencias víricas para producir un virus que es defectivo de replicación. Para producir viriones, se construye una línea celular de empaquetamiento que contiene los genes gag, pol y env pero sin las LTR y componentes de empaquetamiento (Mann *et al.*, 1983). Cuando un plásmido recombinante que contiene un ADNc, junto con las LTR retrovívicas y secuencias de empaquetamiento, se introduce en esta línea celular (mediante precipitación con fosfato de calcio, por ejemplo), la secuencia de empaquetamiento permite empaquetar el transcrito de ARN del plásmido recombinante en partículas víricas, que se secretan entonces al medio de cultivo (Nicolas y Rubenstein, 1988; Temin, 1986; Mann *et al.*, 1983). Se recoge entonces el medio que contiene los retrovirus recombinantes, opcionalmente se concentra y se usa para transferencia génica. Los vectores retrovívicos son capaces de infectar una amplia variedad de tipos celulares. Sin embargo, la integración y/o expresión estable requieren la división de las células hospedadoras (Paskind *et al.*, 1975).

Es problemático con el uso de vectores retrovívicos defectivos la potencial aparición de virus competentes de replicación de tipo silvestre en las células de empaquetamiento. Esto puede ser el resultado de eventos de recombinación en que la secuencia intacta del virus recombinante se inserta en dirección 5' de la secuencia de gag, pol, env integrada en el genoma de la célula hospedadora. Sin embargo, están ahora disponibles nuevas líneas celulares de empaquetamiento que deberían reducir en gran medida la probabilidad de recombinación (Markowitz *et al.*, 1988; Hersdorffer *et al.*, 1990).

Se ha reseñado el suministro génico usando vectores retrovívicos de segunda generación. Kasahara *et al.* (1994) han preparado una variante genomanipulada del virus de leucemia de murino Moloney, que infecta normalmente solo células de ratón, y han modificado una proteína de cubierta de modo que el virus se una específicamente a, e infecte, células humanas portadoras del receptor de eritropoyetina (EPO). Esto se consiguió insertando una porción de la secuencia de EPO en una proteína de cubierta para crear una proteína quimérica con una nueva especificidad de unión.

4. Otros vectores víricos

Pueden emplearse otros vectores víricos como constructos de expresión en la presente invención. Pueden emplearse vectores derivados virus tales como virus *Vaccinia* (Ridgeway, 1988; Baichwal y Sugden, 1986; Coupar *et al.*, 1988), virus Sindbis, citomegalovirus y/o herpesvirus simple. Ofrecen varios rasgos atractivos para diversas células de mamífero (Friedmann, 1989; Ridgeway, 1988; Baichwal y Sugden, 1986; Coupar *et al.*, 1988; Horwich *et al.*, 1990).

Con el reciente reconocimiento de los virus de hepatitis B defectivos, se ha logrado una nueva perspectiva sobre la relación estructura-función de diferentes secuencias víricas. Estudios *in vitro* han mostrado que el virus podría retener la capacidad de empaquetamiento dependiente del auxiliar y transcripción inversa a pesar de la delección de hasta un 80% de su genoma (Horwich *et al.*, 1990). Esto sugería que podrían reemplazarse grandes porciones del genoma por material genético ajeno. Chang *et al.* han introducido recientemente el gen de cloranfenicol acetiltransferasa (CAT) en el genoma del virus de la hepatitis B de pato en lugar de las secuencias codificantes de polimerasa, de superficie y/o presuperficie. Se cotransfectó con virus de tipo silvestre en una línea celular de hematoma aviar. Se usaron medios de cultivo que contenían altas valoraciones del virus recombinante para infectar hepatocitos de pato joven primarios. Se detectó la expresión estable del gen CAT durante al menos 24 días después de la transfección (Chang *et al.*, 1991).

En ciertas realizaciones adicionales, el vector de terapia génica será el HSV. Un factor que hace al HSV un vector atractivo es el tamaño y organización del genoma. Debido a que el HSV es grande, la incorporación de múltiples genes y módulos de expresión es menos problemática que en otros sistemas víricos menores. Además, la disponibilidad de diferentes secuencias de control vírico de rendimiento variable (tiempo, fuerza, etc.) hace posible controlar la expresión en mayor medida que en otros sistemas. Es también una ventaja que el virus tenga relativamente pocos mensajes cortados y empalmados, facilitando adicionalmente las manipulaciones genéticas. El HSV es también relativamente fácil de manipular y/o puede cultivarse a altas valoraciones. Por tanto, el suministro es menos problemático, tanto en términos de los volúmenes necesarios para conseguir una MOI suficiente como por la necesidad reducida de repetir dosificaciones.

5. Virus modificados

En aún otras realizaciones de la presente invención, los ácidos nucleicos para suministrar se albergan en un virus infeccioso que se ha genomanipulado para expresar un ligando de unión específico. La partícula vírica se unirá por tanto específicamente con los receptores asociados de la célula diana y suministrará los contenidos a la célula. Se ha desarrollado recientemente un enfoque novedoso diseñado para permitir la orientación específica de vectores retrovívicos basándose en la modificación química de un retrovirus mediante la adición química de residuos de lactosa a la cubierta vírica. Esta modificación puede permitir la infección específica de hepatocitos mediante receptores de sialoglucoproteína.

Se ha diseñado otro enfoque para la orientación de retrovirus recombinantes en que se usaban anticuerpos biotinilados contra una proteína de cubierta retrovívica y/o contra un receptor celular específico. Los anticuerpos se

acoplaron mediante los componentes de biotina usando estreptavidina (Roux *et al.*, 1989). Usando anticuerpos contra antígenos de la clase I y clase II del complejo de histocompatibilidad principal, demostraron la infección de una variedad de células humanas que portaban esos antígenos de superficie con un virus ecotrópico *in vitro* (Roux *et al.*, 1989).

5 B. Otros procedimientos de suministro de ADN

En diversas realizaciones de la invención, se suministra ADN a una célula en forma de constructo de expresión. Para efectuar la expresión de un constructo génico, el constructo génico debe suministrarse a una célula. Como se describe en la presente memoria, el mecanismo preferido para suministro es mediante infección vírica, en que el constructo de expresión se encapsida en una partícula vírica infecciosa. Sin embargo, están también contemplados por la presente invención varios procedimientos no víricos para la transferencia de constructos de expresión a células. En una realización de la presente invención, el constructo de expresión puede consistir solo en ADN recombinante desnudo y/o plásmidos. La transferencia del constructo puede efectuarse mediante cualquiera de los procedimientos mencionados que permeabilizan física y/o químicamente la membrana celular. Algunas de estas técnicas pueden adaptarse exitosamente para uso *in vivo* y/o *ex vivo*, como se discute a continuación.

15 C. Transfección mediada por liposoma

En una realización adicional de la invención, el constructo de expresión puede atraparse en un liposoma. Los liposomas son estructuras vesiculares caracterizadas por una membrana bicapa lipídica y/o un medio acuoso interno. Los liposomas multilamelares tienen múltiples capas lipídicas separadas por medio acuoso. Se forman espontáneamente cuando se suspenden fosfolípidos en un exceso de solución acuosa. Los componentes lipídicos experimentan una autorredistribución antes de la formación de estructuras cerradas y/o atrapan agua y/o solutos disueltos entre las bicapas lipídicas (Ghosh y Bachhawat, 1991). Se contempla también un constructo de expresión complejado con lipofectamina (Gibco BRL).

El suministro de ácido nucleico mediado por liposoma y la expresión de ADN ajeno *in vitro* han sido muy exitosos (Nicolau y Sene, 1982; Fraley *et al.*, 1979; Nicolau *et al.*, 1987). Wong *et al.* (1980) han demostrado la factibilidad del suministro mediado por liposoma y/o la expresión de ADN ajeno en células HeLa y de heotoma de embrión de pollo.

En ciertas realizaciones de la invención, el liposoma puede complejarse con un virus hemaglutinante (HVJ). Esto se ha mostrado que facilita la fusión con la membrana celular y/o promueve la entrada en la célula de ADN encapsulado en liposoma (Kaneda *et al.*, 1989). En otras realizaciones, el liposoma puede complejarse y/o emplearse junto con proteínas cromosómicas no histónicas nucleares (HMG-1) (Kato *et al.*, 1991). En aún otras realizaciones, el liposoma puede complejarse y/o emplearse junto con HVJ y HMG-1. En otras realizaciones, el vehículo de suministro puede comprender un ligando y un liposoma. Cuando se emplea un promotor bacteriano en el constructo de ADN, será también deseable incluir en el liposoma una polimerasa bacteriana apropiada.

Los inventores contemplan que los productos génicos supresores de neu puedan introducirse en células usando la transferencia génica mediada por liposoma. Se propone que dichos constructos pueden acoplarse con liposomas e introducirse directamente mediante un catéter, como se describe por Nabel *et al.* (1990). Al emplear estos procedimientos, los productos génicos supresores de neu pueden expresarse eficazmente en un sitio específico *in vivo*, no solo las células de hígado y bazo que son accesibles por inyección intravenosa. Por lo tanto, esta invención engloba también composiciones de constructos de ADN que codifican un producto génico supresor de neu formulado como un complejo de ADN/liposoma y los procedimientos de uso de dichos constructos.

Como se describe en la patente de EE.UU. n° 5.641.484, los liposomas son particularmente bien adecuados para el tratamiento de cáncer mediado por HER2/neu.

Pueden prepararse liposomas catiónicos que son reactivos de transfección eficaces de Bik a células animales usando el procedimiento de Gao *et al.* (1991). Gao *et al.* describen un derivado de colesterol catiónico novedoso que puede sintetizarse en una sola etapa. Los liposomas constituidos por este lípido son aparentemente más eficaces en la transfección y menos tóxicos para las células tratadas que los constituidos por el reactivo lipofectina. Estos lípidos son una mezcla de DC-col ("3 β -(N-(N'-dimetilamino)etano)carbamoilcolesterol") y DOPE ("dioleoilfosfatidiletanolamina"). Las etapas de producción de estos liposomas son como sigue.

El DC-col se sintetiza mediante una reacción sencilla a partir de cloroformiato de colesterilo y N,N-dimetiletildiamina. Se añade gota a gota una solución de cloroformiato de colesterilo (2,25 g, 5 mmol en 5 ml de cloroformo seco) a una solución de N,N-dimetiletildiamina en exceso (2 ml, 18,2 mmol en 3 ml de cloroformo seco) a 0°C. Después de la retirada del disolvente mediante evaporación, se purifica el residuo mediante cristalización en etanol absoluto a 4°C y se seca a vacío. El rendimiento es un polvo blanco de DC-col.

Se preparan liposomas catiónicos mezclando 1,2 μ mol de DC-col y 8,0 μ mol de DOPE en cloroformo. Se seca entonces esta mezcla, se deseca a vacío y se resuspende en 1 ml de esteroil en tampón Hepes 20 mM (pH 7,8) en un tubo. Después de 24 horas de hidratación a 4°C, se somete a sonicación la dispersión durante 5-10 minutos en un sonicador, formando liposomas con un diámetro medio de 150-200 nm.

Para preparar un complejo de liposoma/ADN, los inventores usan las siguientes etapas. Se dispone el ADN para transfectar en medio DMEM/F12 a una relación de 15 µg de ADN a 50 µl de DMEM/F12. Se usa entonces DMEM/F12 para diluir la mezcla de liposomas DC-col/DOPE a una relación de 50 µl de DMEM/F12 a 100 µl de liposoma. Se mezclan entonces suavemente la dilución de ADN y la dilución de liposoma y se incuban a 37°C durante 10 minutos. Después de la incubación, el complejo de ADN/liposoma está listo para inyección.

La transfección liposómica puede ser mediante liposomas compuestos, por ejemplo, por fosfatidilcolina (PC), fosfatidilserina (PS), colesterol (col), cloruro de *N*-[1-(2,3-dioleiloxi)propil]-*N,N*-trimetilamonio (DOTMA), dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE) y/o 3β-[*N*-(*N,N*-dimetilaminoetano)carbarmoilcolesterol (DC-col), así como otros lípidos conocidos por los especialistas en la materia. Los especialistas en la materia reconocerán que existe una variedad de técnicas de transfección liposómica que serán útiles en la presente invención. Entre estas técnicas están aquellas descritas en Nicolau *et al.*, 1987, Nabel *et al.*, 1990 y Gao *et al.*, 1991. En una realización específica, los liposomas comprenden DC-col. Más particularmente, según los inventores, los liposomas comprenden DC-col y DOPE que se han preparado siguiendo las enseñanzas de Gao *et al.* (1991) de la manera descrita en la sección de realizaciones preferidas. Los inventores prevén también utilidad para los liposomas compuestos por DOTMA, tales como aquellos que están disponibles comercialmente con el nombre comercial Lipofectin™, de Vical, Inc., en San Diego, Calif.

Los liposomas pueden ponerse en contacto con las células para transfectar mediante una variedad de procedimientos. En cultivo celular, el complejo de liposoma-ADN puede dispersarse simplemente en la solución de cultivo celular. Para la aplicación *in vivo*, se inyecta típicamente complejo de liposoma-ADN. La inyección intravenosa permite la transferencia del complejo de ADN mediada por liposoma, por ejemplo, al hígado y bazo. Para permitir la transfección de ADN en células que no sean accesibles mediante inyección intravenosa, es posible inyectar directamente los complejos de liposoma-ADN en una localización específica del cuerpo de un animal. Por ejemplo, Nabel *et al.* enseñan la inyección mediante catéter en la pared arterial. En otro ejemplo, los inventores han usado la inyección intraperitoneal para permitir la transferencia génica a ratones.

La presente invención contempla también composiciones que comprenden un complejo liposómico. Este complejo liposómico comprenderá un componente lipídico y un segmento de ADN codificante de un ácido nucleico codificante de una forma mutante de Bik. El ácido nucleico codificante de la forma mutante de Bik empleado en el complejo liposómico puede ser, por ejemplo, aquel que codifica Bik-T145A o Bik-T145D.

El lípido empleado para preparar el complejo liposómico puede ser cualquiera de los lípidos anteriormente discutidos. En particular, DOTMA, DOPE y/o DC-col pueden formar todo o parte del complejo liposómico. Los inventores han tenido un éxito particular con complejos que comprenden DC-col. En una realización preferida, el lípido comprenderá DC-col y DOPE. Aunque se prevé que cualquier relación de DC-col a DOPE tenga utilidad, se prevé que aquellas que comprendan una relación de DC-col:DOPE entre 1:20 y 20:1 serán particularmente ventajosas. Los inventores han encontrado que los liposomas preparados a partir de una relación de DC-col:DOPE de aproximadamente 1:10 a aproximadamente 1:5 han sido útiles.

En una realización específica, se emplea la región más pequeña necesaria para potenciar la retención de Bik en el núcleo de una célula, de forma que no se introduzca ADN innecesario en las células que reciben un constructo del gen Bik. Técnicas bien conocidas por los especialistas en la materia, tales como el uso de enzimas de restricción, permitirán la generación de regiones pequeñas de Bik. La capacidad de estas regiones de inhibir neu puede determinarse fácilmente mediante los ensayos reseñados en los ejemplos.

En ciertas realizaciones de la invención, el liposoma puede complejarse con un virus de hemaglutinina (HVJ). Se ha mostrado que esto facilita la fusión con la membrana celular y promueve la entrada en la célula de ADN encapsulado en liposoma (Kaneda *et al.*, 1989). En otras realizaciones, el liposoma puede complejarse o emplearse junto con proteínas cromosómicas no histónicas nucleares (HMG-1) (Kato *et al.*, 1991). En aún otras realizaciones, el liposoma puede complejarse o emplearse junto con ambos de HVJ y HMG-1. Al haberse empleado dichos constructos de expresión exitosamente en la transferencia y expresión de ácidos nucleico *in vitro* e *in vivo*, son aplicables para la presente invención. Cuando se emplea un promotor bacteriano en el constructo de ADN, será también deseable incluir en el liposoma una polimerasa bacteriana apropiada.

D. Electroporación

En ciertas realizaciones de la presente invención, el constructo de expresión se introduce en la célula mediante electroporación. La electroporación implica la exposición de una suspensión de células y/o ADN a una descarga eléctrica de alto voltaje.

La transfección de células eucarióticas usando electroporación ha sido muy exitosa. Se han transfectado prelinfocitos B de ratón con genes de inmunoglobulina kappa humana (Potter *et al.*, 1984) y/o hepatocitos de rata con el gen de cloranfenicol acetiltransferasa (Tur-Kaspa *et al.*, 1986) de esta manera.

E. Fosfato de calcio y/o DEAE-dextrano

En otras realizaciones de la presente invención, se introduce el constructo de expresión en las células usando precipitación con fosfato de calcio. Las células KB humanas se han transfectado con ADN de adenovirus 5 (Graham y Van Der Eb, 1973) usando esta técnica. También de esta manera, se transfectaron células L(A9) de ratón, C127, CHO, CV-1, BHK, NIH3T3 y/o HeLa de ratón con un gen marcador de neomicina (Chen y Okayama, 1987) y/o se transfectaron hepatocitos de rata con una variedad de genes marcadores (Rippe *et al.*, 1990).

En otra realización, se suministra el constructo de expresión a la célula usando DEAE-dextrano seguido de polietilenglicol. De esta manera, se introdujeron plásmidos informadores en células de mieloma y/o eritroleucemia de ratón (Gopal, 1985).

F. Bombardeo de partículas

Otra realización de la invención para transferir un contrato de expresión de ADN desnudo a células puede implicar el bombardeo de partículas. Este procedimiento depende de la capacidad de acelerar microproyectiles recubiertos con ADN a una alta velocidad, permitiéndoles atravesar membranas celulares y/o entrar en células sin eliminarlas (Klein *et al.*, 1987). Se han desarrollado varios dispositivos para acelerar partículas pequeñas. Uno de dichos dispositivos se basa en una descarga de alto voltaje para generar una corriente eléctrica, que a su vez proporciona la fuerza motora (Yang *et al.*, 1990). Los microproyectiles usados consistían en sustancias biológicamente inertes tales como perlas de wolframio y/u oro.

G. Microinyección directa y/o carga por sonicación

Realizaciones adicionales de la presente invención incluyen la introducción del constructo de expresión mediante microinyección directa y/o carga por sonicación. La microinyección directa se ha usado para introducir constructos de ácido nucleico en ovocitos de *Xenopus* (Harland y Weintraub, 1985) y/o se han transfectado fibroblastos LTK con el gen de timidina cinasa mediante carga por sonicación (Fechheimer *et al.*, 1987).

H. Transfección asistida por adenovirus

En ciertas realizaciones de la presente invención, el constructo de expresión se introduce en la célula usando transfección asistida por adenovirus. Se han reseñado eficacias de transfección aumentadas en sistemas celulares que usan sistemas acoplados con adenovirus (Kelleher y Vos, 1994; Cotten *et al.*, 1992; Curiel, 1994).

V. Tratamientos de combinación

Para aumentar la eficacia de un producto génico terapéutico codificado por un constructo que comprende un promotor de la invención, puede ser deseable combinar estas composiciones con otros agentes eficaces en el tratamiento de enfermedades hiperproliferativas tales como agentes anticancerosos. Un agente "anticanceroso" es capaz de afectar negativamente al cáncer en un sujeto, por ejemplo, eliminando las células cancerosas, induciendo la apoptosis de las células cancerosas, reduciendo la velocidad de crecimiento de las células cancerosas, reduciendo la incidencia o el número de metástasis, reduciendo el tamaño tumoral, inhibiendo el crecimiento tumoral, reduciendo el suministro de sangre a un tumor o células cancerosas, promoviendo una respuesta inmunitaria contra células cancerosas o un tumor, previniendo o inhibiendo la progresión del cáncer o aumentando el intervalo de vida de un sujeto con cáncer. Más generalmente, estas otras composiciones se proporcionarían en una cantidad combinada eficaz para eliminar o inhibir la proliferación de la célula. Este proceso puede implicar poner en contacto las células con el constructo de expresión y el agente o agentes o múltiples factores al mismo tiempo. Esto puede conseguirse poniendo en contacto la célula con una única composición o formulación farmacológica que incluya ambos agentes, o poniendo en contacto la célula con dos composiciones o formulaciones distintas, al mismo tiempo, en que una composición incluye el constructo de expresión y la otra incluye el segundo agente o agentes.

La terapia con los procedimientos y composiciones de la presente invención puede usarse junto con terapia quimioterapéutica, radioterapéutica, inmunoterapéutica, cirugía, terapia hormonal o terapia génica adicional con otros agentes proapoptóticos o reguladores del ciclo celular. La terapia génica con los promotores y/o la terapia génica de la invención puede utilizar, además de las composiciones y procedimientos de la invención, inductores de la proliferación celular, secuencias anticodificantes para inductores de la proliferación celular; inhibidores de la proliferación celular tales como p53, p16, Rb, APC, DCC, NF-1, NF-2, WT-1, MEN-I, MEN-II, zac1, p73, VHL, MMAC1 / PTEN, DBCCR-1, FCC, rsk-3, p27, fusiones de p27/p16, fusiones de Bik/p27, genes antitrombóticos (por ejemplo, COX-1, TFPI), PGS, Dp, E2F, ras, myc, neu, raf, erb, fms, trk, ret, gsp, hst, abl, E1A, p300, genes implicados en la angiogénesis (por ejemplo, VEGF, FGF, tromboespondina, BAI-1, GDAIF o sus receptores) o MCC y/o reguladores de la muerte celular programada, tales como aquellos que contrarrestan la función de Bcl-2 y promueven la muerte celular (por ejemplo, Bax, Bak, Bik, Bim, Bid, Bad, Harakiri).

VI. Preparaciones farmacéuticas

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención comprenden una cantidad eficaz de un constructo que comprende las secuencias de control de la presente invención que regulan la expresión de un producto génico terapéutico y, en realizaciones específicas, uno o más agentes adicionales, disueltos o dispersados en un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable. Las frases "farmacéutica o farmacológicamente aceptable" designan

entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción adversa, alérgica u otra indeseada cuando se administran a un animal tales como, por ejemplo, un ser humano, según sea apropiado. La preparación de una composición farmacéutica que contenga al menos un constructo que comprenda las secuencias de control de la invención que regulan la expresión de un polinucleótido terapéutico y, en algunas realizaciones, uno o más
 5 ingredientes activos adicionales, será conocida por los especialistas en la materia a la vista de la presente divulgación, como se ejemplifica en "Remington's Pharmaceutical Sciences", 18ª ed. Mack Printing Company, 1990, incorporado a la presente memoria por referencia. Además, para administración a animales (por ejemplo, seres humanos), se entenderá que las preparaciones deban satisfacer los estándares de esterilidad, pirogenicidad, seguridad general y pureza requeridos por la FDA Office of Biological Standards.

10 Como se usa en la presente memoria, "portador farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, tensioactivos, antioxidantes, conservantes (por ejemplo, agentes antibacterianos, agentes antifúngicos), agentes isotónicos, agentes retardantes de la absorción, sales, conservantes, fármacos, estabilizadores de fármacos, aglutinantes, excipientes, agentes de disgregación, lubricantes, agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, tintes, materiales similares y combinaciones de los mismos, como serán
 15 conocidos por un especialista en la materia (véase, por ejemplo, "Remington's Pharmaceutical Sciences", 18ª ed. Mack Printing Company, 1990, pág. 1289-1329, incorporado a la presente memoria por referencia). Excepto en la medida en que algún portador convencional sea incompatible con el ingrediente activo, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas o farmacéuticas. En una realización específica, la composición de Bik mutante se administra en un liposoma.

20 El constructo terapéutico que comprende las secuencias de control específicas de tejido puede comprender diferentes tipos de portadores dependiendo de si se va a administrar en forma sólida, líquida o de aerosol, y de si tiene que ser estéril para dichas vías de administración como inyección. La presente invención puede administrarse por vía intravenosa, intradérmica, intraarterial, intraperitoneal, intralesional, intracraneal, intraarticular, intraprostática, intrapleuraleal, intratraqueal, intranasal, intravítrea, intravaginal, rectal, tópica, intratumoral, intramuscular,
 25 intraperitoneal, subcutánea, intravesicular, mucosa, intrapericárdica, oral, tópica o local, usando aerosol, inyección, infusión, infusión continua, perfusión localizada que baña células diana directamente, mediante catéter, lavado, cremas, composiciones lipídicas (por ejemplo, liposomas) o mediante otros procedimientos o cualquier combinación de los anteriores, como será conocido por un especialista en la materia (véase, por ejemplo, "Remington's Pharmaceutical Sciences", 18ª Ed. Mack Printing Company, 1990, incorporado a la presente memoria por
 30 referencia).

La cantidad de dosificación real de una composición de la presente invención administrada a un paciente animal puede determinarse mediante factores físicos y fisiológicos tales como el peso corporal, gravedad de la afección, tipo de enfermedad que se esté tratando, intervenciones terapéuticas previas o concurrentes, idiopatía del paciente y vía de administración. El facultativo responsable de la administración determinará, en cualquier caso, la
 35 concentración del ingrediente o ingredientes activos en una composición y la dosis o las dosis apropiadas para el sujeto individual.

En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas pueden comprender, por ejemplo, al menos aproximadamente 0,1% de un compuesto activo. En otras realizaciones, el compuesto activo puede comprender entre aproximadamente 2% y aproximadamente 75% del peso de la unidad, o entre aproximadamente 25% y
 40 aproximadamente 60%, por ejemplo, y cualquier intervalo derivable de los mismos. En otros ejemplos no limitantes, una dosis puede comprender también de aproximadamente 1 µg/kg de peso corporal, aproximadamente 5 µg/kg de peso corporal, aproximadamente 10 µg/kg de peso corporal, aproximadamente 50 µg/kg de peso corporal, aproximadamente 100 µg/kg de peso corporal, aproximadamente 200 µg/kg de peso corporal, aproximadamente 350 µg/kg de peso corporal, aproximadamente 500 µg/kg de peso corporal, aproximadamente 1 mg/kg de peso corporal,
 45 aproximadamente 5 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 200 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 350 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 500 mg/kg de peso corporal, a aproximadamente 1000 mg/kg de peso corporal o más por administración, y cualquier intervalo derivable de los mismos. En ejemplos no limitantes de un intervalo derivable de los números enumerados en la presente memoria,
 50 puede administrarse un intervalo de aproximadamente 5 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal, de aproximadamente 5 µg/kg de peso corporal a aproximadamente 500 mg/kg de peso corporal, etc., basándose en los números descritos anteriormente.

En cualquier caso, la composición puede comprender diversos antioxidantes para retardar la oxidación de uno o más componentes. Adicionalmente, la prevención de la acción de los microorganismos puede estar causada por
 55 conservantes tales como diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, incluyendo pero sin limitación parabenos (por ejemplo, metilparabenos, propilparabenos), clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal o combinaciones de los mismos.

El constructo terapéutico puede formularse en una composición en forma de base libre, neutra o sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácido, por ejemplo, aquellas formadas con los grupos
 60 amino libres de una composición proteica, o las que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos tales como ácido acético, oxálico, tartárico o mandélico. Las sales

formadas con los grupos carboxilo libres pueden derivar también de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o férrico; o bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina o procaína.

5 En realizaciones en que la composición está en forma líquida, el portador puede ser un disolvente o medio de dispersión que comprende, pero sin limitación, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido, etc.), lípidos (por ejemplo, triglicéridos, aceites vegetales, liposomas) y combinaciones de los mismos. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula necesario por dispersión en portadores tales como, por ejemplo, poliol líquido o lípidos, mediante el uso de tensioactivos tales como, por ejemplo, hidroxipropilcelulosa o combinaciones de dichos procedimientos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos tales como, por ejemplo, azúcares, cloruro de sodio o combinaciones de los mismos.

10 En otras realizaciones, pueden usarse gotas oculares, soluciones o pulverizadores nasales, aerosoles, colutorios o inhaladores en la presente invención. Dichas composiciones se diseñan generalmente para ser compatibles con el tipo de tejido diana. En un ejemplo no limitante, las soluciones nasales son habitualmente soluciones acuosas diseñadas para administrarse a las fosas nasales en gotas o pulverizadores. Las soluciones nasales se preparan de modo que sean similares en muchos aspectos a las secreciones nasales, de modo que se mantenga la acción ciliar normal. Por tanto, en realizaciones preferidas, las soluciones nasales acuosas son habitualmente isotónicas o están ligeramente tamponadas para mantener un pH de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 6,5. Además, pueden incluirse en la formulación conservantes antimicrobianos similares a los usados en preparaciones oftálmicas, fármacos o estabilizadores de fármacos apropiados, si es necesario. Por ejemplo, son conocidas diversas preparaciones nasales comerciales e incluyen fármacos tales como antibióticos o antihistamínicos.

15 En ciertas realizaciones, la forma mutante Bik se prepara para administración por vías tales como ingestión oral. En estas realizaciones, la composición sólida puede comprender, por ejemplo, soluciones, suspensiones, emulsiones, comprimidos, píldoras, cápsulas (por ejemplo, cápsulas de gelatina de cubierta dura o blanda), formulaciones de liberación prolongada, composiciones bucales, trociscos, elixires, suspensiones, jarabes, obleas, colutorios o combinaciones de los mismos. Las composiciones orales pueden incorporarse directamente al alimento de la dieta. Los portadores preferidos para administración oral comprenden diluyentes inertes, portadores comestibles asimilables o combinaciones de los mismos. En otros aspectos de la invención, la composición oral puede prepararse en forma de un jarabe o elixir. Un jarabe o elixir puede comprender, por ejemplo, un agente activo, un agente edulcorante, un conservante, un agente aromatizante, un tinte, un conservante o combinaciones de los mismos.

20 En ciertas realizaciones preferidas, una composición oral puede comprender uno o más aglutinantes, excipientes, agentes disgregantes, lubricantes, agentes aromatizantes y combinaciones de los mismos. En ciertas realizaciones, una composición puede comprender uno o más de los siguientes: un aglutinante tal como, por ejemplo, goma de tragacanto, goma arábiga, almidón de maíz, gelatina o combinaciones de los mismos; un excipiente tal como, por ejemplo, fosfato de dicalcio, manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina de sodio, celulosa, carbonato de magnesio o combinaciones de los mismos; un agente disgregante tal como, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de patata, ácido alginico o combinaciones de los mismos; un agente aromatizante tal como, por ejemplo, menta piperita, aceite de gualteria, aroma de cereza, aroma de naranja, etc. o combinaciones de los anteriores. Cuando la forma unitaria de dosificación es una cápsula, puede contener, además de los materiales del tipo anterior, portadores tales como un portador líquido. Pueden estar presentes diversos otros materiales como recubrimientos o modificarse de otro modo la forma física de la unidad de dosificación. Por ejemplo, los comprimidos, píldoras o cápsulas pueden estar recubiertos con goma laca, azúcar o ambos.

25 Las formulaciones adicionales que son adecuadas para otros modos de administración incluyen los supositorios. Los supositorios son formas de dosificación sólidas de diversos pesos y formas, habitualmente medicadas, para inserción en el recto, vagina o uretra. Después de la inserción, los supositorios se ablandan, funden o disuelven en los fluidos de la cavidad. En general, para supositorios, los portadores tradicionales pueden incluir, por ejemplo, polialquilenglicoles, triglicéridos o combinaciones de los mismos. En ciertas realizaciones, los supositorios pueden estar formados por mezclas que contienen, por ejemplo, el ingrediente activo en un intervalo de aproximadamente 0,5% a aproximadamente 10%, y preferiblemente de aproximadamente 1% a aproximadamente 2%.

30 Las soluciones inyectables estériles se preparan incorporando los compuestos activos en la cantidad requerida al disolvente apropiado con varios de los otros ingredientes enumerados anteriormente, según sea necesario, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando los diversos ingredientes activos esterilizados a un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y/o los demás ingredientes. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones, suspensiones o emulsiones inyectables estériles, los procedimientos preferidos de preparación son las técnicas de secado a vacío o liofilización, que proporcionan un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional a partir de un medio líquido anteriormente esterilizado por filtración. El medio líquido debería estar adecuadamente tamponado si fuera necesario y en primer lugar volverse isotónico el diluyente líquido antes de la inyección con suficiente solución salina o glucosa. La preparación de composiciones altamente concentradas para inyección directa está también contemplada, previendo

el uso de DMSO como disolvente para dar como resultado una penetración extremadamente rápida que suministra altas concentraciones de agentes activos a una zona pequeña.

La composición debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento, y conservarse frente a la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. Se apreciará que la contaminación con endotoxinas debería mantenerse mínima a un nivel seguro, por ejemplo, de menos de 0,5 ng/mg de proteína.

En realizaciones particulares, puede causarse la absorción prolongada de una composición inyectable por el uso en las composiciones de agentes retardantes de la absorción tales como, por ejemplo, monoestearato de aluminio, gelatina o combinaciones de los mismos.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar realizaciones preferidas de la invención. Debería apreciarse por los especialistas en la materia que las técnicas dadas a conocer en los ejemplos siguientes representan técnicas descubiertas por los inventores que funcionan bien en la práctica de la invención, y por tanto puede considerarse que constituyen modos preferidos para su práctica. Sin embargo, los especialistas en la materia deberían apreciar, en vista de la presente divulgación, que pueden hacerse muchos cambios en las realizaciones específicas que se dan a conocer y seguir obteniéndose un resultado parecido o similar sin apartarse del espíritu y alcance de la invención.

EJEMPLO 1

EXPRESIÓN ESPECÍFICA DE TEJIDO DE CÁNCER DE MAMA

Las terapias actuales de cáncer de mama (CM), tales como quimioterapia (QT) y radioterapia, tienen una baja selectividad por las células tumorales y efectos secundarios para los tejidos normales. Para minimizar los efectos secundarios, estas terapias se administran generalmente de manera intermitente, dejando que las células normales se recuperen entre ciclos de tratamiento. Sin embargo, durante el periodo de recuperación, algunas células supervivientes pueden volverse más resistentes al tratamiento debido a mutaciones genéticas. En consecuencia, puede aparecer la recurrencia o progresión del cáncer. La terapia génica orientada a tumor puede minimizar los efectos secundarios del tratamiento y el riesgo de desarrollar resistencia al actuar sobre las rutas de señalización específicas de tumor. En la presente invención, se usan promotores específicos de cáncer de mama para la terapia génica orientada a cáncer de mama del polinucleótido terapéutico ejemplar Bik mutante.

La tumorigénesis y progresión del cáncer de mama implican una serie de cambios genéticos. Los genes activados específicamente en tumores son buenas dianas de terapia. Como primera etapa, los inventores han recogido y revisado los datos publicados sobre micromatrices de ADNc y SAGE e identificado 6 genes específicamente regulados positivamente en células de cáncer de mama como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Genes regulados positivamente de forma específica en células de cáncer de mama

Gen	T/N	PCI (máx= -0,4)
Receptor de transferrina	>20	-0,3
B-Myb	>20	ND
Ceruloplasmina	>10	-0,35
Proteína de unión 1 a la secuencia X	>8	ND
α-Glutamilhidrolasa conjugasa	>20	-0,33
Topoisomerasa IIα	>20	ND

T/N, relación de expresión génica de células tumorales a normales. PCI, índice de correlación con el pronóstico. El valor negativo de PCI indica un peor pronóstico. El valor máximo de PCI negativo es -0,4.

Entre ellos, se subclonaron los promotores de receptor de transferrina (TR), B-Myb, ceruloplasmina y topoisomerasa IIα (topollα) en vectores informadores de luciferasa y se ensayaron usando ensayos informadores con líneas celulares normales y cancerosas. Los promotores topollα □ y TR tienen la máxima actividad en células de cáncer de mama respecto a las células 184A1 de epitelio de mama normales. Por lo tanto, los presentes inventores buscaron adicionalmente elementos en cis específicos de cáncer de mama en estos dos promotores.

El topollα cataliza cambios topológicos del ADN para liberar la tensión generada durante la replicación, transcripción y segregación cromosómica. Es también la diana de varios agentes anticancerosos, tales como antraciclinas (por

ejemplo, etopósido y doxorubicina). Muchos estudios han mostrado que el nivel de topolla se correlaciona con la sensibilidad de las células cancerosas a las antraciclinas. Además, el topolla es un mal marcador de pronóstico para cáncer de mama, tumores cerebrales, hepatoma, etc., La regulación de la expresión de topolla es estrictamente dependiente del ciclo celular: su nivel de ARNm y actividad promotora son muy bajos en la fase G0/G1, empiezan a subir en la fase S tardía y alcanzan el máximo en la fase G2/M. El topolla es un promotor sin secuencia TATA que contiene cuatro secuencias CCAAT invertidas (ICB) y dos secuencias GC. Está regulado por el choque térmico, las etapas del ciclo celular y p53. El NF-Y (también conocido como CBF) se une a ICB en el promotor y es necesario para la transcripción de topolla durante el ciclo celular. Tomado en conjunto, esto indica que el promotor topolla responde a la señalización oncogénica en algunas realizaciones, y los sitios ICB y sus factores de unión podrían desempeñar un papel muy importante en su actividad específica de CM.

En una realización de la presente invención, se utiliza el receptor de transferrina en promotores combinados para la presente invención. El TR es un receptor de membrana que interacciona con transferrina unida a hierro, facilitando el transporte de hierro a través de la membrana celular. Un nivel de ARNm de TR alto se correlaciona con una mala diferenciación, mayor invasividad y alto índice proliferativo de las células de cáncer de mama. Estudios *in vitro* han demostrado que un oligonucleótido anticodificante que orienta a ARNm de TR puede inhibir específicamente el crecimiento de células de cáncer de mama humanas sin afectar a las células de mama normales, indicando que el TR desempeña un papel crucial en el desarrollo del cáncer de mama. Aunque la regulación de la estabilidad del ARNm es el determinante principal de la expresión de TR en células normales, muchos estudios han revelado que la transcripción de TR está altamente activada en células proliferantes y por varias señales oncogénicas. La región central del promotor de TR contiene una secuencia TATA, una secuencia GC, un sitio AP-1/CRE y HRE, que responde ante hipoxia. Señales tales como proliferación, hipoxia, falta de hierro y diferenciación pueden activar este segmento del promotor de TR.

Como se muestra a continuación, los presentes inventores han utilizado estos promotores CT90 y CTR116 específicos de cáncer de mama ejemplares junto con un polinucleótido que codifica un polipéptido Bik mutante, en particular realizaciones comprendidas en liposomas. El vector terapéutico BikDD activado por CT90 ejemplar (CT90-BikDD) eliminaba selectivamente células de CM *in vitro* y suprimía el crecimiento de un xenoinjerto de tumor de mama en un modelo de ratón. Tomados en conjunto, estos resultados indicaban que CT90 y CTR116 son promotores eficaces y fuertes específicos de cáncer de mama que son útiles para controlar la expresión génica de Bik mutante en terapia génica orientada a cáncer de mama.

30 **Identificación de segmentos centrales específicos de CM en el promotor topolla**

Para identificar uno o más segmentos que comprenden los elementos en cis requeridos por su especificidad por cáncer de mama, los presentes inventores generaron una serie de mutantes de delección del promotor topolla, por ejemplo, mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Cada mutante contenía diferentes números de sitios ICB en el intervalo de 1 a 5 y se subclonó en un vector de expresión de luciferasa. Esos constructos informadores se transfirieron transitoriamente entonces en diversas líneas celulares, y se examinaron sus actividades promotoras usando un ensayo informador de luciferasa. Un promotor de 580 pb (designado como completo) tenía la mayor actividad entre todos los mutantes de delección y se activaba en su mayoría en las células de cáncer de mama (FIG. 1). Sin embargo, el segmento promotor más corto, que cubría 90 pares de bases desde el sitio de inicio de la transcripción y comprendía el primer sitio ICB, poseía una actividad promotora mínima y seguía reteniendo especificidad por cáncer de mama (FIG. 2). Este resultado indicaba que el segmento de 90 pb comprendía elementos centrales específicos de cáncer de mama.

Potenciación de la actividad del promotor topolla con la secuencia potenciadora de CMV

Las actividades de todos los mutantes de delección del promotor topolla eran del orden de menos de un 10% de la actividad del promotor de CMV. Para potenciar la actividad promotora para aplicación clínica, los presentes inventores obtuvieron la secuencia potenciadora de CMV ejemplar a partir del plásmido pCDNA3.1 mediante PCR, lo conectaron directamente en dirección 5' de los mutantes completo y de delección del promotor de topolla de 90 pb y lo subclonaron entonces en vectores informadores de luciferasa. Dos promotores combinados ejemplares se designaron CT572 y CT90, respectivamente. En comparación con los mutantes de delección de promotor originales, la actividad de CT572 y CT90 estaba drásticamente elevada y era comparable con el promotor de CMV, pero seguía reteniendo su especificidad por cáncer de mama (FIG. 3). El promotor CT90 tiene una actividad mucho mayor que CT572, y es casi tan fuerte como el promotor de CMV en algunas líneas celulares (FIG. 3). Por lo tanto, se utilizó CT90 para el ensayo *in vivo*. Se inocularon células MDA-MB-231 de cáncer de mama en la almohadilla grasa mamaria de ratones atímicos. 4 semanas después de la inoculación, cada ratón del grupo experimental recibió 50 µg de vector CT90-luciferasa complejado con liposoma suministrado por inyección intravenosa en la vena de la cola, y se administró vector CMV-luciferasa a ratones en el grupo de control. 48 horas después de la inyección, se sacrificaron los ratones y se examinó la actividad promotora mediante un ensayo de luciferasa en tumor, corazón, pulmón, hígado, bazo, riñón y músculo (FIG. 4). El CT90 tenía mayor actividad que el promotor de CMV en tumor. Sin embargo, en tejidos normales, la actividad de CT90 era mucho menor que la del promotor de CMV. Esto indicaba que el promotor CT90 tiene actividad específica de CM *in vivo*.

60 **Efecto antitumoral de CT90-BikDD**

Para caracterizar a CT90 en terapia génica orientada a cáncer de mama, se generó un constructo terapéutico en que CT90 activa la expresión de BikDD, y se designa de aquí en adelante como CT90-BikDD. Se cotransfectó este constructo con un vector informador de luciferasa en las líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-231 y 468 y la línea celular de epitelio de mama normal 184A1, y se determinó entonces el efecto de eliminación de células mediante un ensayo de vitalidad de luciferasa. Se usaron el vector BikDD activado por el promotor de CMV (CMV-BikDD) y el vector vacío como controles positivo y negativo, respectivamente. Aunque CMV-BikDD eliminaba las tres líneas celulares en una extensión casi igual, CT90-BikDD eliminaba preferiblemente células de cáncer de mama (FIG. 5), indicando que el efecto de eliminación de CT90-BikDD es selectivo de células de cáncer de mama. Por lo tanto, CT90 es útil en la terapia génica orientada a cáncer de mama.

A continuación, se caracterizó *in vivo* el efecto antitumoral de esta terapia génica orientada a cáncer de mama. Una semana después de inocular células MDA-MB-231 de cáncer de mama en almohadillas de grasa mamaria, se trataron los ratones atímicos una vez por semana con CT90-BikDD complejado con liposoma (grupo terapéutico), CMV-BikDD (control positivo) y CMV-PGL3 (tratamiento ficticio), o tampón dextrosa D5W como control sin tratamiento. Se inyectaron por vía intravenosa en cada ratón 15 µg de constructo de ADN complejado con liposoma, una vez por semana, y se midió regularmente el tamaño del tumor. El grupo de CT90-BikDD mostró un efecto supresor tumoral superior en comparación con CMV-BikDD o CMV-PGL3 (FIG. 6).

Identificación de segmentos centrales específicos de cáncer de mama en el promotor de receptor de transferrina

Para identificar el segmento que contiene los elementos en cis requeridos para especificidad por cáncer de mama, se generó una serie de mutantes de delección del promotor de TR (1412, 1123 y 193 pb en dirección 5' del sitio de inicio de la transcripción) mediante PCR y se subclonaron en un vector de expresión de luciferasa. Se transfectaron transitoriamente entonces estos constructos informadores en diversas líneas celulares como se menciona anteriormente, y se examinaron sus actividades promotoras usando un ensayo informador de luciferasa. El segmento de 193 pb (187 pb corriente arriba 5' del sitio de inicio de la transcripción) tenía la máxima actividad y especificidad por cáncer de mama *in vitro* (FIG. 7).

Potenciación de la actividad del promotor central de TR con la secuencia potenciadora de CMV

Para estrechar el intervalo de un promotor central específico de cáncer de mama, se eliminó adicionalmente el extremo 5' del segmento de 193 pb del promotor de TR a 116 pb en dirección 5' del sitio de inicio de la transcripción, y se conectó con una secuencia potenciadora de CMV, como se describe anteriormente para CT90. Este promotor combinado, designado en la presente memoria como CTR116, se subclonó en un vector informador de luciferasa y se transfectó en las líneas celulares. Después de la transfección, se trataron las células en condiciones normóxicas o hipóxicas (94% de N₂, 5% de CO₂, 1% de O₂ durante 20 horas) y se determinó la actividad del promotor CTR116 mediante un ensayo de luciferasa. En comparación con el promotor mutante de delección original, la actividad de CTR116 estaba claramente elevada, mientras que retenía su especificidad por cáncer de mama. Además, su actividad puede inducirse adicionalmente mediante tratamiento hipóxico, resultando comparable con el promotor de CMV (FIG. 8). Esta es la primera demostración de que al menos parte del promotor de TR posee especificidad por cáncer de mama, y que un potenciador promotor de CMV puede potenciar su actividad sin interferir con la inducción de hipoxia.

En realizaciones adicionales de la presente invención, los elementos CT90 y CTR116 respectivos se estrechan adicionalmente para identificar segmentos aún menores en los mismos que retengan actividad de expresión específica de cáncer de mama. Por ejemplo, pueden prepararse constructos de delección de estas regiones respectivas, y se ensaya su especificidad de tejido para identificar los fragmentos menores que mantengan la capacidad de dirigir la expresión en tejido de cáncer de mama.

El promotor CT90 activa la expresión de BikDD a un nivel comparable al del promotor de CMV

Para caracterizar adicionalmente la actividad del promotor CT90 para la inducción de expresión génica a un nivel similar al promotor de CMV, que posee una fuerte actividad y se usa ampliamente en la terapia génica sistémica, se transfectaron los constructos CT90-BikDD o CMV-BikDD a células de cáncer de mama MCF-7 mediante electroporación. 24 horas después de la transfección, se recogieron las células y se lisaron para transferencia Western. Como se muestra en la FIG. 14, el nivel de expresión de la proteína BikDD a partir del promotor CT90 es ligeramente mayor que el del promotor de CMV. Este resultado indica que el promotor CT90 posee una fuerte actividad en células de cáncer de mama.

El lipoplejo CT90-BikDD suprime selectivamente el crecimiento de tumor de mama y prolongaba la supervivencia en un modelo de ratón ortotópico

Para caracterizar si CT90-BikDD complejado con liposoma suministrado sistémicamente (lipoplejo CT90-BikDD) podría dirigir la expresión selectiva de BikDD *in vivo*, se inocularon células MDA-MB-231 (FIG. 15A) o MDA-MB-468 (FIG. 15B) en la almohadilla grasa mamaria de ratones hembra atímicos para formar tumores de mama. Los ratones portadores de tumor recibieron entonces tratamiento con CT90-BikDD, CMV-BikDD, vector pGL3 (tratamiento ficticio) suministrados por liposoma o sin tratamiento (D5W), con 8 ratones en cada grupo de tratamiento. Se

inyectaron por vía intravenosa lipoplejos de diferentes constructos de ADN en ratones de los correspondientes grupos de tratamiento una vez por semana. Se suprimió significativamente el crecimiento tumoral en los grupos de tratamiento con CT90-BikDD y CMV-BikDD ($p < 0,05$ en la prueba de t), en comparación con los resultados en ambos grupos de tratamiento ficticio (pGL3) y sin tratamiento (D5W) (FIG. 15A y 15B). Como se muestra en la FIG. 15, el tiempo de supervivencia medio de ratones de los grupos CT90-BikDD, CMV-BikDD, pGL3 y D5W es de $25,25 \pm 1,83$, $23,25 \pm 1,74$, $17,5 \pm 1,3$ y $16,25 \pm 0,98$ semanas, respectivamente. Ambos tratamientos con CT90-BikDD y CMV-BikDD proporcionan un beneficio de supervivencia significativo para ratones portadores del xenoinjerto de MDA-MB-231 en comparación con el grupo sin tratamiento (D5W) o con tratamiento ficticio (pGL3), indicando que CT90-BikDD proporcionaba un efecto terapéutico comparable a CMV-BikDD (FIG. 16, panel inferior).

10 CT90-BikDD posee actividad antitumoral y un efecto secundario mínimo en tejidos normales

Los presentes inventores caracterizaron adicionalmente entonces si el perfil de expresión diferencial *in vivo* de CT90-luc y CMV-luc podría reflejarse por CT90-BikDD y CMV-BikDD. Para enfrentarse a este asunto, se examinó la expresión de ARNm de BikDD en tumor y corazón mediante hibridación *in situ* (FIG. 17). La tinción marrón oscura por todo el tejido cardiaco de un ratón tratado con CMV-BikDD indicaba un nivel de expresión muy alto de BikDD a partir del promotor de CMV (FIG. 17A, panel superior izquierdo). Por el contrario, el tratamiento con CT90-BikDD inducía una expresión de BikDD relativamente débil en los tejidos cardiacos (FIG. 17A, panel superior derecho). No pudo detectarse una diferencia significativa en la densidad y nivel de expresión entre los especímenes de tumor del grupo de CT90-BikDD y CMV-BikDD (FIG. 17B). El control negativo usando BikDD codificantes no mostró tinción marrón en estos experimentos (FIG. 17A y 17B, paneles inferiores), indicando que las señales positivas en los grupos anticodificantes venían de la expresión de BikDD. Estos datos demuestran que el lipoplejo CT90-BikDD administrado sistémicamente puede dirigir la expresión selectiva de BikDD en tumor de mama. De forma importante, la expresión en órganos normales tales como el corazón es mucho menor en los ratones tratados con CT90-BikDD que en los ratones tratados con CMV-BikDD. Por tanto, en comparación con CMV-BikDD, CT90-BikDD posee una actividad antitumoral comparable y tendrá efectos secundarios mínimos inducidos por su expresión en tejidos normales.

ICB1 puede mediar la activación del promotor topolla mediante Cdk2/ciclina A específicamente en células de cáncer de mama

Para potenciar la actividad basal del promotor topolla en células de cáncer de mama, se liga con él un potenciador fuerte en una realización específica. Sin embargo, en ciertos aspectos, debido a la posible interferencia de algunos de los elementos reguladores en el promotor topolla, la adición del potenciador fuerte podría no conseguir una alta actividad basal y podría incluso perderse la especificidad por cáncer de mama (véase a continuación en la FIG. 26). Para desarrollar un TSP que posea tanto especificidad como una alta actividad basal en células de cáncer de mama, los presentes inventores razonaron que un elemento específico de cáncer de mama mínimo ligado con un potenciador tendría una oportunidad mucho más exitosa. Por tanto, se colocó para identificar un elemento específico de cáncer de mama en el promotor topolla. Con este fin, se exploró primero la posible señal específica de cáncer de mama para activar el promotor topolla y se buscó entonces el elemento en cis que mediaba esta señalización. La expresión de topolla está regulada positivamente durante la fase S y llega al máximo durante la G2/M (Woessner *et al.*, 1991). Puesto que el regulador del ciclo celular esencial Cdk2 está activado durante las fases S y G2 (Vermeulen *et al.*, 2003), los presentes inventores se preguntaron si la actividad del promotor topolla podría estar regulada positivamente por Cdk2. Con este fin, se examinó la regulación de cdk2 sobre la actividad del promotor topolla cotransfectando un mutante Cdk2 negativo dominante (Cdk2-dn) (van den Heuvel y Harlow, 1993) y un constructo informador del promotor topolla en un ensayo informador. Cdk2-dn suprimía la actividad del promotor topolla en tres células de cáncer de mama diferentes, pero no en células epiteliales de mama normales (184A1), células de cáncer de pulmón (A549) o hepatocitos no malignos (hígado de Chang) (Castagnetta *et al.*, 2003) (FIG. 25A). Puesto que Cdk2 se asocia con la ciclina E y la ciclina A en las fases G1 tardía y S, respectivamente, se investigó cuál podría activar el promotor topolla. La expresión de ciclina A inducía significativamente la activación del promotor topolla en células de cáncer de mama, pero no en otros tipos de células (FIG. 25B). Por el contrario, la ciclina E tenía un efecto mínimo sobre el promotor topolla en células de cáncer de mama (datos no mostrados). Estos datos sugieren que ciclina A/Cdk2 activan el promotor topolla de manera específica de cáncer de mama.

50 Siguiendo los resultados anteriores, el elemento sensible a ciclina A/Cdk2 en el promotor topolla podría ser el elemento específico de cáncer de mama potencial. Para identificar este elemento, se generó una serie de mutantes de delección del promotor topolla, incluyendo -182, -90, -60, que contenían 3, 1 y ningún ICB, respectivamente (FIG. 25C) (Adachi *et al.*, 2000; Falck *et al.*, 1999; Hochhauser *et al.*, 1992). Se examinaron sus respuestas a la activación por ciclina A en la línea de células de cáncer de mama SK-BR3 (FIG. 25D, panel izquierdo). La ciclina A puede activar el promotor completo, así como sus mutantes de delección -182 y -90, que albergan al menos un ICB (-572, -182 y -90 en el panel izquierdo de la FIG. 2D, $p < 0,05$), pero no el mutante de delección -60, que carece de ICB (-60 en el panel izquierdo de la FIG. 2D). Se obtuvieron resultados similares cuando se efectuaron estos experimentos en otras dos líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-468 y MDA-MB-231 (datos no mostrados), indicando que los ICB podrían ser importantes para medir la señal de ciclina A. Este punto estaba apoyado adicionalmente por el hecho de que la mutación de ICB1 en el promotor topolla completo (FIG. 2C, el inferior) daba como resultado la mayor reducción en la respuesta ante ciclina A (FIG. 2E, panel derecho), sugiriendo que ICB1 en el promotor topolla

es necesario para una respuesta completa ante la activación con ciclina A/cdk2, y puede representar un elemento específico de cáncer de mama mínimo.

Para validar el papel del ICB1 en la mediación de la especificidad del cáncer de mama del promotor topolla, se examinó la actividad del mutante de delección -90 en un panel de líneas celulares, puesto que contiene solo un sitio ICB. De forma similar al promotor completo, la actividad del promotor -90 era mayor en la mayoría de líneas de cáncer de mama que en los demás tipos de células (FIG. 25E, panel superior), indicando que retiene especificidad por cáncer de mama. Sin embargo, la relación de actividad del promotor -90 al promotor de CMV (-90/CMV) mostró de nuevo su baja actividad basal en células de cáncer de mama (< 0,5% en el panel inferior de la FIG. 25E). Puesto que la mayoría de los demás elementos reguladores se han eliminado en el promotor -90, puede ser más fácil genomanipular para una mayor actividad basal en cáncer de mama y retener la especificidad.

El promotor CT90, promotor -90 de topolla potenciado con la secuencia potenciadora del promotor de CMV, posee una actividad específica más potente en células de cáncer de mama *in vitro* e *in vivo*

Para potenciar la actividad basal en células de cáncer de mama, se conectó la secuencia potenciadora del promotor de CMV (potenciador de CMV) (Xu *et al.*, 2001) con promotores que albergaban tres ICB; el promotor topolla completo y sus mutantes de delección -182 y -90. Los promotores combinados se designaron como CT572, CT182 y CT90, respectivamente (FIG. 26A). De forma interesante, entre estos promotores combinados, el CT90 tiene la mayor actividad en células de cáncer de mama respecto a las células 184A1 normales (FIG. 26B, la actividad informadora se muestra en escala logarítmica). Además, la actividad de CT90 es comparable con la del promotor de CMV en células de cáncer de mama (FIG. 26C). CT572 y CT182 tienen una menor especificidad por células de cáncer de mama que CT90 (FIG. 26B), y sus actividades se potenciaron en un grado muy limitado (FIG. 26C), sugiriendo que algún elemento distinto de ICB1 del promotor topolla puede interferir con la actividad potenciadora de CMV.

Para ensayar si CT90 posee suficiente especificidad y actividad para la terapia génica de liposomas sistémicos, se examinó adicionalmente su actividad *in vivo*. Los constructos de luciferasa activados por el promotor CT90 o de CMV (CT90-luc y CMV-luc, respectivamente) se complejaron con liposomas de DOTAP:col, y se inyectaron entonces por vía intravenosa en ratones portadores del xenoinjerto de cáncer de mama MDA-MB-231. Se determinó la actividad promotora en los tejidos normal y tumoral mediante un ensayo informador (paneles superiores de la FIG. 26D). Como se menciona anteriormente, cuando se administra un complejo catiónico de liposoma-ADN mediante inyección i.v. a un animal, el pulmón y corazón captarán una porción esencial de los liposomas, dando como resultado un mayor nivel de expresión en estos dos órganos (Barron, 1999; Li *et al.*, 1998; Lu *et al.*, 2002; Templeton *et al.*, 1997). Igualmente, la biodistribución de actividades informadoras a partir de CMV-luc mostró un patrón similar: máximo en pulmón, segundo y tercero más alto en corazón e hígado y más bajo en todos los demás tejidos (FIG. 26D, paneles superiores). Esto indica que la actividad informadora de CMV-luc representa la eficacia de suministro génico de liposomas en los modelos animales. Para evaluar la especificidad de CT90 *in vivo*, se normalizó la eficacia de captación de liposomas en diferentes tejidos (Barron, 1999; Li *et al.*, 1998; Lu *et al.*, 2002; Templeton *et al.*, 1997) calculando la relación de actividad de promotor CT90 a CMV (CT90/CMV en los paneles inferiores de la FIG. 26D). La actividad de CT90 normalizada era mayor en el tumor, pero mucho menor en los órganos normales, especialmente en los órganos captadores de liposomas principales corazón, pulmón e hígado (FIG. 26D). Se observó una biodistribución similar de la actividad de CMV-luc y CT90-luc en otro modelo de ratón que porta un xenoinjerto de cáncer de mama MDA-MB-468 (datos no mostrados). Cuando se usó otro SN liposómico (Li *et al.*, 2003; Zou *et al.*, 2002) para suministrar el constructo de ADN, el CT90 seguía mostrando una especificidad de tumor similar (datos no mostrados). Ha de mencionarse aquí que la eficacia de suministro liposómico a bazo, riñón y músculo es mucho menor que a pulmón, corazón e hígado. Por lo tanto, en estos experimentos, la expresión del gen suministrado a los tres últimos órganos es mínima y probablemente despreciable en comparación con la actividad promotora. Para descartar la influencia de la eficacia de suministro génico, se suministra CMV-luc o CT90-luc mediante un liposoma de DOTAP:col a ratones portadores de tumor MDA-MB-231 mediante inyección intratumoral. Las actividades luciferasa del promotor CT90 siguen siendo más altas en tumor, y más bajas en pulmón o corazón, que las del promotor de CMV (FIG. 26E), indicando que CT90 es un promotor específico de tumor *in vivo*. De forma interesante, la especificidad por cáncer de mama y la actividad de CT90 *in vivo* son mayores que *in vitro* (FIG. 26C y 26D). Dicho fenómeno de que el suministro liposómico *in vivo* aumente la especificidad del promotor en comparación con el suministro *in vitro* se ha observado también en otro estudio (Lu *et al.*, 2002). Estos resultados demuestran que CT90 es un promotor específico de cáncer de mama fuerte que es adecuado para orientar a cáncer de mama en un entorno de terapia génica.

EJEMPLO 2

55 EXPRESIÓN ESPECÍFICA DE CÁNCER PANCREÁTICO

Los presentes inventores utilizaron secuencias promotoras específicas de cáncer pancreático para controlar la expresión de un polinucleótido que codifica un polipéptido Bik mutante. Se describen en este ejemplo procedimientos y composiciones ejemplares dirigidos a este objetivo.

Líneas celulares

Se obtuvieron las líneas celulares de cáncer pancreático (PANC-1, CAPAN-1 y AsPC-1), cáncer de próstata (LNCaP y PC-3), fibroblastos pulmonares normales inmortalizados (WI-38) y células epiteliales mamarias (184A1) humanas a partir de la American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD). Las células pancreáticas humanas inmortalizadas E6E7 se proporcionaron amablemente por el Dr. Paul Chiao (Universidad de Texas, M. D. Anderson Cancer Center, Houston, TX). Se usaron también células de hígado de Chang y la línea celular de cáncer de ovario SKOV3.ip1. Se cultivaron células PANC-1, CAPAN-1, AsPC-1, WI-38 y SKOV3.ip1 y de hígado de Chang con medio DMEM/F12 suplementado con suero fetal bovino al 10% (FBS), penicilina (100 unidades/ml) y estreptomina (100 mg/ml) (Invitrogen, Carlsbad, CA). Se mantuvieron las células LNCaP y PC-3 en medio RPMI 1640 (Invitrogen) con FBS al 10%, penicilina y estreptomina. Se mantuvieron las células 184A1 en medio de crecimiento de epitelio mamario completo (MEGM) (Cambrex, Walkersville, MD) y las células E6E7 en Keratiocyte-SFM suplementado con factor de crecimiento epidérmico de extracto de pituitaria (Invitrogen).

Constructos

Se obtuvieron los promotores CCKAR (-726 a + 1; cebadores CCKAR-p1 y CCKAR-p2), el promotor uPAR (-812 a +1; cebadores uPAR-p1 y uPAR-p2), el promotor RDC-1 (-881 a +1; cebadores RDC-p1 y RDC-p2), el promotor CTRB1 (-946 a +1; cebadores CTRB1-p1 y CTRB1-p2) y el promotor CPA1 (-1010 a +108; CPA1-p1 y CPA1-p2) mediante amplificación por PCR de ADN genómico de PANC-1 usando los cebadores mostrados en la Tabla 2.

Tabla 2: Secuencia de los promotores específicos de cáncer pancreático potenciales

CCKAR-p1:	5'-AGGACCCAGGTACCTATGTTCAAAGTGCCTC-3' (SEQ ID NO:1)
CCKAR-p2:	5'-CCTTGCCTGCTGCTTTCCACCAAGTGCT-3' (SEQ ID NO:2)
RDC1-p1:	5'-CAGGTTGGGAAAATGGTCAGCCCTCCTGAAA-3' (SEQ ID NO:3)
RDC-p2:	5'-CGTTCTGAGGCGGGCAATCAAATGACCTAT-3' (SEQ ID NO:4)
uPAR-p1	5'-CCCGCTAGCCTAATTTTATTTTATTTTAATTC-3' (SEQ ID NO:5)
uPAR-p2	5'-CCCCTCGAGGTATTTTGGAAAATGTCCTTATCTAG-3' (SEQ ID NO:6)
REG1A-p1	5'-CGCACGCGTAGGCATCAGCTCTACAATTC-3' (SEQ ID NO:7)
REG1A-p2	5'-AGCCTCGAGCAGGATCTGAGATAAGAACCACG-3' (SEQ ID NO:8)
CTRB1-p1	5'-ACGGCGCTCGAGTCCATCAGTTCTCATC-3' (SEQ ID NO:9)
CTRB1-p2	5'-TACTTAAGCTTGTGTAGGACGCCTGTC-3' (SEQ ID NO:10)

Se subclonaron estos fragmentos de PCR en pCRII-TOPO (Invitrogen) generando pCRII-TOPO-CCKAR, pCRn-TOPO-uPAR, pCRII-TOPO-RDC1 y pCRII-TOPO-CTRB. Se verificaron todos los productos de PCR mediante secuenciación. Se insertaron entonces los fragmentos promotores en los sitios KpnI/Xho1 del pGL3 básico (Promega, Madison, WI), obteniéndose los plásmidos pGL3-CCKAR-Luc, pGL3-uPAR-Luc, pGL3-RDC1-Luc y pGL3-CTRB1-Luc. El potenciador/promotor de CMV controlaba el plásmido pCMV-Luc del gen de luciferasa de luciérnaga (compuesto por el promotor de CMV clonado en el vector pGL3). El plásmido pRL-TK, que comprende un gen informador de luciferasa de *Renilla*, se obtuvo en Promega.

Se liberó el fragmento del potenciador WPRE de pGEM-3Z-WPRE (un generoso regalo del Dr. J. B Uney, Universidad de Bristol, Bristol, RU) mediante digestión con Asp718/Sall y se insertó en los sitios Small de pGL3-básico mediante ligamiento romo, produciendo el intermedio pGL3-Luc-WPRE. Se digirió el plásmido pGL3-básico con XbaI, se volvió romo con Klenow y se asoció con el fragmento de WPRE vuelto romo con Asp718/Sall del intermedio pGL3-Luc-WPRE, dando pGL3-Luc-WPRE. Se subclonó el fragmento CCKAR vuelto romo con SpeI/XhoI de pCRII-TOPO-CCKAR en el sitio de pGL3-Luc-WPRE vuelto romo con NheI/XhoI, dando como resultado pGL3-CCKAR-Luc-WPRE. Se subclonó el fragmento CCKAR vuelto romo con HindIII-NotI de pCRII-TOPO-CCKAR en el sitio vuelto romo con MscI/NheI de pGL3-TSTA-Luc (un regalo del Dr. M. Carey, UCLA School of Medicine, LA) (Zhang L, *et al.*, *Cancer Res* 2003), obteniéndose pGL3-CCKAR-TSTA-Luc-WPRE. Finalmente, se insertó el fragmento CCKAR de pCRII-TOPOCCKAR digerido con NotI/BglII en el mismo sitio de pGL3-CCKAR-TSTA-Luc-WPRE, produciendo pGL3-CCKAR-TSTA-Luc-WPRE (pGL3-CTP-Luc).

Transfección

Se sembraron células en placas de 12 pocillos a 40-50% de confluencia a 37°C con 5% de CO₂ en el correspondiente medio como se describe anteriormente 16 h antes de la transfección. Se transfectaron las células con el ADN de plásmido designado junto con pRL-TK como control interno, usando liposomas de DOTAP:col (de N. Templeton, Baylor College of Medicine, Houston, TX) según el procedimiento recomendado. Se usó el vector sin expresión, pGL3-básico, como control negativo. Para comparar las actividades de los elementos reguladores transcripcionales entre sí, se usó la misma cantidad molar de ADN de plásmido.

Modelos animales ortotópicos de cáncer pancreático y suministro de ADN de plásmido sistémico

Se usaron como hospedadores de xenoinjertos ratones BALB/c nu/un hembra atímicos (Charles River Laboratories, Wilmington, MA) de 6-8 semanas de edad. Se mantuvieron los ratones en un entorno exento de patógenos específico, en cumplimiento de las normas del M.D. Anderson Cancer Center. Se tripsinaron células AsPC-1 en crecimiento de fase logarítmica y se lavaron dos veces con PBS. Para el modelo ortotópico, se anestesiaron los ratones con Aventin (Sigma) (Xie, *Mol. Endocrinol* 2004) y se dispusieron en posición supina. Se limpió el área del abdomen con etanol al 70% y se realizó una incisión en la línea media superior abdominal. Se extrajo el páncreas y se inyectaron por la vena de la cola 50 μ l de alícuotas de células AsPC-1 (1×10^6 células). Se cerró la incisión con clips quirúrgicos.

- 10 Se prepararon complejos de ADN:liposoma como se describe anteriormente (Templeton, *Nat. Biotech.* 1997). Brevemente, se diluyeron separadamente ADN y el conjunto de DOTOP:col en dextrosa al 5% en agua (D5W) a temperatura ambiente. Se añadió rápidamente la solución de ADN a la superficie de la solución de liposomas a igual volumen y se mezclaron pipeteando dos veces. Se realizó la preparación reciente 2 h antes de la inyección. Se inyectaron en los ratones atímicos en que los tumores alcanzaron aproximadamente 50 mm³ en el modelo ectópico, o en el mismo periodo de tiempo en el modelo ortotópico, 100 μ l de complejos de ADN:liposoma que contenían 50 μ g de ADN en la vena de la cola usando una aguja de calibre 29 una vez al día durante 3 días consecutivos. Se formaron imágenes *in vivo* de los ratones cada día después de la inyección y se sacrificaron 24 h después de la última inyección.

Ensayos de luciferasa

- 20 Se lisaron células transfectadas transitoriamente y se ensayó la actividad luciferasa usando el sistema de ensayo informador dual Luciferase® (Promega, Madison, WI), siguiendo el protocolo del fabricante, con un luminómetro TD 20/20 (Turner Designs, Sunnyvale, CA). Se definió la relación dual de luciferasa como la actividad de la luciferasa de luciérnaga de los plásmidos ensayados frente a la actividad luciferasa de *Renilla* de pRL-TK, expresada como la media de transfecciones por triplicado que se repitieron al menos 4 veces. Se presentó el porcentaje como comparación con la relación de actividad de CMV.

- 30 Para ensayar la actividad luciferasa derivada de tejido, se sacrificaron los animales y se diseccionaron. Se tomaron especímenes de tejido de tumores y otros órganos, incluyendo páncreas, pulmón, corazón, hígado, bazo, riñón, cerebro, intestino, músculo y ovario y demás, y se homogeneizaron con un homogeneizador PRO 250 (Pro Scientific, Inc., Monro, CT) en 300 μ l de tampón de lisis de luciferasa (Promega) que contenía cóctel inhibidor de proteína diluido 1/100 (Roche). Se centrifugaron los especímenes a 8.000 rpm durante 5 min y pusieron temporalmente en hielo. Se midió la actividad luciferasa de los sobrenadantes con un luminómetro Lumat LB9507 (Berthod, Bad Wildbad, Alemania) y se determinó la concentración de proteína usando el sistema de ensayo de proteína compatible con detergente (CD) (Bio-Rad, Hercules, CA) con lector de microplacas MRX (Dyex technologies, Inc., Chantilly, VA). Los resultados de luminiscencia se reseñan como unidades lumínicas relativas (ULR) por mg de proteína.

Formación de imágenes y cuantificación de los datos de bioluminiscencia

- 40 Se anestesiaron ratones con Aventin. Se inyectó por vía intraperitoneal D-luciferina (Xenogen, Alameda, CA) (30 mg/ml en PBS) a 150 mg/kg de masa corporal de ratón. 10 min después de la inyección de D-luciferina, se formaron imágenes de los ratones con un sistema de formación de imágenes IVIS™ (Xenogen), consistente en una cámara CCD enfriada montada en una cámara de especímenes opaca (cámara oscura), un controlador de cámara, un sistema de enfriamiento de cámara y un sistema informático basado en Windows. Se mantuvieron los parámetros de formación de imágenes para análisis comparativos. Se superpusieron las imágenes reflejadas en escala de grises y las imágenes coloreadas por bioluminiscencia y se analizaron usando el software Living Imaging versión 2.11 (Xenogen). Se seleccionó manualmente la región de interés (RDI) entre las regiones relevantes por la intensidad de señal. Se mantuvo constante el área de la RDI y se registró la intensidad como el recuento fotónico máximo en una RDI (Xie *et al.*, 2004). En algunos experimentos, después de la formación de imágenes se sacrificaron los animales y se retiraron los órganos de interés, se dispusieron en papel negro exento de bioluminiscencia y se formaron imágenes *ex vivo* durante 30 min.

- 50 La FIG. 9A ilustra constructos de promotores específicos pancreáticos. Las secuencias promotoras del receptor de colecistocinina humana A (CCKAR), el receptor acoplado con proteína G huérfano (RDC1), el receptor de activador de plasminógeno de tipo urocinasa (uPAR) y el quimotripsinógeno B1 (CTRB1) se amplificaron por PCR y se subclonaron en el plásmido informador pGL3-básico, regulando así la expresión del gen de luciferasa de luciérnaga. Se cotransfectaron transitoriamente las células con cantidades molares similares de ADN de plásmido con el control interno pRL-TK. Como se muestra en la FIG. 9B, 48 horas después se midió la relación de luciferasa dual y se muestra como ULR (en veces) normalizada por la luciferasa de *Renilla*.

Expresión específica de cáncer pancreático de un polinucleótido deseado

La FIG. 10A ilustra un diagrama esquemático de constructos basados en CCKAR y basados en CMV que contienen el gen informador de luciferasa de luciérnaga bajo el control del promotor CCKAR mínimo, con o sin WPRE, o

CCKAR/TSTA con o sin WPRE, o bajo el potenciador/promotor de CMV. Ga14VP2:VP2: El dominio transactivador temprano inmediato de VP16 de HSV1 tiene una alta potencia de activación cuando se fusiona con el dominio de unión a ADN GAL4. Para la secuencia G5E4T (SEQ ID NO: 22), G5 comprende 5 copias en serie del sitio de unión a ADN GAL4 de 17 pb cerca de los sitios de unión a ADN de consenso. E4T es E4TATA, que comprende el promotor mínimo E4 de adenovirus desde -38 hasta +38 respecto al sitio de inicio. La FIG. 10B demuestra la actividad de constructos transfectados transitoriamente en células de cáncer pancreático AsPC-1 y PANC-1. Se cotransfectaron transitoriamente las células con cantidades molares similares de ADN de plásmido con el control interno pR-LTK. 48 horas después, se midió la relación de luciferasa dual y se comparó entonces con la actividad de CMV presentada como porcentaje. Los datos representan la media de 4 experimentos independientes; barra, DE. La FIG. 10C muestra la especificidad de tejido de promotores combinados basados en CCKAR. Se cotransfectaron transitoriamente otras células cancerosas (LNCaP, PC-3, SKOV3.ip1, MDA-468) y células normales inmortalizadas (hígado de Chang, células WI-38, 184A1 y E6E7) con el control interno pRL-TK. 48 horas después, se midió la relación de luciferasa dual. Se presentó el porcentaje en comparación con la relación de actividad en AsPC-1.

Se muestra en la FIG. 11 la expresión transgénica *in vivo* en el modelo tumoral ortotópico de células AsPC después del suministro sistémico de ADN de plásmido CTP-Luc y CMV-Luc. La FIG. 11A muestra la formación de imágenes *in vivo* de ratones. Se inyectaron en ratones atímicos portadores de tumor AsPC-1 subcutáneo por la vena de la cola 50 µg de ADN en complejos de ADN (CTP-Luc o CMV-Luc):liposoma una vez al día durante tres días consecutivos. 24 h después de la última inyección, se anestesiaron los ratones y se formaron imágenes durante 5 min usando un sistema de formación de imágenes IVIS™ 10 minutos después de la inyección i.p. de D-luciferina. Se muestra la formación de imágenes representativa de los ratones. La FIG. 11B muestra la actividad luciferasa de luciérnaga en extractos de tejido, que se cuantificó con un luminómetro y se expresó como unidades relativas de luciferasa por mg de proteína total. Se calculó la relación comparando el nivel de actividad luciferasa de ratones CTP con la de ratones CMV.

La FIG. 18 muestra que el promotor de receptor de colecistocinina humana de tipo A (CCKAR) es potencialmente específico de cáncer pancreático. En la FIG. 18A, se amplificaron por reacción en cadena de la polimerasa los constructos de candidatos a promotor específico de cáncer pancreático CCKAR, receptor acoplado con proteína G huérfano (RDC1), receptor de activador de plasminógeno de tipo urocinasa (uPAR) y quimotripsinógeno B1 (CTRB1) y se subclonaron en el plásmido informador pGL3-básico, activando un gen de luciferasa de luciérnaga. En la FIG. 18B, se cotransfectaron transitoriamente células PANC-1 y AsPC-1 con el ADN de plásmido indicado y pRL-TK. 48 horas después, se midió la relación de luciferasa dual y se mostró como unidades lumínicas relativas (ULR) normalizadas por el control de luciferasa de *Renilla*.

La FIG. 19 demuestra que los promotores basados en el receptor de colecistocinina de tipo A (CCKAR) genomanipulados son más activos y retienen la especificidad por cáncer pancreático. En la FIG. 19A, se muestra un diagrama esquemático de constructos basados en CCKAR genomanipulados que incluyen pGL3-CCKAR-Luc-WPRE (CCKAR-P-Luc), pGL3-CCKAR-TSTA-Luc (CCKAR-T-Luc) y pGL3-CCKAR-TSTA-Luc-WPRE (CTP-Luc). En la FIG. 19B, se muestra la actividad de promotores basados en CCKAR en células de cáncer pancreático. Se cotransfectaron transitoriamente células AsPC-1, PANC-1 y PanO2 con ADN de plásmido y pRL-TK. 48 horas después, se midió la relación de luciferasa dual. Se muestra el porcentaje respecto a la actividad del promotor de CMV. Los datos representan la media de 4 experimentos independientes. En la FIG. 19C, se muestra la especificidad de tejido de los promotores combinados basados en CCKAR. Se cotransfectaron transitoriamente líneas celulares de cáncer no pancreático (LNCaP, PC-3, SKOV3.ip1, MDA-MB-468 y HeLa) y normales e inmortalizadas (WI-38, 184A1 y E6E7) con los plásmidos indicados y pRL-TK. 48 horas después, se midió la relación de luciferasa dual. Se muestra el porcentaje respecto a la actividad en células AsPC-1.

La FIG. 20 muestra que el combinado de receptor de colecistocinina de tipo A (CCKAR)-activación transcripcional en dos etapas (TSTA)-elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis de marmota (WPRE), CTP, es robusto y específico de cáncer pancreático en un modelo animal ortotópico. Se administraron a ratones atímicos portadores de tumores AsPC-1 ortotópicos 50 µg de ADN en complejos de ADN:liposoma por la vena de la cola una vez al día durante 3 días consecutivos. En la FIG. 20A, se muestra la formación de imágenes *in vivo* de ratones. Se anestesiaron los ratones y se formaron imágenes durante 5 min usando un sistema de formación de imágenes IVIS 10 minutos después de la inyección intraperitoneal de D-luciferina. En la FIG. 20B, se muestra la distribución en tejido de la expresión de luciferasa. Se diseccionaron especímenes de tejido y tumores y órganos como se han mostrado y se midió la actividad luciferasa con un luminómetro. Se expresaron los datos como unidades relativas de luciferasa por mg de proteína total.

La FIG. 21 proporciona la expresión de Bik mutante (BikDD) activada por CTP que elimina eficaz y específicamente células de cáncer pancreático. En la FIG. 20A, se muestra un diagrama esquemático de constructos de expresión con la cadena principal de pUK21: CMV-BikDD, pUK21-CMV-BikDD; CTP-BikDD, pUK21-CTP-BikDD. En la FIG. 20B, se proporcionan los efectos de eliminación de BikDD activada por CMV o CTP. Se cotransfectó un panel de células de cáncer pancreático (AsPC-1, PANC-1, MDA-Panc28 y PanO2) y células epiteliales pancreáticas humanas inmortalizadas E6E7 con 2 µg de pUK21 (control negativo), pUK21-CMV-BikDD (control positivo) o pUK21-CTP-BikDD, más 100 ng de pGL3-CMV-Luc. 48 horas después de la transfección, se formaron imágenes de la actividad luciferasa durante 2 min usando un sistema de formación de imágenes IVIS después de una incubación de 5

minutos con D-luciferina 5 ng/ml. Se mostraron las imágenes representativas en el panel superior. Se calculó el porcentaje de señal en comparación con el control negativo (fijado a 100%) (panel inferior).

5 En realizaciones particulares de la presente invención, se generan de forma similar constructos que comprenden estos promotores específicos pancreáticos ejemplares ligados operativamente con un polinucleótido que codifica un Bik mutante, seguido de la introducción en un mamífero necesitado de tratamiento terapéutico de cáncer pancreático, basándose en procedimientos análogos a los descritos en la presente memoria. Los parámetros se optimizan fácilmente por los especialistas en la materia, tales como el modo de suministro, la concentración de la composición y demás.

10 En realizaciones adicionales de la presente invención, se estrechan adicionalmente los elementos específicos de cáncer pancreático para identificar segmentos aún menores en ellos que retengan la actividad de expresión específica de cáncer pancreático. Por ejemplo, pueden prepararse constructos de delección de estas regiones respectivas, y se ensaya su especificidad de tejido para identificar los segmentos menores que mantienen la capacidad de dirigir la expresión en tejido de cáncer pancreático.

EJEMPLO 3

15 EXPRESIÓN ESPECÍFICA DE CÁNCER DE PRÓSTATA

Los presentes inventores utilizaron secuencias promotoras específicas de cáncer de próstata para controlar la expresión de un polinucleótido que codifica un polipéptido Bik mutante. Se describen en este ejemplo procedimientos y composiciones ejemplares dirigidos a este objetivo.

20 **Desarrollo de terapia génica orientada para cáncer de próstata refractario a hormonas metastásico y recurrente**

En realizaciones específicas, se utiliza un promotor que regula la expresión de Bik mutante de manera tanto dependiente de andrógeno como independiente de andrógeno. Un especialista en la materia reconocerá que, en la terapia génica de cáncer de próstata, se han desarrollado recientemente promotores específicos de próstata como PSA (Greenberg, DeMayo *et al.*, 1995; Spitzweg, Zhang *et al.*, 1999; Latham, Searle *et al.*, 2000; Wu, Matherly *et al.*, 2001), probasina (Greenberg, DeMayo *et al.*, 1995; Zhang, Thomas *et al.*, 2000; Wen, Giri *et al.*, 2003) y hK2 (Xie, Zhao *et al.*, 2001). Las actividades de estos promotores son dependientes de andrógeno. Para pacientes con cáncer de próstata metastásico avanzado, la ablación hormonal es la elección de terapia principal. Sin embargo, después de la castración química, las glándulas suprarrenales secretan grandes cantidades de los esteroides precursores inactivos deshidroepiandrosterona y androstenodiona como fuente compensatoria de andrógeno (Denis, 1996).
 25 Además, la mayoría de células de adenocarcinoma de próstata independientes de andrógeno regulan positivamente la expresión de AR, seleccionan los AR mutantes con sensibilidad a esteroide aumentada o especificidad por esteroide reducida o regulan positivamente la señalización de factor de crecimiento, que puede estimular la actividad de AR (Feldman y Feldman, 2001). Además, los efectos secundarios significativos asociados a esta terapia han conducido al uso más extendido de protocolos de ablación intermitente, en que los pacientes se tratan con agonistas de hormona liberadora de hormona luteinizante durante hasta 12 meses antes de suspender la terapia hasta que empieza a aparecer progresión del tumor (Bruchofsky, Klotz *et al.* 2000). Por tanto, para numerosas etapas de la enfermedad, los pacientes están a menudo hormonalmente intactos, permitiendo el uso de vectores sensibles a andrógeno para dirigir la expresión de genes terapéuticos al tejido prostático.

El cáncer de próstata independiente de andrógeno (CPIA) es una forma no tratable de cáncer de próstata en que se ha superado la dependencia normal de los andrógenos para el crecimiento y la supervivencia. El CPIA se selecciona para terapia de ablación androgénica (Feldman y Feldman, 2001). Se propone seleccionar para terapia los citoblastos epiteliales independientes de andrógeno y AR malignos que “pululan” en la próstata normal. Un subconjunto de estas mutaciones de AR se cartografía en el dominio de unión a ligando (LBD) y se propone que causan resistencia al alterar la respuesta del receptor de forma que los ligandos no canónicos tales como estrógeno o hidrocortisona, o incluso antagonistas de receptor androgénico tales como flutamida, se comportan como agonistas (Chen, Welsbie *et al.* 2004). En estas condiciones, es muy crítico para el desarrollo de un promotor independiente de andrógeno en terapia génica suicida erradicar completamente el cáncer de próstata refractario a hormonas metastásico y recurrente.

El promotor de transcriptasa inversa de telomerasa humana (hTERT) es específico de cáncer

50 Durante los últimos años, la enzima transcriptasa inversa de telomerasa, responsable de mantener el ADN telomérico en el extremo de los cromosomas, ha sido objeto de descubrimientos experimentales que la asocian con una bala mágica contra el cáncer. Los telómeros son elementos esenciales que protegen a los extremos de los cromosomas de la degradación y las fusiones de extremo con extremo, redistribuciones y pérdida de cromosoma. La ausencia de actividad telomerasa en células somáticas humanas evita la compensación por la pérdida de ADN telomérica que proviene de la incapacidad de la ADN polimerasa convencional de replicar totalmente una molécula de ADN lineal. El acortamiento resultante de los telómeros limita el intervalo de vida proliferativa celular y la senescencia celular. La inmortalización celular *in vitro* y la progresión tumoral están asociadas con, y pueden depender de, la activación de telomerasa.

Hay mucho en la bibliografía sobre la actividad telomerasa en diferentes pacientes con cáncer. Por ejemplo, se ha encontrado generalmente expresión de telomerasa en un 80-100% del cáncer humano, pero casi todas las células normales son negativas excepto las células de esperma o células de alta proliferación. En cáncer de próstata, aproximadamente un 84% de los carcinomas de próstata y un 100% de las líneas de cáncer de próstata humano son positivas de hTERT (Vasef, Ross *et al.* 1999). Recientemente, se ha usado el promotor hTERT para terapia génica del cáncer, así como para terapia génica de cáncer de próstata (Gu, Andreeff *et al.* 2002; Kim, Kim *et al.* 2003; Irving, Wang *et al.* 2004).

La amplificación transcripcional en dos etapas (TSTA) aumenta significativamente la expresión génica

El promotor hTERT aumenta la seguridad y eficacia de la terapia génica. Sin embargo, la actividad de este promotor hTERT no modificado es mucho más débil que la de promotores basados en virus no específicos de tejido usados habitualmente, tales como el promotor de citomegalovirus (CMV) (Cong, Wen *et al.* 1999; Gu, Andreeff *et al.* 2002; Komata, Kondo *et al.* 2002). Uno de los enfoques de amplificación que usa la proteína de fusión GAL4-VP16, denominado enfoque de amplificación transcripcional en dos etapas (TSTA), puede usarse potencialmente para aumentar la actividad transcripcional de promotores celulares (Iyer, Wu *et al.* 2001; Zhang, Adams *et al.* 2002). En este sistema, la primera etapa implica la expresión específica de tejido de la proteína de fusión GAL4-VP16. En la segunda etapa, GAL4-VP16 a su vez activa la expresión del gen diana bajo el control de elementos sensibles a GAL4 en un promotor mínimo. El uso de TSTA puede conducir potencialmente a niveles amplificados de expresión transgénica.

WPRE es un potenciador útil

Para aumentar la actividad de los promotores específicos de tejido, los presentes inventores y otros usaron el potenciador de CMV fusionado con el promotor específico de tejido mínimo. Aunque aumentó la actividad, se redujo la especificidad de tejido (no publicado y (Latham, Searle *et al.*, 2000)). Para enfrentarse a este asunto, los presentes inventores utilizaron el elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis de marmota (WPRE), que implica la modificación de la poliadenilación de ARN, la exportación de ARN y/o la traducción de ARN (Donello, Loeb *et al.*, 1998). La potenciación de WPRE apareció tanto durante la expresión transitoria en vectores no víricos como en vectores víricos (Loeb, Cordier *et al.*, 1999; Glover, Bienemann *et al.* 2002) y cuando el gen se incorpora establemente al genoma de células diana sin pérdida de especificidad de tejido (Lipshutz, Titre *et al.* 2003). El WPRE clonado en la orientación codificante entre el gen diana y la secuencia de poli(A) estimulaba de 2 a 7 veces más expresión de luciferasa *in vitro* y de 2 a 50 veces *in vivo* que sin el uso de WPRE (Zufferey, Donello *et al.*, 1999; Lipshutz, Titre *et al.*, 2003). Además, la expresión transgénica a largo plazo puede estar mediada por vectores adenovíricos que contienen WPRE (Glover, Bienemann *et al.*, 2003). Por lo tanto, el WPRE es una herramienta eficaz para aumentar y prolongar la expresión de transgenes en terapia génica.

TSTA y WPRE potencian la actividad del promotor hTERT

Para determinar si TSTA y WPRE potencian la actividad del promotor hTERT, los presentes inventores subclonaron en primer lugar una serie de promotores combinados basados en hTERTp que contenían TSTA y WPRE. Se amplificó por PCR el fragmento de hTERTp (nt -378 a +56) (Takakura, Kyo *et al.*, 1999) a partir de extractos de ADN de células LNCaP. Se subclonó el fragmento de hTERTp en el plásmido pGL3-básico para activar el gen de luciferasa de luciérnaga, conduciendo a pHERTp-Luc. Se insertó entonces WPRE en pHERTp-Luc-Luc, dando como resultado pHERTp-Luc-WPRE. Para emplear el sistema TSTA, se sustituyó hTERTp por el promotor PSA del plásmido pTSTA (Zhang, Johnson *et al.*, 2003), produciendo pHERTp-TSTA-Luc. Finalmente, se obtuvo el plásmido pHERTp-TSTA-Luc-WPRE insertando el fragmento de WPRE en pHERTp-TSTA-Luc.

Los promotores basados en hTERTp fusionados con ARR2 pueden estimularse con andrógeno

Se ensaya la actividad de diferentes promotores combinados en células de cáncer de próstata positivas de AR y negativas de AR, así como células endoteliales humanas normales (HUVEC), que se cotransfectaron transitoriamente con cantidades molares similares de ADN de plásmido con el control interno pRL-TK. Se usó pGL3-básico sin potenciador/promotor para el control negativo. 48 horas después, se midió la relación de luciferasa dual y se comparó entonces con la actividad de CMV presentada como porcentaje.

En particular, se cotransfectaron transitoriamente células LNCaP o células PC-3 con cantidades molares similares de ADN de plásmido con el control interno pRL-TK. 48 horas después, se midió la relación de luciferasa dual y se comparó entonces con la actividad de CMV presentada como porcentaje. El dato representa la media de 4 experimentos independientes; barra, DE. La FIG. 12C muestra la especificidad de tejido de los combinados basados en hTERTp. Se cotransfectaron transitoriamente las células de fibroblasto pulmonar WI-38 con los plásmidos indicados y el control interno pRL-TK. 48 horas después, se midió la relación de luciferasa dual. Se presentó el porcentaje en comparación con la relación de la actividad en AsPC-1.

Como se muestra en la FIG. 12, el hTERTp es activo tanto en células LNCaP como en células PC-3, pero la actividad era muy débil en comparación con el potenciador/promotor de CMV. Sin embargo, el WPRE aumentó la actividad en aproximadamente 2 veces. Sorprendentemente, el sistema TSTA puede reforzar la actividad hasta un 67% de la actividad de CMV en células LNCaP y hasta un 90% en células PC-3. Para el sistema TSTA en

combinación con WPRE, la actividad es comparable con la de CMV en PC-3 y es incluso 1,5 veces mayor en células LNCaP. En contraposición, su actividad permanece indetectable en células WI-38 (datos no mostrados).

En la mayoría de casos cánceres de próstata recurrentes, el gen AR se amplifica y/o AR se sobreexpresa (Visakorpi T, *Nat. Genet.* 1995 (Chen, Welsbie *et al.* 2004)). Por lo tanto, debería mejorar también en gran medida el índice de eficacia si la actividad de este sistema pudiera estimularse con andrógeno. Para conseguir este objetivo, se fusionó el elemento ARR2 del plásmido ARR2PB (Zhang, Thomas *et al.* 2000; Xie, Zhao *et al.* 2001) con el promotor hTERTp de phTERTp-TSTA-Luc y phTERTp-TSTA-Luc-WPRE, produciendo el plásmido pARR2.hTERTp-TSTA-Luc y pARR2.hTERTp-TSTA-Luc-WPRE (FIG. 13A). Se cotransfectaron transitoriamente células LNCaP y células PC-3 con cantidades molares similares de ADN de plásmido con el control interno pRL-TK y se estimularon con concentraciones 0,01, 0,1, 1 y 10 nM del análogo androgénico no metabolizado R1881 durante dos días en medio que contenía FBS tratado con carbón/dextrano. Después de ello, se midió la relación de luciferasa dual y se comparó entonces con la actividad de CMV presentada como porcentaje, como se describe anteriormente. Como se esperaba, la actividad de los combinados ARR2.hTERTp-TSTA y ARR2.hTERTp-TSTA-WPRE aumentaba de manera dependiente de andrógeno en 10 veces más que CMV en células LNCaP, sin que hubiera un cambio significativo en células PC-3.

En realizaciones adicionales de la presente invención, se estrechan adicionalmente los elementos específicos de cáncer de próstata respectivos para identificar segmentos aún menores en ellos que retengan la actividad de expresión específica de cáncer de próstata. Por ejemplo, pueden prepararse constructos de delección de estas regiones respectivas, y se ensaya su especificidad de tejido para identificar los fragmentos menores que mantienen la capacidad de dirigir la expresión en tejido de cáncer de próstata.

TSTA y WPRE potencian la actividad del promotor hTERT

En la FIG. 22, se muestra la comparación de la actividad luciferasa de luciérnaga bajo el control del promotor de CMV y promotores combinados basados en hTERT. La FIG. 22A muestra un diagrama esquemático de constructos informadores. La FIG. 22B muestra que se cotransfectaron transitoriamente las líneas celulares de cáncer de próstata, LNCaP y PC-3, y de fibroblasto humano normal, WI-38, con ADN de plásmido informador y el vector de control interno pRL-TK. 48 h después, se midió la relación de luciferasa dual. Se muestran las actividades luciferasa (en veces) con respecto al promotor de CMV (fijado en 1). La actividad de hTERTp aumenta tanto en células LNCaP como PC-3 mediante el sistema TSTA, y se potencia adicionalmente por WPRE (FIG. 22B). En combinación con TSTA y WPRE, la actividad de hTERTp-TSTA-WPRE es comparable o incluso 1:5 veces mayor que la del promotor de CMV en células PC-3 y LNCaP, respectivamente. De forma importante, su actividad permanece latente en las células de fibroblastos pulmonares humanos WI-38 y en tejido normal del modelo de ratón, confirmado después adicionalmente.

El elemento ARR2 de acción en cis refuerza adicionalmente la actividad de hTERTp modificado con TSTA y WPRE en respuesta a la estimulación androgénica *in vivo*. En la mayoría de casos de cáncer de próstata recurrente o metastásico por CPDA o CPIA, se amplifica el gen AR y/o se sobreexpresa AR y sigue siendo capaz de unirse a andrógeno (o análogo androgénico) después de la unión al elemento sensible a andrógeno (ARE), dando como resultado la activación transcripcional (Chen *et al.*, 2004; Visakorpi *et al.*, 1995). A este respecto, el índice terapéutico debería mejorar en gran medida si el promotor contuviera un ARE, que se une a complejos de andrógeno (o análogo androgénico)/AR, conduciendo a la estimulación de la expresión génica terapéutica.

Para conseguir este objetivo, se fusionó el elemento ARR2 (elemento sensible a receptor de andrógeno 2), que deriva de ARR2PB (Xie *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2000), en dirección 5' con hTERTp en los sistemas recién construidos, generando ATT-Luc (pG13-ARR2.hTERTp-TSTA-Luc) y ATTP-Luc (pG13-ARR2.hTERTp-TSTA-Luc-WPRE) (FIG. 23A). Se usó ARR2PB-Luc (pG13-ARR2PB-Luc) como control y CMV-Luc como herramienta de referencia. Se cotransfectaron transitoriamente las células con los constructos y el vector de control interno pRL-TK y se incubaron con concentraciones crecientes del análogo androgénico R1881. Es más, las actividades de los combinados ATT y ATTP aumentaron de manera dependiente de andrógeno, hasta 15 y 25 veces más en células LNCaP de CPDA AR+ y hasta 2,8 y 5,5 veces más en células LAPC-4 de CPIA AR+, respectivamente, que la del promotor de CMV (FIG. 23B). ARR2 no interfiere con las actividades transcripcionales de hTERTp-TSTA y hTERTp-TSTA-WPRE en células PC-3 y LNCaP (FIG. 22B y FIG. 23B) y con su especificidad en células normales (datos no mostrados). En comparación con ATTP y ATT, ARR2PB es mucho menos activo en células AR+ (LNCaP y LAPC-4) y casi inactivo en AR- (PC-3 y DU145) (FIG. 23B). Por tanto, los ATTP y ATT recién generados son altamente activos en las cuatro líneas celulares ensayadas, cuyas actividades son comparables en células de CPIA AR- (PC-3 y DU145), y mucho más fuertes en células de CPDA AR+ (LNCaP) y de CPIA AR+ (LAPC-4) que la del promotor de CMV, y de forma importante permanecen latentes en células normales.

ATTP es robusto en xenoinjertos de CPDA y CPIA *in vivo*.

Para determinar adicionalmente si la actividad y especificidad de ATTP se mantenían *in vivo*, los presentes inventores establecieron modelos de ratón BALB/c nu/nu macho de xenoinjertos s.c. de LNCaP y PC-3. Se inyectaron por vía i.v. en ratones portadores de tumores LNCaP o PC-3 50 µg de pGL3-ATTP-Luc y pGL3-CMV-Luc en complejos de ADN:lípido una vez al día durante tres días consecutivos. Se formaron imágenes de ratones

portadores de tumores LNCaP *in vivo* con un sistema de formación de imágenes no invasivo (Xie *et al.*, 2004) durante 2 minutos cada día y se sacrificaron 24 h después de la última inyección. La formación de imágenes bioluminiscentes mostró puntos de luz muy brillante en la zona del tórax (pulmón/corazón) de los ratones tratados con CMV-Luc, pero casi nada en la misma zona de los ratones tratados con ATTP-Luc (FIG. 24A). Para caracterizar
5 adicionalmente la fuente de luz, se sacrificaron inmediatamente los ratones después de la formación de imágenes vivos, y se diseccionaron sus órganos principales para formar imágenes *ex vivo*. Los presentes inventores verificaron que el órgano más fotoemisor era el pulmón de ratones tratados con CMV-Luc, mientras que la señal de los pulmones de ratones tratados con ATTP-Luc era indetectable (FIG. 24B). Para aumentar la potencia de la señal prolongando el tiempo de fotoexcitación, se formaron inmediatamente imágenes de los tumores diseccionados
10 durante 10 min. Los tumores de ratones tratados con ATTP-Luc producían una señal mucho más fuerte que los de ratones tratados con CMV-Luc (P, 0,002) (FIG. 24C). Consistentemente con los resultados de formación de imágenes *in vivo* y *ex vivo*, las actividades luciferasa de pulmones y corazones de ratones tratados con CMV-Luc eran significativamente mayores que las de ratones tratados con ATTP-Luc. En contraposición, la actividad luciferasa de tumores de ratones tratados con ATTP-Luc era 14,5 veces mayor que la de los tumores de ratones con
15 CMV-Luc (P, 0,004) (FIG. 24E). El índice específico de cáncer (la actividad luciferasa de los tumores de pulmón) (Chen *et al.*, 2004) era de 14,3 el de ATTP-Luc, en contraposición con 0,012 para CMV-Luc en el modelo de tumor LNCaP. Debido al hecho de que las células PC-3 son AR-, la señal de los tumores PC-3 tratados con ATTP-Luc no era tan alta como la de los tumores LNCaP. Sin embargo, la señal de los tumores PC-3 de ratones tratados con ATTP-Luc seguía siendo más fuerte que la de los ratones tratados con CMV-Luc (FIG. 24D) y el índice específico de
20 cáncer (3,9) de ATTP-Luc sigue siendo mucho mejor (0,015) que el de CMV-Luc (datos no mostrados). Tomado en conjunto, el ATTP "quimérico" es capaz de dirigir un gen de interés a tumor de próstata (tanto AR+ como AR-) al menos tan eficazmente como el promotor de CMV en el cáncer de próstata AR-, y mucho más eficazmente en cáncer de próstata AR+, mientras que no hay casi expresión en células normales.

EJEMPLO 4

25 ENSAYO *IN VITRO* DE PROMOTORES ESPECÍFICOS DE CÁNCER

Se ensaya *in vitro* un constructo o constructos que comprenden los promotores de la invención ligados operativamente con un polinucleótido terapéutico respectivo. Por ejemplo, se seleccionan las secuencias de control en algunas realizaciones basándose en los datos generados anteriormente, que sugieren que la secuencia es eficaz en un tejido o célula deseado. En otras realizaciones, se seleccionan las secuencias de control sin el conocimiento
30 previo de su eficacia potencial. Se liga operativamente la secuencia de control para ensayar con una secuencia informadora, tal como aquella cuya expresión y/o producto génico pueda monitorizarse, incluyendo mediante color, luz o fluorescencia, por ejemplo. Los ejemplos de genes informadores incluyen luciferasa o β -galactosidasa. Pueden añadirse también al constructo secuencias de control adicionales de cualquier tipo, incluyendo secuencias de control transcripcional o postranscripcional, promotores mínimos y demás. El constructo para ensayar y sus uno o más
35 controles apropiados se introducen entonces en una célula deseada y se ensaya la expresión. En realizaciones particulares, el constructo para ensayar genera expresión a niveles tales como los determinados por el especialista en la materia por ser eficaces en la célula o tejido deseado en que reside.

EJEMPLO 5

ENSAYO *IN VIVO* DE PROMOTORES ESPECÍFICOS DE CÁNCER

40 Se ensayan en un estudio animal un constructo o constructos que comprenden los promotores de la invención ligados operativamente con un polinucleótido terapéutico respectivo en lo referente a su actividad antitumoral. Se suministra el constructo por un vector, tal como en un liposoma o en un plásmido o vector vírico, a modelos de ratón atímico para ensayar su actividad antitumoral. Una vez se demuestra la actividad antitumoral, se examina adicionalmente la toxicidad potencial usando ratones inmunocompetentes, seguido de ensayos clínicos.

45 En una realización específica, se ensaya en un animal la actividad inhibidora del crecimiento preferida de un constructo que comprende el promotor de la invención ligado operativamente con un polinucleótido terapéutico. Brevemente, y solo como ejemplo, se administran líneas celulares de cáncer de mama que sobreexpresan HER-2/neu (tales como SKBR3 y MDA-MB361) a la almohadilla grasa mamaria de ratones atímicos para generar un modelo de xenoinjerto de mama. Después de que los tumores alcancen un tamaño particular, se inyecta por vía
50 intravenosa el constructo de la presente invención o su control al ratón mezclado con un portador aceptable tal como liposomas. Se comparan los tamaños de tumores y la curva de supervivencia de estos tratamientos y se analizan estadísticamente. En una realización preferida, los constructos que comprenden los promotores de la invención inhiben preferiblemente el crecimiento de un tumor específico de tejido en comparación con p21 de tipo silvestre.

EJEMPLO 6

55 ENSAYO CLÍNICO CON PROMOTORES ESPECÍFICOS DE CÁNCER

Este ejemplo se refiere al desarrollo de protocolos de tratamiento humano que usan constructos que comprenden los promotores específicos de cáncer de la invención solos o en combinación con otros agentes anticancerosos. El tratamiento con fármaco anticanceroso usando constructos que comprenden los promotores específicos de cáncer

de la invención será útil en el tratamiento clínico de diversos cánceres. Dicho tratamiento será una herramienta particularmente útil para terapia antitumoral, por ejemplo, en el tratamiento de pacientes con los cánceres de mama, próstata y pancreático respectivos, tales como aquellos que son resistentes a los regímenes quimioterapéuticos convencionales.

- 5 Los diversos elementos de realización de un ensayo clínico, incluyendo el tratamiento y monitorización del paciente, serán conocidos por los especialistas en la materia en vista de la presente divulgación. La siguiente información se presenta como guía general para uso en el establecimiento de constructos que comprenden los promotores específicos de cáncer de la invención en ensayos clínicos.

- 10 Los pacientes con cánceres de mama, próstata o pancreático avanzados metastáticos elegidos para estudio clínico estarán típicamente en riesgo de desarrollar el cáncer, se habrán tratado anteriormente por el cáncer que está actualmente en remisión, o no habrán sido sensibles a al menos un ciclo de terapia convencional. En un protocolo clínico ejemplar, los pacientes pueden experimentar la colocación de un catéter de Tenckhoff, u otro dispositivo adecuado, en la cavidad pleural o peritoneal y experimentar un muestreo en serie de la efusión pleural/peritoneal. Típicamente, se deseará determinar la ausencia de loculación conocida de la cavidad pleural o peritoneal, niveles de creatinina menores de 2 mg/dl y niveles de bilirrubina menores de 2 mg/dl. El paciente debería exhibir un perfil de coagulación normal.

- 20 Con respecto a los constructos que comprenden los promotores específicos de cáncer de la invención y a otra administración de fármaco anticanceroso, puede disponerse un catéter Tenckhoff o dispositivo alternativo en la cavidad pleural o en la cavidad peritoneal, a menos que dicho dispositivo esté ya colocado en una cirugía anterior. Puede obtenerse una muestra de fluido pleural o peritoneal de modo que puedan valorarse y registrarse los valores iniciales de celularidad, citología, LDH y marcadores apropiados en el fluido (CEA, CA15-3, CA 125, PSA, p38 (formas fosforiladas y no fosforiladas), Akt (formas fosforiladas y no fosforiladas) y en las células (constructos que comprenden los promotores específicos de cáncer de la invención).

- 25 En el mismo procedimiento, pueden administrarse los constructos que comprenden los promotores específicos de cáncer de la invención solos o en combinación con otros fármacos anticancerosos. La administración puede ser en la cavidad pleural/peritoneal, directamente al tumor o de manera sistémica, por ejemplo. La dosis de partida puede ser aproximadamente de 0,05 mg/kg de peso corporal. Pueden tratarse 3 pacientes a cada nivel de dosis en ausencia de toxicidad de grado > 3. El aumento de dosis puede realizarse en incrementos del 100% (0,5 mg, 1 mg, 2 mg, 4 mg) hasta que se detecte toxicidad de grado 2 relacionada con el fármaco. Después de ello, el aumento de dosis puede proceder en incrementos del 25%. La dosis administrada puede fraccionarse igualmente en dos infusiones, separadas por 6 horas, si los niveles de endotoxina combinados determinados para el lote de constructos que comprenden los promotores específicos de cáncer de la invención y el lote de fármaco anticanceroso superan las 5 UE/kg para cualquier paciente dado.

- 35 Los constructos que comprenden los promotores específicos de cáncer de la invención y/u otra combinación de fármaco anticanceroso pueden administrarse durante un tiempo de infusión corto o a una velocidad de infusión estacionaria durante un periodo de 7 a 21 días. Los constructos que comprenden los promotores específicos de cáncer de la invención pueden administrarse solos o en combinación con el fármaco anticanceroso. La infusión administrada a cualquier nivel de dosis dependerá de la toxicidad alcanzada después de cada una. Por ello, si se alcanzó una toxicidad de grado II después de cualquier infusión individual, o en un periodo de tiempo particular para una infusión a velocidad estacionaria, las dosis adicionales deberían retenerse o detenerse la infusión a velocidad estacionaria a menos que mejore la toxicidad. Se administrarán dosis crecientes de constructos que comprenden los promotores específicos de cáncer de la invención, en combinación con un fármaco anticanceroso, a grupos de pacientes hasta que aproximadamente un 60% de los pacientes muestren toxicidad de grado III o IV inaceptable en cualquier categoría. Las dosis que son 2/3 de este valor podrán definirse como dosis segura.

- 45 El examen físico, medidas del tumor y ensayos de laboratorio deberían efectuarse, por supuesto, antes del tratamiento y en intervalos de aproximadamente 3-4 semanas después. Los estudios de laboratorio deberían incluir CBC, recuento diferencial y de plaquetas, análisis de orina, SMA-12-100 (ensayos funcionales hepáticos y renales), perfil de coagulación y cualquier otro estudio químico apropiado para determinar la extensión de la enfermedad o determinar la causa de los síntomas existentes. También deberían monitorizarse los marcadores biológicos apropiados en suero, por ejemplo, CEA, CA 15-3, p38 (formas fosforilada y no fosforilada) y Akt (formas fosforilada y no fosforilada), p185, etc.

- 55 Para monitorizar el transcurso de la enfermedad y evaluar las respuestas antitumorales, se contempla que se examinen en los pacientes los marcadores tumorales apropiados cada 4 semanas, si son inicialmente anormales, con CBC, recuento diferencial y de plaquetas dos veces por semana durante las 4 semanas y entonces, si no se ha observado mielosupresión, semanalmente. Si algún paciente tiene un mielosupresión prolongada, se recomienda un examen de médula ósea para descartar la posibilidad de invasión tumoral de la médula como causa de la pancitopenia. El perfil de coagulación debería obtenerse cada 4 semanas. Se efectuará un SMA-12-100 semanalmente. La efusión pleural/peritoneal puede muestrearse 72 horas después de la primera dosis, semanalmente después de ello durante los dos primeros ciclos, y entonces cada 4 semanas hasta la progresión o salida del estudio. Pueden valorarse la celularidad, citología, LDH y marcadores apropiados en el fluido (CEA, CA15-

3, CA 125, ki67 y ensayo Tunel para medir la apoptosis, Akt) y en las células (Akt). Cuando está presente la enfermedad medible, las medidas tumorales han de registrarse cada 4 semanas. Los estudios radiológicos apropiados deberían repetirse cada 8 semanas para evaluar la respuesta tumoral. Pueden repetirse espirometría y DLCO a las 4 y 8 semanas después del inicio de la terapia y en el momento en que termine la participación en el estudio. Puede efectuarse un análisis de orina cada 4 semanas.

Las respuestas clínicas pueden definirse por una medida aceptable. Por ejemplo, una respuesta completa puede definirse como la desaparición de toda la enfermedad medible durante al menos un mes. Mientras que una respuesta parcial puede definirse como un 50% o más de reducción de la suma de productos de los diámetros perpendiculares de todos los nódulos tumorales evaluables o al menos 1 mes sin sitios tumorales que muestren crecimiento. De forma similar, una respuesta mixta puede definirse como una reducción del producto de los diámetros perpendiculares de todas las lesiones medibles en un 50% o más con progresión en uno o más sitios.

PUBLICACIONES

- Adachi, N., Nomoto, M., Kohno, K. y Koyama, H. (2000). Gene, 245, 49-57.
- Anderson, L. M., Krotz, S., Weitzman, S. A. y Thimmapaya, B. (2000). "Breast cancer-specific expression of the *Candida albicans* cytosine deaminase gene using a transcriptional targeting approach". Cancer Gene Ther. 7, 845-852.
- Barron, L.G., Szoka Jr., F.C. (1999). "Non-viral vectors for gene therapy". Huang, L., Hung, M.-C., Wagner, E. (ed.). Academic Press: San Diego, CA, pág. 229-266.
- Bartke, T., Siegmund, D., Peters, N., Reichwein, M., Henkler, F., Scheurich, P. y Wajant, H. "p53 upregulates cFLIP, inhibits transcription of NF-kappaB-regulated genes and induces caspase-8-independent cell death in DLD-1 cells", Oncogene. 20: 571-80., 2001.
- Boyd, J. M., Gallo, G. J., Elangovan, B., Houghton, A. B., Malstrom, S., Avery, B. J., Ebb, R. G., Subramanian, T., Chittenden, T., Lutz, R. J. *et al.* "Bik, a novel death-inducing protein shares a distinct sequence motif with Bcl-2 family proteins and interacts with viral and cellular survival-promoting proteins", Oncogene. 11: 1921-8., 1995.
- Chen, C.D., D.S. Welsbie, C. Tran, S.H. Baek, R. Chen, R. Vessella, M.G. Rosenfeld y C.L. Sawyers, "Molecular determinants of resistance to antiandrogen therapy". Nat. Med., 2004. 10(1): pág. 33-39.
- Chen, J.S., J.C. Liu, L. Shen, K.M. Rau, H.P. Kuo, Y.M. Li, D. Shi, Y.C. Lee, K.J. Chang y M.C. Hung, "Cancer specific activation of the survivin promoter and its potential use in gene therapy". Cancer Gene Ther., 2004.
- Daniel, P. T., Pun, K. T., Ritschel, S., Sturm, I., Holler, J., Dorken, B. y Brown, R. "Expression of the death gene *Bik/Nbk* promotes sensitivity to drug- induced apoptosis in corticosteroid-resistant T-cell lymphoma and prevents tumor growth in severe combined immunodeficient mice", Blood. 94: 1100-7, 1999.
- Desagher, S., Osen-Sand, A., Montessuit, S., Magnenat, E., Vilbois, F., Hochmann, A., Journot, L., Antonsson, B. y Martinou, J. C. "Phosphorylation of bid by casein kinases I and II regulates its cleavage by caspase 8", Mol. Cell. 8: 601-11, 2001.
- Emami, K.H. y Carey, M. (1992) "A synergistic increase in potency of a multimerized VP16 transcriptional activation domain". EMBO J. 11: 5005-5012.
- Fuernkrantz, H.A., Schwob, J.E., y Lucas, J.J. (1991) "Differential issue localization of oviduct and erythroid transferrin receptors". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 7505-7508.
- Han, J., Sabbatini, P. y White, E. "Induction of apoptosis by human *Nbk/Bik*, a BH3-containing protein that interacts with E1B 19K", Mol. Cell. Biol. 16: 5857-64., 1996.
- Hochhauser, D., Stanway, C.A., Harns, A.L., Hickson, I.D. (1992) "Cloning and characterization of the 5' flanking region of the human topoisomerase II alpha gene". J. Biol. Chem. 267(26): 18961-5.
- Iyer, M., Wu, L., Carey, M., Wang, Y., Smallwood, A. y Gambhir, S.S. (2001). "Two-step transcriptional amplification as a method for imaging reporter gene expression using weak promoters". Proc. Natl. Acad. Sci. 98:14595-14600.
- Katabi, M. M., Chan, H. L., Karp, S. E. y Batist, G. (1999). "Hexokinase type II: a novel tumor-specific promoter for gene-targeted therapy differentially expressed and regulated in human cancer cells". Hum. Gene Ther. 10, 155-164.
- Klumpp, S. y Kriegstein, J. "Serine/threonine protein phosphatases in apoptosis", Curr. Opin. Pharmacol. 2: 458-62., 2002.
- Li, S., Rizzo, M.A., Bhattacharya, S. y Huang, L. (1998). Gene Ther., 5, 930-7.
- Li, Y.M., Wen, Y., Zhou, B.P., Kuo, H.P., Ding, Q. y Hung, M.C. (2003). Cancer Res., 63, 7630-3.

- Lu, H., Zhang, Y., Roberts, D. D., Osborne, C. K. y Templeton, N. S. (2002). "Enhanced gene expression in breast cancer cells in vitro and tumors in vivo". Mol. Ther. 6, 783-792.
- Maeda, T., J, O. W., Matsubara, H., Asano, T., Ochiai, T., Sakiyama, S. y Ta gawa, M. (2001). "A minimum cerbB-2 promoter-mediated expression of herpes simplex virus thymidine kinase gene confers selective cytotoxicity of human breast cancer cells to ganciclovir". Cancer Gene Ther. 8, 890-896.
- Mathai, J. P., Germain, M., Marcellus, R. C. y Shore, G. C. "Induction and endoplasmic reticulum location of BIK/NBK in response to apoptotic signaling by E1A and p53", Oncogene. 21: 2534-44., 2002.
- Mo, Y.Y., Ameiss, K.A. y Beck, W.T. (1998) "Overexpression of human DNA topoisomerase II alpha by fusion to enhanced green fluorescent protein". Biotechn. 25(6): 1052-7.
- Nettelbeck, D.M., Jerome, V. y Muller, R. (2000) "Gene therapy: designer promoters for tumour targeting". Trends Genet. 16: 174-181.
- Panaretakis, T., Pokrovskaja, K., Shoshan, M. C. y Grander, D. "Activation of Bak, Bax, and BH3-only Proteins in the Apoptotic Response to Doxorubicin", J. Biol. Chem. 277: 44317-26., 2002.
- Puthalakath, H. y Strasser, A. "Keeping killers on a tight leash: transcriptional and post-translational control of the pro-apoptotic activity of BH3-only proteins", Cell Death Differ. 9: 505-12, 2002.
- Qiao, J., Doubrovin, M., Sauter, B. V., Huang, Y., Guo, Z. S., Balatoni, J., Akhurst, T., Blasberg, R. G., Tjuvajev, J. G., Chen, S. H. y Woo, S. L. (2002). "Tumor-specific transcriptional targeting of suicide gene therapy". Gene Ther. 9, 168-175.
- Sadowski I, Ma J, Triezenberg S, Ptashne M. "GAL4-VP16 is an unusually potent transcriptional activator". Nature. 6 de octubre de 1988; 335(6190): 563-4.
- Sato, M., Johnson, M., Zhang, L., Zhang, B., Le, K., Gambhir, S.S., Carey, M., Wu, L. (2003) "Optimization of adenoviral vectors to direct highly amplified prostate-specific expression for imaging and gene therapy". Mol. Ther. 8(5): 726-737.
- Shindelman, J.E., Ortmeyer, a: E. y Sussman, H.H. (1981) "Demonstration of the Transferrin Receptor in human breast cancer tissue. Potential marker for identifying dividing cells". Int. J. Cancer 27: 329-334.
- Shterman, N., Kupfer, B. y Moroz, C: (1991) "Comparison of Transferrin Receptors, Iron Content and Isoferritin profile in normal and malignant human breast cell lines". Pathobiol. 59: 19-25.
- Templeton, N.S., Lasic, D.D., Frederik, P.M., Strey, H.H., Roberts, D.D. y Pavlakis, G.N. (1997). Nat Biotechnol., 15, 647-52.
- Theodorakis, P., Lomonosova, E. y Chinnadurai, G. "Critical requirement of BAX for manifestation of apoptosis induced by multiple stimuli in human epithelial cancer cells", Cancer Res. 62: 3373-6, 2002.
- Verma, S., Zhao, L. y Chinnadurai, G. "Phosphorylation of the Pro-Apoptotic Protein BIK: Mapping of Phosphorylation sites and Effect on Apoptosis", J. Biol. Chem. 17: 17, 2000.
- Visakorpi, T., E. Hyytinen, P. Koivisto, M. Tanner, R. Keinanen, C. Palmberg, A. Palotie, T. Tammela, J. Isola y O.P. Kallioniemi, "In vivo amplification of the androgen receptor gene and progression of human prostate cancer". Nat. Genet., 1995, 9(4): pág. 401-6.
- Wang, H. G., Pathan, N., Ethell, I. M., Krajewski, S., Yamaguchi, Y., Shibasaki, F., McKeon, F., Bobo, T., Franke, T. F. y Reed, J. C. "Ca²⁺-induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD", Science. 284: 339-43., 1999.
- Xie X, Luo Z, Slawin KM, Spencer DM. "The EZC-prostate model: noninvasive prostate imaging in living mice". Mol. Endocrinol. marzo de 2004; 18(3): 722-32.
- Xie, X., X. Zhao, Y. Liu, J. Zhang, R.J. Matusik, K.M. Slawin y D.M. Spencer, "Adenovirus-mediated tissue-targeted expression of a caspase-9-based artificial death switch for the treatment of prostate cancer". Cancer Res., 2001. 61 (18): pág. 6795-804.
- Zhang, L., Adams, J.Y., Billick, E., Ilagan, R., Iyer, M., Le, K., Smallwood, A., Gambhir, S.S., Carey, M., Wu, L. (2002) "Molecular engineering of a two-step transcription amplification (TSTA) system for transgene delivery in prostate cancer". Mol. Ther. 5(3): 223-232.
- Zhang, J., T.Z. Thomas, S. Kasper y R.J. Matusik, "A small composite probasin promoter confers high levels of prostate-specific gene expression through regulation by androgens and glucocorticoids in vitro and in vivo". Endocrinology, 2000. 141(12): pág. 4698-710.

Zou, Y., Peng, H., Zhou, B., Wen, Y., Wang, S. C., Tsai, E. M. y Hung, M. C. "Systemic tumor suppression by the proapoptotic gene bik", Cancer Res. 62: 8-12, 2002.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> HUNG, MIEN-CHIE
- 5 DAY, CHI-PING
- RAU, KUN-MING
- XIE, XIAOMING
- LI, ZHENG
- <120> PROMOTORES ESPECÍFICOS DE CÁNCER
- 10 <130> UTFC:845WO
- <140> DESCONOCIDO
- <141> 04-01-2005
- <150> 60/559.111
- <151> 04-02-2004
- 15 <160> 24
- <170> PatentIn Ver. 2.1
- <210> 1
- <211> 32
- <212> ADN
- 20 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético
- <400> 1
- aggaccagg tacctatggt caaaagtgcc tc 32
- 25 <210> 2
- <211> 28
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 30 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético
- <400> 2
- ccttgctgc tgctttccac caagtgc 28
- <210> 3
- <211> 31
- 35 <212> ADN
- <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético

<400> 3

caggttgga aaatggcag ccctcctgaa a 31

5 <210> 4

<211> 30

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético

<400> 4

cgttctgagg cgggcaatca aatgacctat 30

<210> 5

<211> 33

15 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético

<400> 5

20 cccgctagcc taattttatt ttatttttaa ttc 33

<210> 6

<211> 36

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético

<400> 6

cccctcgagg tattttggaa aaatgcctt atctag 36

<210> 7

30 <211> 31

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético

35 <400> 7

cgcacgcgta ggcacacagct ctctacaatt c 31

<210> 8

<211> 32

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético

<400> 8

agcctcgagc aggatctgag ataagaacca cg 32

10 <210> 9

<211> 28

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético

<400> 9

acggcgctcg agtccatcag ttctcatc 28

<210> 10

<211> 28

20 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético

<400> 10

25 **ttacttaagc ttgttagga cgcctgtc** 28

<210> 11

<211> 452

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético

<400> 11

ES 2 385 492 T3

```
tacgggccag atatacgcgt tgacattgat tattgactag ttattaatag taatcaatta 60
cggggtcatt agttcatagc ccatatatgg agttccgcgt tacataactt acggtaaattg 120
gcccgcctgg ctgaccgccc aacgaccccc gccattgac gtcaataatg acgtatgttc 180
ccatagtaac gccaataggg actttccatt gacgtcaatg ggtggagtat ttacggtaaa 240
ctgccactt ggcagtacat caagtgtatc atatgccaag tacgccccct attgacgtca 300
atgacggtaa atggcccgcc tggcattatg cccagtacat gacottatgg gactttccta 360
cttggcagta catctacgta ttagtcatcg ctattaccat ggtgatgcgg ttttggcagt 420
acatcaatgg gcgtggatag cggtttgact ca 452
```

<210> 12

<211> 180

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético

<400> 12

```
agacggtgag agcgagtcag ggattggctg gtctgcttcg ggcgggctaa aggaagggtc 60
aagtggagct ctcctaaccg acgcgcgtct gtggagaagc ggcttggctg ggggtggtct 120
cgtggggctc tgctgttta gtcgctttca gggttcttga gccccttcac gaccgtcacc 180
```

10 <210> 13

<211> 231

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético

<400> 13

```
cggccgccag tgtgatggat atctgcagaa ttcccccctg cgatctgtca gagcacctcg 60
cgagcgtacg tgcctcagga agtgacgcac agccccctg ggggccgggg gcggggccag 120
gctataaacc gccggtagg ggccgccatc cctcagagc gtcgggatat cgggtgaagg 180
gcgaattcca gcacactggc ggccgttact agtggatccg agctcggtac c 231
```

<210> 14

<211> 1757

20 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético

<400> 14

```

cettgectgc tgccttccac caagtgctgg agagctgggtg aattgctcac tcccggctca 60
ttcctcta at gaccgaagcg tctcgcagat gcaacctgcc gtggaggagc agggaggag 120
tgatttccag gtgtgggctt tttcagccat tccaaaggc gacttgagtt cacctcactc 180
actccagcat ttgtactcct gttgtggaaa aggcagtggag cacaagccaa gcccgtcca 240
ccttcacccc gcccacctc ccccggcctt ttcctgggccc agtcttaggg ccctgagtac 300
agacagcctg gctaccggtt aaccattctc agcgtgtggc tgctttttac acacatgtgt 360
acatatgcac ggacacacac acacacacag aggcttcccc agtactcctc tatataggaa 420
cccgtcacca tcccagacat atgcagaaga aagcccaaac cggctgtgtg agacaggaac 480
aattaacacg gtaacagatc cgataatgca gaccatcagg cctaaagaac acggaggagc 540
tgtgttctac ctccctatag aaaagcaatt agtgcctttt tagctttgga accatgcccg 600
gtgggtgtgtg tgtggacaga actgctggct ggttgtaag ttgctactaa acacagtgtt 660
gtttctcgtg gtctctgccc ttgttaacta ggattgagggc acttttgaac ataggtacct 720
gggtcctaag ggcgaaattcc agcacactgg cggccgttac tagtggatcc gagctcggta 780
ccaagctcca gctgggaata gagataggag gggaccagc tggatgcagt gggcagtggg 840
ggtcatagag tcaagagggt acagaataca atggggtcct agtatcatgg tggaggtcag 900
aaagagccct aaaagagagg gtcaaggtag gaggttagtg aaggtccacc tccacctct 960
ccaggacagg gacatcaggc cacaattaat ttctctgcag ttggtgagtg gtcattggtct 1020
ctgagtcacc cagcatccag agtgtccctg gtctagtggg ccccccttc tgagccacag 1080
ccactttctc catcaaataa ggccagtaat acccatccca tagttagtct gtgaggatga 1140
gatgagcatc tgtaagtgtc gaagataatc cctgacacat cccaagcatt cagcagtga 1200
agcatacact tacacggcac tccccagagc caggcatgtg ctggtgcctc atacagtgta 1260
ccacatttga tcgtcacaat gacctgtga gggagactgt gcaacagagg actgaccttg 1320
ctcaaagacc tcaggcgttt cccctcagag cctgagaggt catctctttt tttttttttt 1380
tttctttctc tttttttctc tttccatttc tttttctttg caagaggtca tctctaatac 1440
tttggaaatc cctgccagat tagagtccct ttgttcacct gaaggtttgg gccacaccag 1500
atagtctaac ggtgtgattt gtgctgaagg ttttgagcca cactatatca gctagatttc 1560
tagagcggcc ggccgcaata aatatcttt attttccatta catctgtgtg ttggtttttt 1620

gtgtgaatcg atagtactaa catacgctct ccatcaaac aaaacgaaac aaaacaaact 1680
agcaaatag gctgtcccca gtgcaagtc aggtgcccaga acatttctct atcgataggt 1740
accgagctca tttaggt 1757

```

<210> 15

<211> 646

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético

<400> 15

```

aatcaacctc tggattacaa aatttgtgaa agattgactg gtattcttaa ctatgttget 60
ccttttacgc tatgtggata cgctgcttta atgcctttgt atcatgctat tgcttcccgt 120
atggctttca tttctctctc cttgtataaa tctggttgcc tgtctcttta tgaggagttg 180
tggcccgttg tcaggcaacg tggcgtgggt tgcactgtgt ttgctgacgc aacccccact 240
ggttggggca ttgccaccac ctgtcagctc ctttccggga ctttgccttt cccctccct 300
attgccacgg cggaactcat cgcgcctgc cttgcccgt gctggacagg ggctcggctg 360
ttgggcaactg acaattccgt ggtgtgtgct ggaagctga cgtcctttcc atggctgctc 420
gcctgtgttg ccacctggat tctgocggg acgtccttct gctacgtccc ttcggcctc 480
aatccagcgg accttccctc ccgocgctg ctgcccgtc tgcggcctct tccgctctt 540
cgccttcgcc ctacagcag tcggatctcc ctttgggccc cctccccgcc tggaaatcga 600
gctcggtagc ggctcgacta gactcggggc ggccggccgc ttogag 646

```

10

<210> 16

<211> 819

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético

<400> 16

```

ttatgtcaca ccacagaagt aaggttcctt cacaaagatc ccaagctgtc gatcgacatt 60
tctagaggat ctccggaccg gggaaatccc gtccccaac atgtccagat cgaaatcgtc 120
tagcgcgtcg gcatgcgcca tcgccacgtc ctccgcgtct aagtggagct cgtcccccag 180
gctgacatcg gtcggggggg cggatctcgg acccggggaa tccccgtccc ccaacatgtc 240
cagatcgaaa tcgtctagcg cgtcggcatg cgccatcgcc acgtcctcgc cgtctaagtg 300
gagctcgtcc cccaggctga catcggtcgg gggggcggat cccccgggct gcaggaattc 360
cggcgataca gtcaactgtc tttagacctt gttactactc tcttccgatg atgatgtcgc 420
acttattcta tgctgtctca atggttagagg catatcagtc tccactgaag ccaatctatc 480
tgtgacggca tctttattca cattatcttg tacaaataat cctgttaaca atgcttttat 540
atcctgtaaa gaatccattt tcaaaatcat gtcaaggtct tctcgaggaa aaatcagtag 600
aaatagctgt tccagctctt ctagccttga ttccacttct gtcagatgtg ccctagtcag 660
cggagacctt ttggttttgg gagagttagc acactcccag ttgttcttca gacacttggc 720
gcacttcggt ttttctttgg agcacttgag ctttttaagt cggcaaatat cgcagtcttg 780
5 ttcgatagaa gacagtagct tcacttttca ggaggctag 819

```

<210> 17

<211> 1352

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético

<400> 17

```

acagacattg acattgtgtc atctagtata caaatagggt cttggagtac tttactaggc 60
atggacaatg cccaatgcct gtcccattct tcaggcatat ttttatttgt gggctttatg 120
tcctatttaa gaaaaagact aagaacaaga tgctatcata ttttcttaac tggaatggta 180
gatgtttaaa catgatgact accaagcttg gctagaacat tgtgtcatct agtatacaaa 240
taggttcttg gagtacttta ctaggcatgg acaatgccca atgcctgtcc cattcttcag 300
gcatatTTTT atttgtgggc tttatgtccc tattaagaaa aagactaaga acaagatgct 360
atcataagct ccaagcttat cgccagctgg gaatagagat aggaggggac ccagctggat 420
gcagtgggca gtgggggtca tagagtcaag aggggtacaga atacaatggg gtcttagtat 480
catggtggag gtcagaaaga gccctaaaag agaggggtcaa ggtaggaggt tagtgaaggt 540
ccacctccac cctctccagg acagggacat caggccacaa ttaatttctc tgcagttggg 600
gagtggatcat ggtctctgga gtccccagca tccagagtgt ccctgggteta gtgggtcccc 660
ctttctgagc cacagccact ttctccatca aatgaggcca gtaatacca tcccatagtg 720
atgctgtgag gatgagatga gcatctgtaa gtgctgaaga taatccctga cacatcccaa 780
gcattcagca gtgcaagcat aacttacac ggcactcccc agagccaggc atgtgtctgg 840
gcctcataca cgtgaccaca tttgatcgtc acaatgacc tgtgaggggag actgtgcaac 900
agaggactga ccttgcctca agacctcagg cgtttcccct cagagcctga gaggtcatct 960
cttttttttt ttttttttcc tttctttctt tttcttttcc atttcttttt ctttgcaaga 1020
ggtcatctct aatgcttttg aatatcctgc cagattagag tccctttggt cacctgaagg 1080
tttgggccac accagatagt ctaacgggtg gatttgtgct gaaggttttg agccacacta 1140
tatcagctag atttctagag cggccgggct caataaata tctttatttt cttacatctc 1200
gtgtgttggt tttttgtgtg aatcgatagt actaacatac gctctccatc aaaacaaaac 1260
gaaacaaaac aaactagcaa aataggctgt cccagtgca agtgcagggt ccagaacatt 1320
tctctatcga taggtaccga gctcatttag gt 1352

```

<210> 18

<211> 496

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético

<400> 18

```

ggccgcccc  cgtgcgcagc  aggacgcagc  gctgcctgaa  actcgcgccg  cgaggagagg  60
gcggggccgc  ggaaaggaaa  ggggggggct  gggaggcccc  gagggggctg  ggccggggac  120
ccgggagggg  tcgggacggg  gcgggggtcc  gcgggaggag  gcggagctgg  aagggtgaag  180
ggcaggacgg  gtgcccgggt  ccccagtccc  tccgccacgt  ggggagcgcg  gtccctgggcg  240
tctgtgcccc  cgaatccact  gggagccccg  cctggccccg  acagcgcagc  tgctccgggc  300
ggacccgggg  gtctgggccc  cgcttccccg  cccgcgcgcc  gctcgcgctc  ccagggtgca  360
gggacgccag  cgaggggccc  agcggagaga  ggtcgaatcg  gcctaggctg  tggggtaacc  420
cgagggaggg  gcctctagat  ataagggcca  attccagcac  actggcggcc  gttactagtg  480
gatccgagct  cggtagc                                496
    
```

<210> 19

<211> 857

10 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético

<400> 19

```

ttatgtcaca  ccacagaagt  aaggttcctt  cacaaagatc  ccaagctgtc  gatcgacatt  60
tctagaggat  ctcgaccgcg  gggaaatccc  gtcccccaac  atgtccagat  cgaaatcgtc  120
tagcgcgtcg  gcatgcgcca  tcgccacgtc  ctgcgcgtct  aagtggagct  cgtccccag  180
gctgacatcg  gtcggggggg  cggatctcgg  acccggggaa  tccccgtccc  ccaacatgtc  240
cagatcgaaa  tcgtctagcg  cgtcggcatg  cgccatcgcc  acgtcctcgc  cgtctaagtg  300
gagctcgtcc  cccaggctga  catcggtcgg  gggggcggat  cccccgggct  gcaggaattc  360
cggcgataca  gtcaactgtc  tttgaccttt  gttactactc  tcttccgatg  atgatgtcgc  420
acttattota  tgctgtctca  atgtagaggg  catatcagtc  tccactgaag  ccaatctatc  480
tgtgacggca  tctttattca  cattatcttg  tacaataaat  cctgttaaca  atgcttttat  540
atcctgtaaa  gaatccattt  tcaaaatcat  gtcaaggctc  tctcgaggaa  aaatcagtag  600
aaatagctgt  tccagctctt  ctagccttga  tccacttctc  gtcagatgtg  ccctagtcag  660
cggagacctt  ttggttttgg  gagagtagcg  aactcccag  ttgttcttca  gacacttggc  720
gcacttcggg  ttttctttgg  agcacttgag  ctttttaagt  cggcaaatat  cgcattgctg  780
ttcgatagaa  gacagtagct  tcatctttca  ggaggctagg  gccgccagtg  tgatggatat  840
ctgcagaatt  cgccctt                                857
    
```

15

<210> 20

<211> 8512

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético

<400> 20

ES 2 385 492 T3

```

ggtacgggag gtacttggag cggccgcgat ccagacatga taagatacat tgatgagttt 60
ggacaaacca caactagaat gcagtgaaaa aaatgcttta tttgtgaaat ttgtgatgct 120
attgctttat ttgtaacctat tataagctgc aataaacaag ttaacaacaa caattgcatt 180
cattttatgt ttcaggttca gggggagggtg tgggaggttt tttaaagcaa gtaaaacctc 240
tacaaatgtg gtatggctga ttatgatcat gaacagactg tgaggactga ggggcctgaa 300
atgagccttg ggactgtgaa tttaaaatac acaaaacaatt agaatacagta gtttaacaca 360
ttatacactt aaaaatttta tatttacctt agagctttaa atctctgtag gtagtttgtc 420
caattatgtc acaccacaga agtaaggttc cttcaciaaag atcccaagct gtcgatcgac 480
atctctagag gatctcggac cgggggaatc cccgtcccc aacatgtcca gatcgaaatc 540
gtctagcgcg tcggcatgcg ccatcgccac gtccctcgccg tctaagtgga gctcgtcccc 600
caggctgaca tcggtcgggg gggcggatct cggaccggg gaatccccgt cccccaacat 660
gtccagatcg aaatcgtcta gcgcgtcggc atgcgccatc gccacgtcct cgcctctaa 720
gtggagctcg tccccaggc tgacatcggg cggggggggc gatcccccg gctgcaggaa 780
ttccggcgat acagtcaact gtctttgacc tttgttacta ctctctccg atgatgatgt 840
cgcacttatt ctatgctgtc tcaatgttag aggcatatca gtctccactg aagccaatct 900
atctgtgacg gcatctttat tcacattatc ttgtacaaat aatcctgtta acaatgcttt 960
tatatcctgt aaagaatcca ttttcaaaat catgtcaagg tcttctcgag gaaaaatcag 1020
tagaaatage tgttccagtc tttctagcct tgattccact tctgtcagat gtgccctagt 1080
cagcggagac cttttggttt tgggagagta gcgacactcc cagttgttct tcagacactt 1140
ggcgcacttc ggtttttctt tggagcactt gagcttttta agtcggcaaa tatcgcagc 1200
ttgttcgata gaagacagta gcttcatctt tcaggaggct agggccgcca gtgtgatgga 1260
tatctgcaga attcgcctt ccttgccctgc tgctttccac caagtgctgg agagctggtg 1320
aattgctcac tcccggctca ttctctaat gaccgaagcg tctcgcagat gcaacctgcc 1380
gtggaggagc agggaggagc tgatttcag gtgtgggctt tttcagccat tcctaaaggc 1440
gacttgagtt cacctcactc actccagcat ttgtactcct gttgtggaaa aggcagtgag 1500
cacaagccaa gcccgctcca ccttcacccc gccccacctc ccccgccct tctctggcc 1560
agtcttaggg cctgagtag acacagcctg gctaccggtt aaccattctc agcgtgtggc 1620
tgctttttac acacatgtgt acatatgcac ggacacacac acacacacag aggcttcccc 1680
agtactcctc tatataggaa cccgtcacca tcccagacat atgcagaaga aagcccaaac 1740
cggctgtgtg agacaggaac aattaacacg gtaacagatc cgataatgca gaccatcagg 1800
cctaaagaac acggaggggac tgtgtttctac ctcttatag aaaagcaatt agtgctttt 1860
tagctttgga accatgcccg gtgggtgtgtg tgtggacaga actgctggct ggttggttaag 1920
ttgctactaa acacagtggt gtttctctgtg gtctctgccc ttgttaacta ggattgaggc 1980

```

acttttgaac ataggtacct gggctctaag ggogaattcc agcacactgg cggccggttac 2040
tagtggatcc gagctcggta ccaagctcca gctgggaata gagataggag gggaccagc 2100
tggatgcagt gggcagtggt ggtcatagag tcaagaggg acagaataca atggggctct 2160
agtatcatgg tggaggtcag aaagagccct aaaagagagg gtcaaggtag gaggttagtg 2220
aaggtccacc tccaccctct ccaggacagg gacatcagg cacaattaat ttctctgcag 2280
ttgggtgagt gtcattggtct ctggagtccc cagcatccag agtgtccctg gtctagtgg 2340
ccccctttc tgagccacag ccactttctc catcaaata gaagataat acccatccca 2400
tagtgatgct gtgaggatga gatgagcatc tgtaagtgt gaagataat cctgacacat 2460
ccaagcatt cagcagtgca agcatacact tacacggcac tccccagagc caggcatgtg 2520
ctgggtgcctc atacacgtga ccacatttga tcgtcacaat gaccctgtga gggagactgt 2580
gcaacagagg actgaccttg ctcaaagacc tcaggcgttt cccctcagag cctgagaggt 2640
catctctttt tttttttttt tttcctttct ttctttttct tttccatttc tttttctttg 2700
caagaggcca tctctaattgc tttggaatat cctgcccagat tagagtcctt ttgttcacct 2760
gaaggttttg gccacaccag atagtctaac ggtgtgatt gtgtgaagg ttttgagcca 2820
cactatatca gctagatttc tagagcggcc ggccgcaata aaatatctt attttcatta 2880
catctgtgtg ttgggttttt gtgtgaatcg atagtactaa catacgtct ccatcaaac 2940
aaaacgaac aaaacaaact agcaaaatg gctgtcccca gtgcaagtgc aggtgccaga 3000
acatttctct atcgatagg accgagctca tttagggtgac actatagaat acaagcttg 3060
atgctgcag ctcggaggga cagtactccg ctccggagg acgtactccg cggaggaca 3120
gtactccgct gggaggacag tactccgctc ggaggacagt actccgactc tagaggatcc 3180
ccagtcctat atatactgc tctgcacttg gccctttttt acactgtgac tgattgagct 3240
ggtgccgtgt cgagtgggtgt ctcgagatct gcgatctaag taagcttggc attccggta 3300
tgttggtaaa gccaccatgg aagacgcaa aaacataaag aaaggcccgg cgccattcta 3360
tccgctggaa gatggaaccg ctggagagca actgcataag gctatgaaga gatacgcct 3420
ggttccctgga acaattgctt ttacagatgc acatatcgag gtggacatca cttacgctga 3480
gtacttcgaa atgtccgttc ggttggcaga agctatgaaa cgatatgggc tgaatacaaa 3540
tcacagaatc gtcgtatgca gtgaaaactc tcttcaattc tttatgcccg tgttgggccc 3600
gttatttatc ggagttgcag ttgcccggc gaacgacatt tataatgaac gtgaattgct 3660
caacagtatg gccatttcgc agcctaccgt ggtgttcgtt tccaaaaagg ggttgcaaaa 3720
aattttgaac gtgcaaaaaa agctcccaat catccaaaaa attattatca tggattctaa 3780
aacggattac cagggatttc agtcgatgta cacgttcgtc acatctcatc tacctcccgg 3840
ttttaatgaa tacgattttg tgccagagtc ctctgatagg gacaagacaa ttgactgat 3900
catgaactcc tctggatcta ctggtctgcc taaagggtgc gctctgctc atagaactgc 3960
ctgctgaga ttctcgcatg ccagagatcc tatttttggc aatcaaatca ttccggatac 4020
tgcgatttta agtgttgttc cattccatca cggttttgga atgtttacta cactcggata 4080
tttgatatgt ggatttcgag tcgtcttaat gtatagattt gaagaagagc tgtttctgag 4140
gagcctcag gattacaaga ttcaaagtgc tttatctaata ttacacgaaa ttgcttctg 4200
cgccaaaagc actctgaagg acaatacga tttatctaata ttacacgaaa ttgcttctg 4260
tggcctccc ctcttaagg aagtcgggga agcggttgcc aagaggttcc atctgcccag 4320
tatcaggcaa ggatagggc tctactgagac tacatcagct attctgatta cccccagg 4380
ggatgataaa cggggcggc tcggtaaagt tgttccattt tttgaagcga aggttgtgga 4440
tctggatacc gggaaaacgc tgggcgttaa tcaaagaggg gaactgtgtg tgagaggtc 4500
tatgattatg tccggttatg taaacaatcc ggaagcgacc aacgccttga ttgacaagga 4560
tggatggcta cattctggag acatagctta ctgggacgaa gacgaacact tcttcatcgt 4620
tgaccgcctg aagtctctga ttaagtacaa aggctatcag gtggctcccg ctgaattgga 4680
atccatcttg ctccaacacc ccaacatctt cgacgcagg gtccgaggtc ttcccagcga 4740
tgacgcccgt gaacttccc cgccttctgt tgttttggag cacggaaaga cgatgacgga 4800
aaaagagatc gtggattacg tcgccagtca agtaacaacc gcgaaaaagt tgcgaggag 4860
agttgtgttt gtggacgaag taccgaaagg tcttaccgga aaactcgac caagaaaaat 4920
cagagagatc ctcataaagg ccaagaagg cggaaagat gccgtgtaat tctaggtacc 4980
gagctcttac gcgtgctagc cctcgacaat caacctctgg attacaaaaat ttgtgaaaga 5040
ttgactggta ttcttaacta tgttgcctct tttacgctat gtggatacgc tgctttaatg 5100
cctttgtatc atgctattgc tcccctatg gctttcattt totctcctt gtataaatcc 5160
tggttgctgt ctctttatga ggagttgtgg cccgttctca ggcaacgtgg cgtgggtgtc 5220
actgtgtttg ctgacgcaac cccactggt tggggcattg ccaccacctg tcagctcctt 5280
tccgggactt tcgctttccc cctcctatt gccacggcgg aactcatcgc cgctgcctt 5340
gcccgtgctt ggacaggggc tcggctgttg ggcactgaca attccgtgg gtgtcgggg 5400
aagctgacgt cctttccatg gctgctgcc tgtgttgcca cctggattct gcgaggagc 5460
tcctctgct acgtccctt gccctcaat tccctccc cggctgctg 5520
cggctctgc ggcctcttc cgtctctgc ctctgcctc agacaggtcg gatctcctt 5580

```

tggggcgcct cccgcctgg aattcgagct cggtacgggc tcgactagag tcggggcggc 5640
cggcgccttc gagcagacat gataagatac attgatgagt ttggacaaac cacaactaga 5700
atgcagtgaa aaaaatgctt tatttgtgaa atttgtgatg ctattgcttt atttgtaacc 5760
attataagct gcaataaaca agttaacaac aacaattgca ttcattttat gtttcagggt 5820
cagggggagg tgtgggaggt tttttaagc aagtaaaacc tctacaaatg tggtaaaatc 5880
gataaggatc cgtcgaccga tgccttgag agccttcaac ccagtcagct ccttcgggtg 5940
ggcgcggggc atgactatcg tcgccgact tatgactgtc ttctttatca tgcaactcgt 6000
aggacagggt cggcagcgc tcttcgcctt cctcgtcac tgactcgtg cgctcggctg 6060
ttcggctgcg gcgagcggta tcagctcact caaaggcggg aatacggtta tccacagaat 6120
caggggataa cgcaggaaag aacatgtgag caaaaggcca gcaaaaggcc aggaaccgta 6180
aaaaggccgc gttgctggcg tttttccata ggctccgcc ccctgacgag catcacaaa 6240
atcgacgctc aagtcagagg tggcgaaacc cgacaggact ataaagatac caggcgtttc 6300
cccctggaag ctccctcgtg cgctctcctg ttccgacct gccgcttacc ggataacctgt 6360
cgcctttct ccttcggga agcgtggcgc tttctcaatg ctacagctgt aggtatctca 6420
gttcgggtgta ggtcgttcgc tccaagctgg gctgtgtgca cgaaccccc gttcagcccg 6480
accgctgcgc cttatccggt aactatcgtc ttgagtccaa cccggtaaga cagcacttat 6540
cgccactggc agcagccact ggtaacagga ttacagagc gaggtatgta ggcgtgcta 6600
cagacttctt gaagtggtg cctaactacg gctacactag aaggacagta tttggtatct 6660
gcgctctgct gaagccagtt accttcggaa aaagagttgg tagctcttga tccggcaaac 6720
aaaccaccgc tggtagcggg ggtttttttg tttgcaagca gcagattacg cgcagaaaaa 6780
aaggatctca agaagatcct ttgatctttt ctacggggtc tgacgctcag tggaaacgaaa 6840
actcacgtta agggattttg gtcatgagat tatcaaaaag gatcttcacc tagatccttt 6900
taaattaaaa atgaagtttt aaatcaatct aaagtatata tgagtaaact tggctcgaca 6960
gttaccaatg cttaatcagt gaggcacct tctcagcgat ctgtctatct cgttcatcca 7020
tagttgcctg actccccgtc gtgtagataa ctacgatacg ggagggctta ccatctggcc 7080
ccagtgctgc aatgataccg cgagaccac gctcaccgpc tccagattta tcagcaataa 7140
accagccagc cgggaagggcc gagcgcagaa gtggctcctgc aactttatcc gcctccatcc 7200
agtctattaa ttggtgcccg gaagctagag taagtagttc gccagttaat agtttgcgca 7260
acgttgttgc cattgctaca ggcacgtgg tgtcacgctc gtcgtttggg atggcttcat 7320
tcagctccgg ttcccaacga tcaaggcgag ttacatgatc ccccatggtg tgcaaaaaag 7380
cggtagctc cttcggctct ccgatcgttg tcagaagtaa gttggccgca gtgttatcac 7440
tcatggttat ggcagcactg cataattctc ttactgtcat gccatccgta agatgctttt 7500
ctgtgactgg tgagtactca accaagtcac cctgagaata gtgtatgagg cgaccaggtg 7560
gctcttgccc cgcgtcaata cgggataata ccgcgccaca tagcagaact ttaaaagtgc 7620
tcatcttggg aaaacgttct tcggggcgaa aactctcaag gatcttaccg ctggtgagat 7680
ccagttcgat gtaaccact cgtgcacca actgatcttc agcatctttt actttcacca 7740
gcgtttctgg gtgagcaaaa acaggaaggc aaaatgccgc aaaaaaggga ataagggcca 7800
cacggaaatg ttgaatactc atactcttcc tttttcaata ttattgaagc atttatcagg 7860
gttattgtct catgagcgga tacatatttg aatgtattta gaaaaataaa caaatagggg 7920
ttccgcgcac atttccccga aaagtgccac ctgacgcgcc ctgtagcggc gcattaagcg 7980
cggcgggtgt ggtggttacg cgcagcgtga ccgctacact tgccagcgcg ctagcgcggc 8040
ctcctttcgc tttcttcctt tcctttctcg ccacgttcgc cggctttccc cgtcaagctc 8100
taaactgggg gctcccttta gggttccgat ttagtgtttt acggcacctc gaccccaaaa 8160
aacttgatta gggatgatgg tcacgtagtg ggccatcgcc ctgatagacg gtttttcgcc 8220
ctttgacggt ggagtccacg ttctttaa7a gtggactctt gttccaaact ggaacaacac 8280
tcaaccctat ctccgtctat tcttttgatt tataagggat tttgccgatt tcggcctatt 8340
ggttaaaaaa tgagctgatt taacaaaaat ttaacgcgaa ttttaacaaa atattaacgt 8400
ttacaatttc ccattcgcca ttcaggctgc gcaactgttg ggaagggcca tcgggtcggg 8460
cctcttcgct attacgccag cccaagctac catgataagt aagtaatatt aa 8512

```

<210> 21

<211> 8565

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético

<400> 21

```

cgccattcag gctgcgcaac tgttgggaag ggcgatcggg gggggcctct tcgctattac 60
gccagcccaa gctaccatga taagtaagta atattaaggt acgggaggta cttggagcgg 120
ccgcgatcca gacatgataa gatacattga tgagtttggg caaacacaaa ctagaatgca 180
gtgaaaaaaaa tgctttatct gtgaaatttg tgatgctatt gctttatctg taaccattat 240
aagctgcaat aaacaagtta acaacaacaa ttgcattcat tttatgtttc aggttcaggg 300
ggaggtgtgg gaggtttttt aaagcaagta aaacctctac aaatgtggta tggctgatta 360
tgaatgcaat cagactgtga ggactgaggg gcctgaaatg agccttggga ctgtgaattt 420
aaaatacaca aacaattaga atcagtagtt taacacatta tacacttaaa aattttatat 480
ttacctaga gctttaaatc tctgtaggta gtttgtccaa ttatgtcaca ccacagaagt 540
aaggttcctt cacaaagatc ccaagctgtc gatcgacatt tctagaggat ctcgaccocg 600
gggaatcccc gtcccccaac atgtccagat cgaaatcgtc tagcgcgtcg gcatgcgcca 660
tcgccacgtc ctgcgcgtct aagtggagct cgtccccag gctgacatcg gtcggggggg 720
cggatctcgg acccggggaa tccccgtccc ccaacatgtc cagatcgaaa tcgtctagcg 780
cgtcggcatg cgccatcgcc acgtcctcgc cgtctaagtg gagctcgtcc cccaggctga 840
catcggctcg gggggcggat cccccgggct gcaggaattc cggcgataca gtcaactgtc 900
tttgaccttt gttactactc tcttccgatg atgatgtcgc acttattcta tgctgtctca 960
atgtagagg catatcagtc tccactgaag ccaatctatc tgtgacggca tctttattca 1020
cattatcttg tacaataat cctgttaaca atgcttttat atcctgtaaa gaatccattt 1080
tcaaatcat gtcaaggtct tctcgaggaa aaatcagtag aaatagctgt tccagtcttt 1140
ctagccttga ttccacttct gtcagatgtg ccctagtcag cggagacctt ttggttttgg 1200
gagagttagc aactcccag ttgttcttca gacacttggc gcacttcggg ttttctttgg 1260
agcacttgag ctttttaagt cggcaaatat cgtactgttg ttcgatagaa gacagttagt 1320
tcatctttca ggaggctagg gccgcccac gtgcgcagca ggacgcagcg ctgcctgaaa 1380
ctcgcgcgc gcaggagagg cggggccgcg gaaaggaaa gggggggctg ggaggcccgg 1440
agggggctgg gccggggacc cgggaggggt cgggacgggg cggggctcgc gcggaggagg 1500
cggagctgga aggtgaaggg gcaggacggg tgcccgggtc cccagtcctt ccgcacgtg 1560
gggagcgcgg tcctgggctg ctgtgcccgc gaatccactg ggagcccggc ctggccccga 1620
cagcgcagct gctccgggcg gaccgggggg tctgggcccgc gcttccccgc ccgcgcgcgc 1680
ctcgcgctcc cagggtgcag ggacgccagc gagggcccca gcggagagag gtcgaatcgg 1740
cctaggctgt ggggtaacct gagggagggg cctctagata taagggcgaa tccagcaca 1800
ctggcggcgc ttactagtgg atccgagctc ggtacacaga cattgacatt gtgtcatcta 1860
gtatacaaat aggttcttgg agtactttac taggcatgga caatgcccaa tgctgtccc 1920
attcttcagg catattttta tttgtgggct ttatgtccct attaagaaaa agactaagaa 1980
caagatgcta tcatattttc ttaactggaa tggtagatgt ttaaactatg tgactacca 2040
gcttggttag aacattgtgt catctagtat acaaataggt tcttggagta ctttactagg 2100
catggacaat gcccaatgcc tgtccattc ttcaggcata tttttatctg tgggctttat 2160
gtccctatta agaaaaagac taagaacaag atgctatcat aagctccaag cttatcgcca 2220
gctgggaata gagataggag gggaccagc tggatgcagt gggcagtggg ggtcatagag 2280
tcaagagggg acagaataca atggggtcct agtatcatgg tggaggtcag aaagagcct 2340
aaaagagagg gtcaaggtag gaggttagtg aaggtccacc tccacctct ccaggacagg 2400
gacatcaggg cacaattaat ttctctgag ttggtgagtg gtcatggtct ctggagtccc 2460
cagcatccag agtgtccctg gtctagtggg ccccccttc tgagccacag ccactttctc 2520
catcaaatga ggccagtaat acccatccca tagtgatgct gtgaggatga gatgagcatc 2580
tgtaagtgtc gaagataatc cctgacacat cccaagcatt cagcagtgca agcatacact 2640
tacacggcac tcccagagc caggcatgtg ctggtgcctc atacacgtga ccacatttga 2700
tcgtcacaat gaccctgtga gggagactgt gcaacagagg actgacctg ctcaaagacc 2760
tcaggcgttt cccctcagag cctgagaggt catctctttt ttttttttt tttcctttct 2820
ttctttttct tttccatttc tttttctttg caagaggtca tctctaagtc tttggaatat 2880
cctgccagat tagagtccct ttgttcacct gaaggttttg gccacaccag atagtctaac 2940
ggtgtgattt gtgctgaagg ttttgagcca cactatatca gctagatttc tagagcggcc 3000
ggccgcaata aaatatcttt attttcatba catctgtgtg ttggtttttt gtgtgaatcg 3060
atagtactaa catacgtctc ccatcaaaac aaaacgaaac aaaacaaact agcaaaatag 3120
tctgtcccca gtgcaagtgc aggtgccaga acatttctct atcgataggt accgagctca 3180
tttaggtgac actatagaat acaagcttgc atgctgcag gtcaggagga cagtactccg 3240
ctcggaggac agtactccgc tcggaggaca gtactccgct cggaggacag tactccgctc 3300
ggaggacagt actccgactc tagaggatcc ccagtcctat atatactcgc tctgcacttg 3360
gccctttttt aactgtgac tgattgagct ggtgcccgtg cgagtgggtg ctcgagatct 3420
gcgatctaag taagcttggc attccggctc tgttggtaaa gccaccatgg aagacgcaa 3480
aaacataaag aaaggcccgg cgccattcta tccgctggaa gatggaaccg ctggagagca 3540

```


actgcataag gctatgaaga gatacgcctt ggttcctgga acaattgctt ttacagatgc 3600
 acatatcgag gtggacatca cttacgctga gtacttcgaa atgtccgttc ggttggcaga 3660
 agctatgaaa cgatatgggc tgaatacaaa tcaçagaatc gtcgatgca gtgaaaactc 3720
 tcttcaattc tttatgccgg tgttggggcg gttatztatc ggagttgcag ttgcccgcgc 3780
 gaacgacatt tataatgaac gtgaattgct caacagtatg ggcatttcgc agcctaccgt 3840
 ggtgttcggt tccaaaaagg ggttgcaaaa aattttgaac gtgcaaaaaa agctcccaat 3900
 catccaaaaa attattatca tggattctaa aacggattac cagggatttc agtcgatgta 3960
 cacgttcgtc acatctcatc tacctcccgg ttttaatgaa tacgattttg tgccagagtc 4020
 cttcgatagg gacaagacaa ttgcaactgat catgaactcc tctggatcta ctggtctgcc 4080
 taaaggtgtc gctctgcctc atagaactgc ctgcgtgaga ttctcgcatg ccagagatcc 4140
 tatttttggc aatcaaatca ttccggatac tgcgatttta agtgttgctc cattccatca 4200
 cggttttgga atgtttacta cactcggata tttgatatgt ggatttcgag tctctttaat 4260
 gtatagattt gaagaagagc tgtttctgag gagccttcag gattacaaga ttcaaagtgc 4320
 gctgctgggt ccaaccctat tctccttctt cgccaaaagc actctgattg acaaaatcga 4380
 tttatctaat ttacacgaaa ttgcttctgg tggcgctccc ctctctaagg aagtcgggga 4440
 agcggttgcc aagaggttcc atctgccagg tatcaggcaa ggatatgggc tcaactgagac 4500
 tacatcagct attctgatta cacccgaggg ggatgataaa ccgggcgcgg tgggtaagt 4560
 tgttccattt tttgaagcga aggttgtgga tctggatacc gggaaaacgc tggcggttaa 4620
 tcaaagaggc gaactgtgtg tgagaggtcc tatgattatg tccggttatg taaacaatcc 4680
 ggaagcgacc aacgccttga ttgacaagga tggatggcta cattctggag acatagctta 4740
 ctgggacgaa gacgaacact tcttcatcgt tgaccgcctg aagtctctga ttaagtacaa 4800
 aggctatcag gtggctcccg ctgaattgga atccatcttg ctccaacacc ccaacatctt 4860
 cgacgcaggt gtcgcaggtc ttcccgaaga tgaccgcggt gaacttcccg ccgccgttgt 4920
 tgttttgag cacggaaaaga cgatgacgga aaaagagatc gtggattacg tccccagtca 4980
 agtaacaacc gcaaaaaagt tgcgcggagg agttgtgttt gtggacgaag taccgaaagg 5040
 tcttaccgga aaactcgacg caagaaaaat cagagagatc ctcataaagg ccaagaaggg 5100
 cgaaagatc gccgtgtaat tctaggtacc gagctcttac gcgtgctagc cctcgacaat 5160
 caacctctgg attacaaaat ttgtgaaaga ttgactggta ttcttaacta tgttgctcct 5220
 tttacgctat gtggatacgc tgctttaatg cctttgtatc atgctattgc ttcccgtatg 5280
 gctttcattt tctcctcctt gtataaatcc tggttgctgt ctctttatga ggagttgtgg 5340
 cccgttgta ggcaacgtgg cgtggtgtgc actgtgtttg ctgacgcaac ccccactggt 5400
 tggggcattg ccaccacctg tcagctcctt tccgggactt tgccttccc cctcctatt 5460
 gccacggcgg aactcatcgc cgctgcctt gcccgctgct ggacaggggc tggctgttg 5520
 ggcactgaca attccgtggt gttgtcgggg aagctgacgt cctttccatg gctgctcgcc 5580
 tgtgttgcca cctggattct gcgcgggagc tcttctgct acgtcccttc ggccctcaat 5640
 ccagcggacc ttcttcccgc cggcctgctg ccggctctgc ggctcttcc gctctctgc 5700
 cttcgcctc agacgagtcg gatctcctt tgggcgcct ccccgctgg aatctgagct 5760
 cggtaggggc tcgactagag tçggggcggc cggccgctt gagcagacat gataagatc 5820
 attgatgagt ttggacaaac cacaactaga atgcagtgaa aaaaatgctt tatttgtgaa 5880
 atttgtgatg ctattgcttt atttgaacc attataagct gcaataaaca agttaacaac 5940
 aacaattgca ttcattttat gtttcagggt cagggggagg tgtgggagg tttttaaagc 6000
 aagtaaaacc tctacaaatg tggtaaaatc gataaggatc cgtcgaccga tgccttgag 6060
 agccttcaac ccagtcagct ccttccggtg ggcgcggggc atgactatcg tgcgcgcact 6120
 tatgactgtc ttctttatca tgcaactcgt aggacagggt ccggcagcgc tcttccgctt 6180
 cctcgctcac tgactcgctg cgctcggctg ttccgctgcg gcgagcggta tcagctcact 6240
 caaaggcggg aatacggtta tccacagaat caggggataa cgcaggaaag aacatgtgag 6300
 caaaaggcca gcaaaaggcc aggaaccgta aaaaggccgc gttgctggcg tttttccata 6360
 ggctccgccc ccctgacgag catcacaana atcgacgctc aagtcagagg tggcgaacc 6420
 cgacaggact ataaagatac caggcgtttc cccctggaag ctccctcgtg cgtctcctg 6480
 ttccgacctt gccgcttacc ggatacctgt ccgcctttct cccttcggga agcgtggcgc 6540
 tttctcaatg ctacagctgt aggtatctca gttcagcccg accgctgcgc cttatccggt aactatcgtc 6600
 gctgtgtgca cgaaccccc cactcagctt cagacttat cgcactggtc agcagccact ggtaacagga 6720
 ttgagtccaa cccggtaaga gaggtatgta ggcggtgcta cagagttctt gaagtgggtg cctaactacg 6780
 gctacactag aaggacagta tttggatct gcgctctgct gaagccagtt accttcggaa 6840
 aaagagttgg tagctcttga tccggcaaac aaaccaccgc tggtagcggg ggtttttttg 6900
 tttcgaaagca gcagattacg cgcagaaaaa aaggatctca agaagatcct ttgatctttt 6960
 ctacgggggtc tgacgctcag tggaaacgaaa actcacgtta agggattttg gtcatgatag 7020
 tatcaaaaag gatcttcacc tagatccttt taattaaana atgaagtttt aatcaatct 7080
 aaagtatata tgagtaaact tggcttgaca gttaccaatg cttaatcagt gaggcaccta 7140

```

tctcagcgat ctgtctatatt cgttcatcca tagttgctg actccccgtc gtgtagataa 7200
ctacgatacg ggagggctta ccatctggcc ccagtgctgc aatgataccg cgagaccac 7260
gctcaccggc tccagattta tcagcaataa accagccagc cggáagggcc gagcgcagaa 7320
gtggctctgc aactttatcc gctccatcc agtctattaa ttggtgccgg gaagctagag 7380
taagtagttc gccagttaat agtttgcgca acgttgttgc cattgctaca ggcacgtgg 7440
tgtcacgctc gtcgtttggg atggcttcat tcagctccgg ttcccaacga tcaaggcgag 7500
ttacatgata ccccatggtg tgcaaaaaag cggttagctc cttcggctct ccgatcgttg 7560
tcagaagtaa gttggcgcga gtgttatcac tcatggttat ggcagcactg cataattctc 7620
ttactgtcat gccatccgta agatgctttt ctgtgactgg tgagtactca accaagtcat 7680
tctgagaata gtgtatgcgg cgaccgagtt gctcttgccc ggcgtcaata cgggataata 7740
ccgcgccaca tagcagaact ttaaaagtgc tcatcattgg aaaacgttct tccggggcga 7800
aactctcaag gatcttaccg ctggtgagat ccagttcgat gtaaccact cgtgcacca 7860
actgatcttc agcatctttt actttcacca gcgtttctgg gtgagcaaaa acaggaaggc 7920
aaaatgcgc aaaaaagga ataagggoga cacggaaatg ttgaatactc atactcttc 7980
tttttcaata ttattgaagc atttatcagg gttattgtct catgagcgga tacatattg 8040
aatgtattta gaaaaataaa caaatagggg ttccgcgcac atttccccga aaagtgccac 8100
ctgacgcgcc ctgtagcggc gcattaagcg cggcgggtgt ggtggttacg cgcagcgtga 8160
ccgctacact tgccagcggc ctageccec ctccttctgc tttcttccct tctttctcg 8220
ccacgtctgc cggctttccc cgtcaagctc taaatcgggg gctccctta gggttccgat 8280
ttagtgttt acggcacctc gaccccaaaa aacttgatta gggatgaggt tcacgtagtg 8340
ggccatcgcc ctgatagacg gttttctgcc ctttgacgtt ggagtccacg ttctttaata 8400
gtggactctt gttccaaact ggaacaacac tcaacctat ctcggtctat tcttttgatt 8460
tataagggat tttgccgatt tccgctatt ggttaaaaaa tgagctgatt taacaaaaat 8520
ttaacgcgaa ttttaacaaa atattaacgt ttacaatttc ccatt 8565

```

<210> 22

<211> 279

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético

<400> 22

```

gacactatag aatacaagct tgcattgctg caggctcggg ggacagtact ccgctcggag 60
gacagtactc cgctcggagg acagtactcc gctcggagga cagtactccg ctccggaggac 120
agtactccga ctctagagga tccccagctc tatatatact cgctctgcac ttggcccttt 180
tttactactgt gactgattga gctgggtgccc tgcagagtgg tgtctcgaga tctgcgatct 240
aagtaagctt ggcattccgg tactgttggg aaagccacc 279

```

10 <210> 23

<211> 650

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético

<400> 23

ES 2 385 492 T3

```

gctagctacg ggccagatat acgcgttgac attgattatt gactagttat taatagtaat 60
caattacggg gtcattagtt catagcccat atatggagtt ccgcggtaca taacttacgg 120
taaatggccc gcctggctga ccgcccacg acccccgccc attgacgtca ataatgacgt 180
atggtcccat agtaacgcca atagggactt tccattgacg tcaatgggtg gagtatttac 240
ggtaaactgc ccacttggca gtacatcaag tgtatcatat gccaaagtacg ccccctattg 300
acgtcaatga cggtaaatgg cccgcctggc attatgcca gtacatgacc ttatgggact 360
ttcctacttg gcagtacatc tacgtattag tcatcgctat taccatgggtg atgcgggttt 420

ggcagtacat caatgggctg ggatagcggg ttgactcact cgagagacgg tgagagcgag 480
tcagggattg gctggctctg ttcggggcgg ctaaaggaag gttcaagtgg agctctccta 540
accgacgcgc gtctgtggag aagcggcttg gtcgggggtg gtctcgtggg gtccctgcctg 600
tttagtcgct ttcaggggtc ttgagccctc tcacgaccgt caccaagctt 650

```

<210> 24

<211> 678

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético

<400> 24

```

gctagctacg ggccagatat acgcgttgac attgattatt gactagttat taatagtaat 60
caattacggg gtcattagtt catagcccat atatggagtt ccgcggtaca taacttacgg 120
taaatggccc gcctggctga ccgcccacg acccccgccc attgacgtca ataatgacgt 180
atggtcccat agtaacgcca atagggactt tccattgacg tcaatgggtg gagtatttac 240
ggtaaactgc ccacttggca gtacatcaag tgtatcatat gccaaagtacg ccccctattg 300
acgtcaatga cggtaaatgg cccgcctggc attatgcca gtacatgacc ttatgggact 360
ttcctacttg gcagtacatc tacgtattag tcatcgctat taccatgggtg atgcgggttt 420
ggcagtacat caatgggctg ggatagcggg ttgactcact cgagcggccg ccagtgtgat 480
ggatatctgc agaattcgcc cttgcatctt gtcagagcac ctgcgagcgc tacgtgcctc 540
aggaagtgac gcacagcccc cctggggggc gggggcgggg ccaggctata aaccgccggt 600
taggggcccgc catcccctca gagegctcggg atatcgggtg aagggcgaat tccagcacac 660
tggcggccgt tactagtg 678

```

10

REIVINDICACIONES

1. Un constructo polinucleotídico que comprende una secuencia de control específica de cáncer de mama, comprendiendo dicha secuencia de control una porción seleccionada del promotor de topoisomerasa II α o una porción seleccionada del receptor de transferrina, y comprendiendo adicionalmente una secuencia de amplificación transcripcional en dos etapas (TSTA), incluyendo dicha secuencia de TSTA un dominio de unión a ADN y un dominio de activación, y comprendiendo el elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis de marmota (WPRE).
2. El constructo de la reivindicación 1, en el que la porción seleccionada del promotor de topoisomerasa II α comprende la SEQ ID NO: 12.
3. El constructo de la reivindicación 1, en el que la porción seleccionada del receptor de transferrina comprende la SEQ ID NO: 13.
4. El constructo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende adicionalmente un potenciador.
5. El constructo de la reivindicación 4, en el que el potenciador comprende potenciador de citomegalovirus (CMV), promotor de gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) o el promotor de β -actina.
6. El constructo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para uso en el tratamiento de cáncer de mama.
7. Un constructo polinucleotídico que comprende una secuencia de control específica de cáncer de próstata, comprendiendo dicha secuencia de control
 - una secuencia de control específica de tejido de próstata junto con y/o
 - una secuencia de control específica de cáncer;
 - una secuencia de amplificación transcripcional en dos etapas (TSTA), incluyendo dicha secuencia de TSTA un dominio de unión a ADN y un dominio de activación, y
 - un elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis de marmota (WPRE).
8. El constructo 8 de la reivindicación 7, en el que dicha secuencia de control específica de tejido de próstata comprende la SEQ ID NO: 17.
9. El constructo de la reivindicación 7, en el que dicha secuencia de control específica del cáncer comprende la SEQ ID NO: 18.
10. El constructo de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9 para uso en el tratamiento de cáncer de próstata.
11. Un constructo polinucleotídico que comprende una secuencia de control específica de cáncer pancreático, comprendiendo dicha secuencia de control:
 - una secuencia de control específica de tejido pancreático y
 - una secuencia de amplificación transcripcional en dos etapas (TSTA), incluyendo dicha secuencia de TSTA un dominio de unión a ADN y un dominio de activación; y
 - un elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis de marmota (WPRE).
12. El constructo de la reivindicación 11, en el que dicha secuencia de control específica de tejido pancreático comprende la SEQ ID NO: 14.
13. El constructo de la reivindicación 11 o 12 para uso en el tratamiento de cáncer pancreático.
14. El constructo de las reivindicaciones 1 a 13, en el que el dominio de unión a ADN es Gal1, Gal4 o LexA.
15. El constructo de las reivindicaciones 1 a 14, en el que el dominio de activación es VP2 o VP16.
16. El constructo de las reivindicaciones 1 a 15, en el que la secuencia de TSTA es GAL4-VP2 o GAL4-VP16.
17. El constructo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en el que dicha secuencia de control está ligada operativamente con un polinucleótido que codifica un producto génico terapéutico.

18. El constructo de la reivindicación 17, en el que el producto génico terapéutico es un inhibidor de la proliferación celular, un regulador de la muerte celular programada o un supresor tumoral.
19. El constructo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, definido adicionalmente por estar comprendido en un liposoma.
- 5 20. Un procedimiento de inhibición de la proliferación de células de cáncer de mama *in vitro*, que comprende poner en contacto una célula de cáncer de mama con una cantidad eficaz de un constructo polinucleotídico como se define en la reivindicación 1, estando dicha porción seleccionada ligada operativamente con un polinucleótido que codifica un producto génico eficaz para inhibir la proliferación celular.
- 10 21. Un procedimiento de inhibición de la proliferación de células de cáncer de próstata *in vitro*, que comprende poner en contacto una célula de cáncer de próstata con una cantidad eficaz de un constructo polinucleotídico como se define en la reivindicación 7, en el que las secuencias están ligadas operativamente con un polinucleótido que codifica un producto génico eficaz para inhibir la proliferación de células de cáncer de próstata.
- 15 22. El procedimiento de la reivindicación 21, en el que el constructo comprende adicionalmente una secuencia de control postranscripcional ligada operativamente con un polinucleótido que codifica un producto génico eficaz para inhibir la proliferación de células de cáncer de próstata.
23. Un procedimiento de inhibición de la proliferación de células de cáncer pancreático *in vitro*, que comprende poner en contacto una célula de cáncer pancreático con una cantidad eficaz de un constructo polinucleotídico como se define en la reivindicación 11 ligado operativamente con un polinucleótido que codifica un producto génico eficaz para inhibir la proliferación celular.
- 20 24. El procedimiento de la reivindicación 23, en el que el constructo comprende adicionalmente una secuencia de control postranscripcional ligada operativamente con un polinucleótido que codifica un producto génico eficaz para inhibir la proliferación celular.

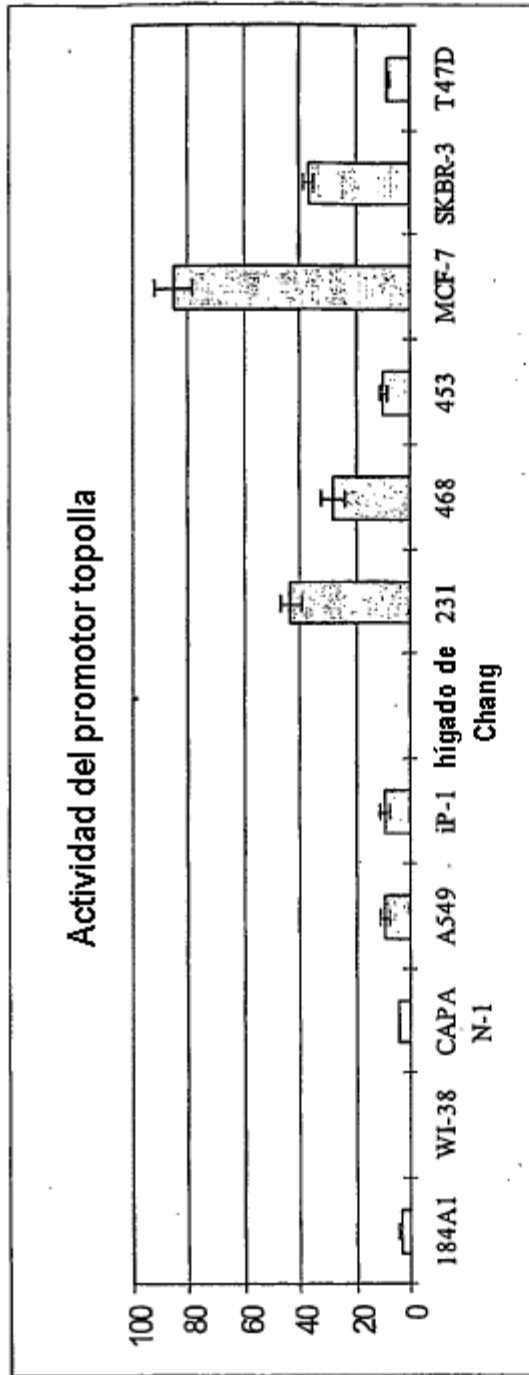


FIG. 1

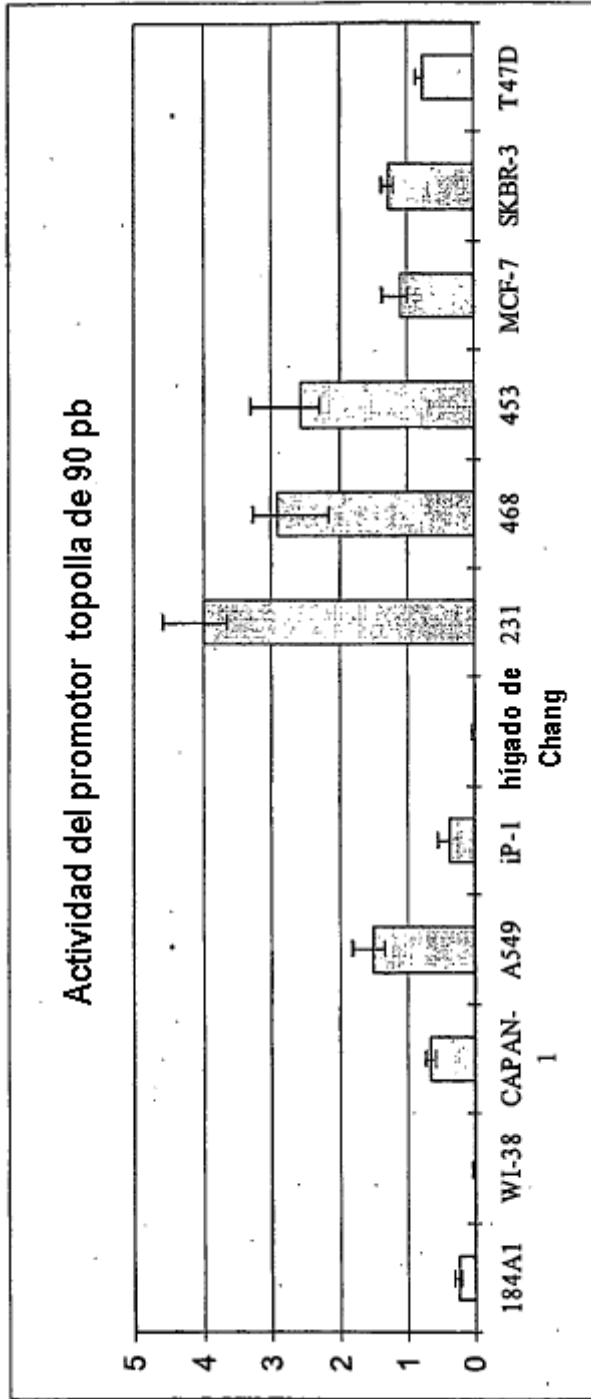


FIG. 2

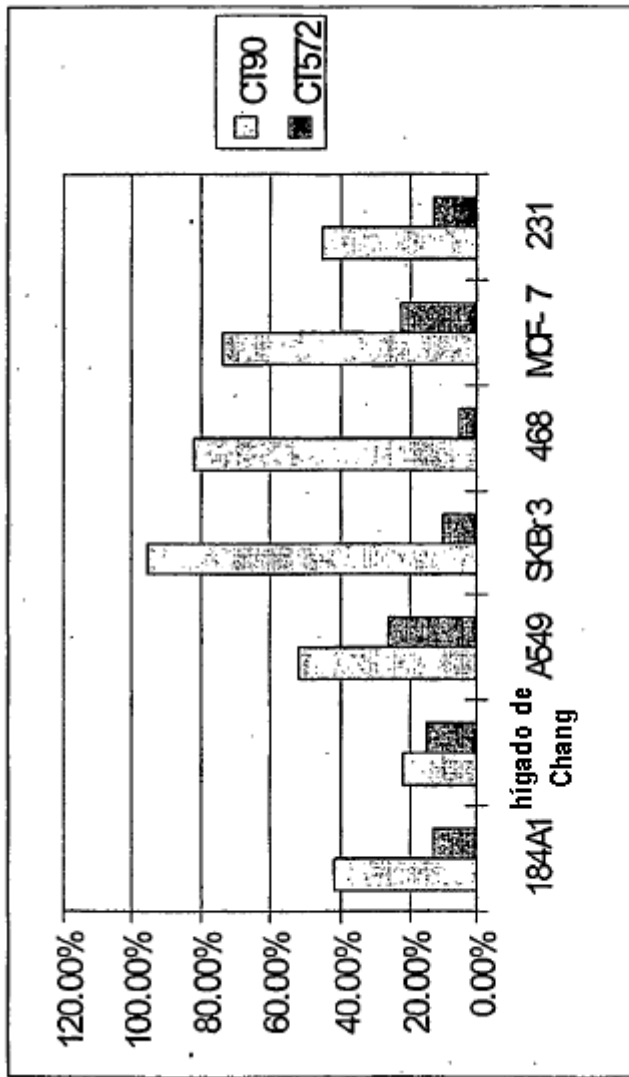


FIG. 3

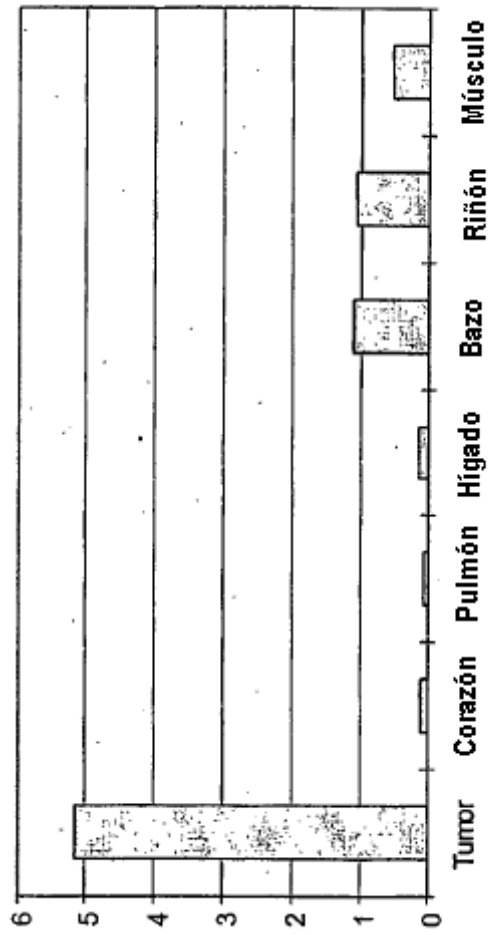


FIG. 4

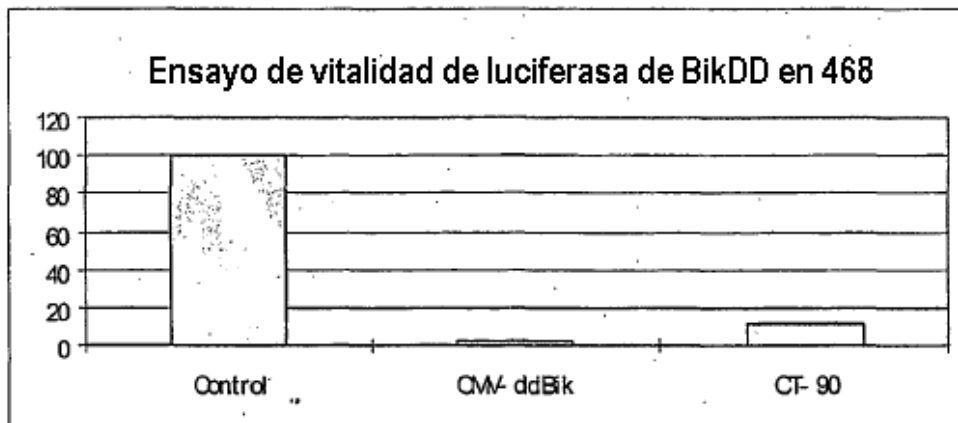
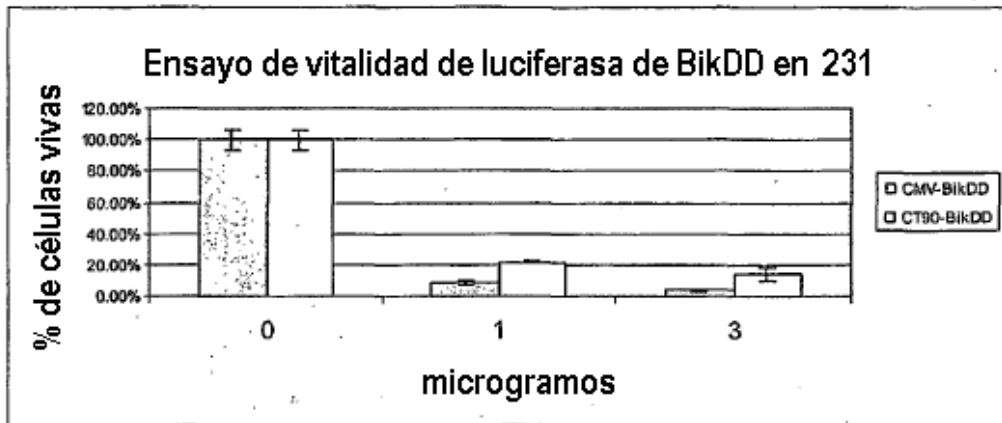
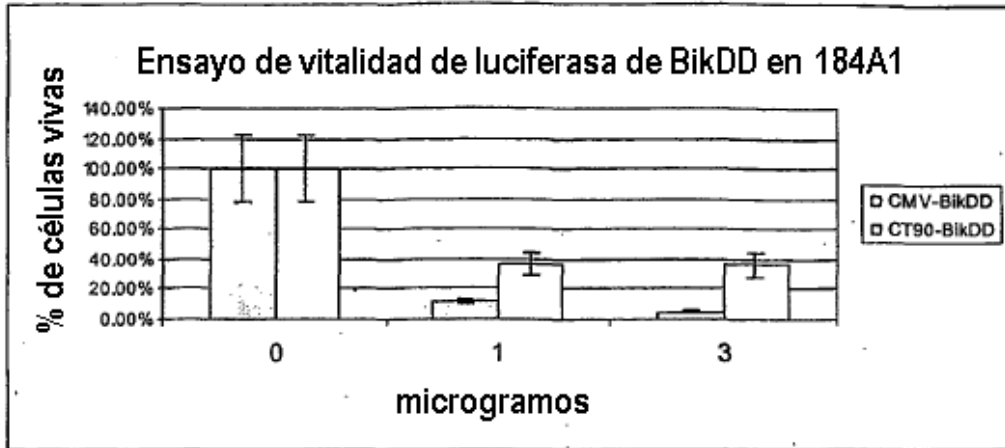


FIG. 5

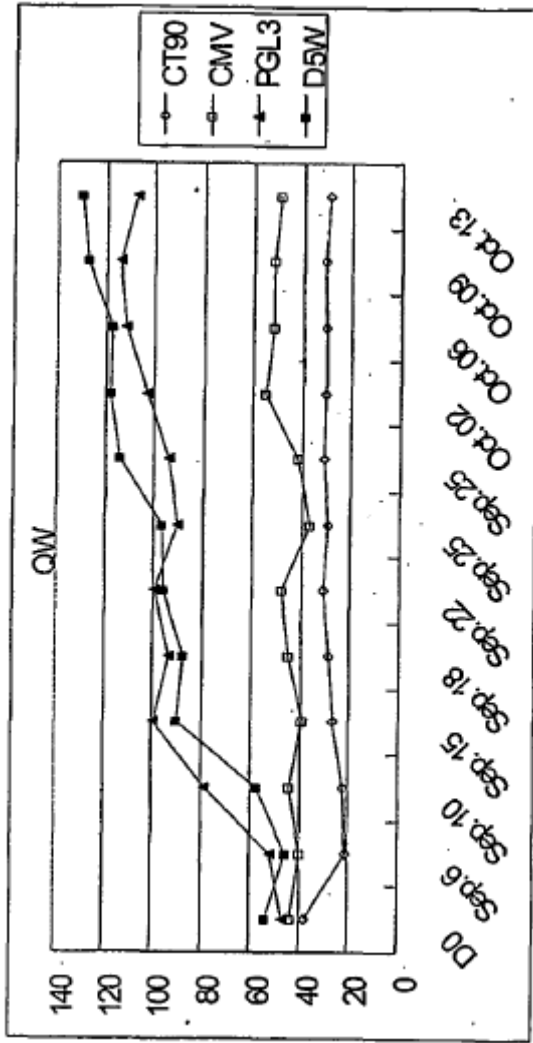


FIG. 6

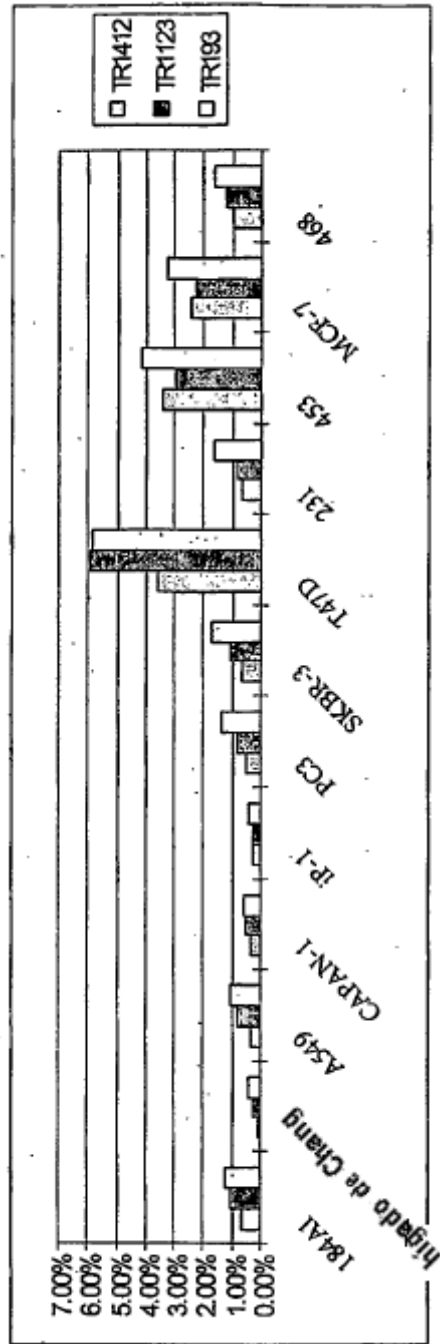


FIG. 7

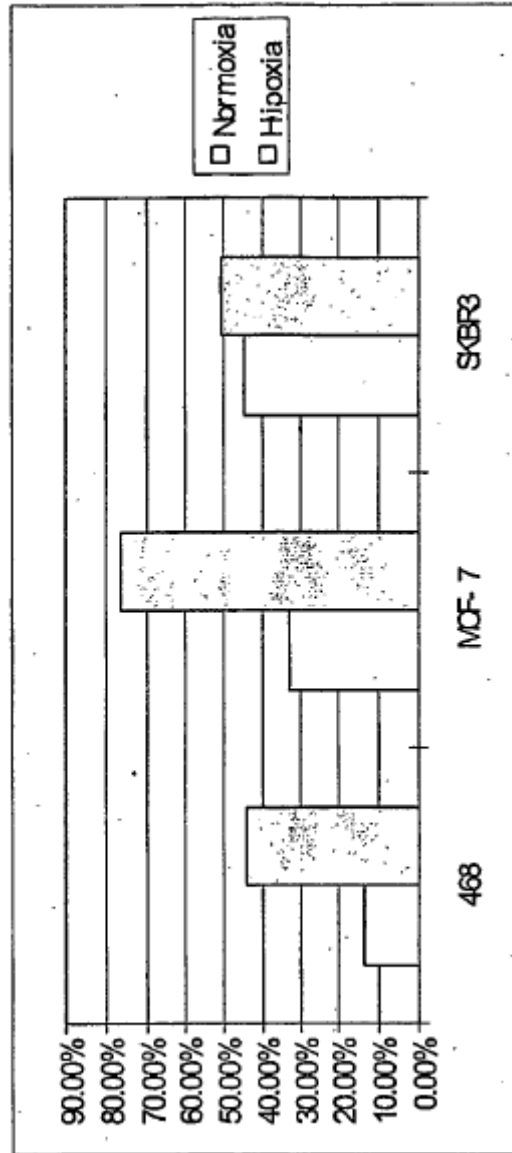


FIG. 8

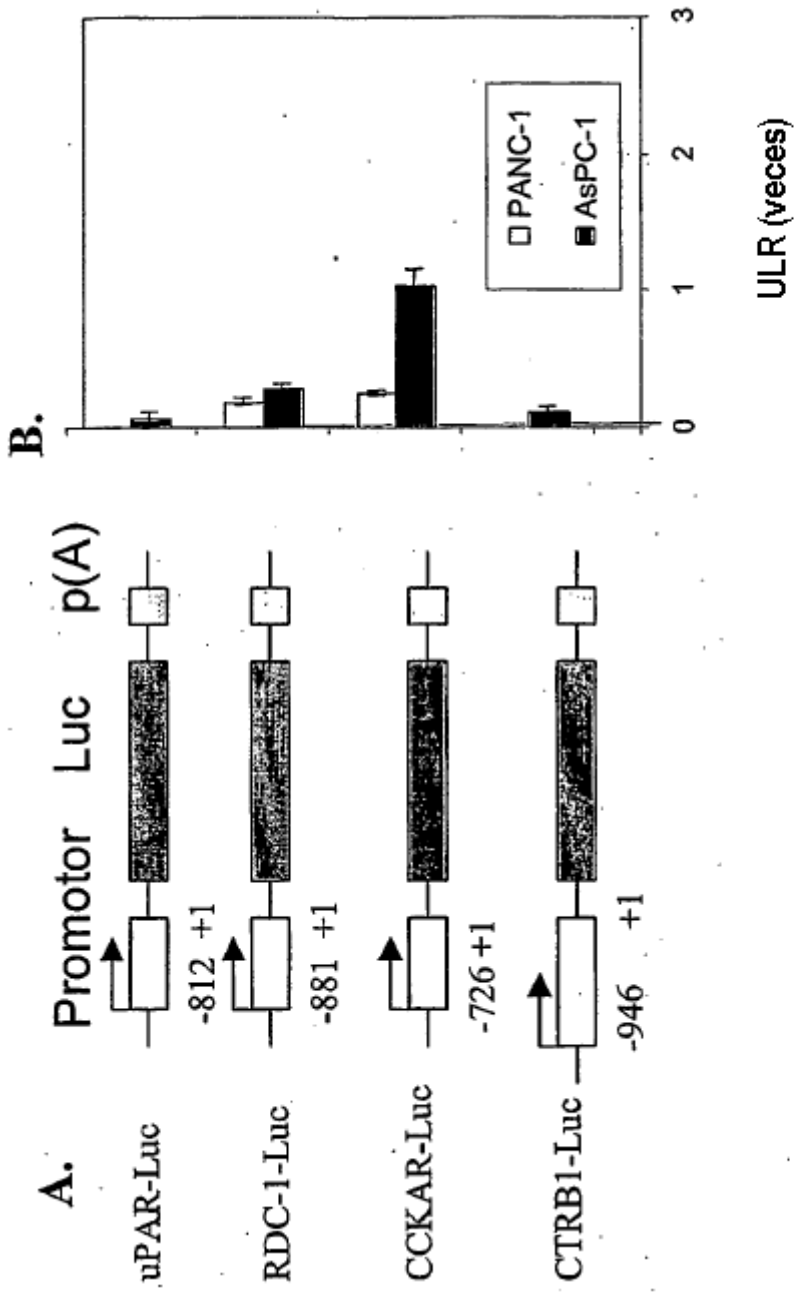


FIG. 9

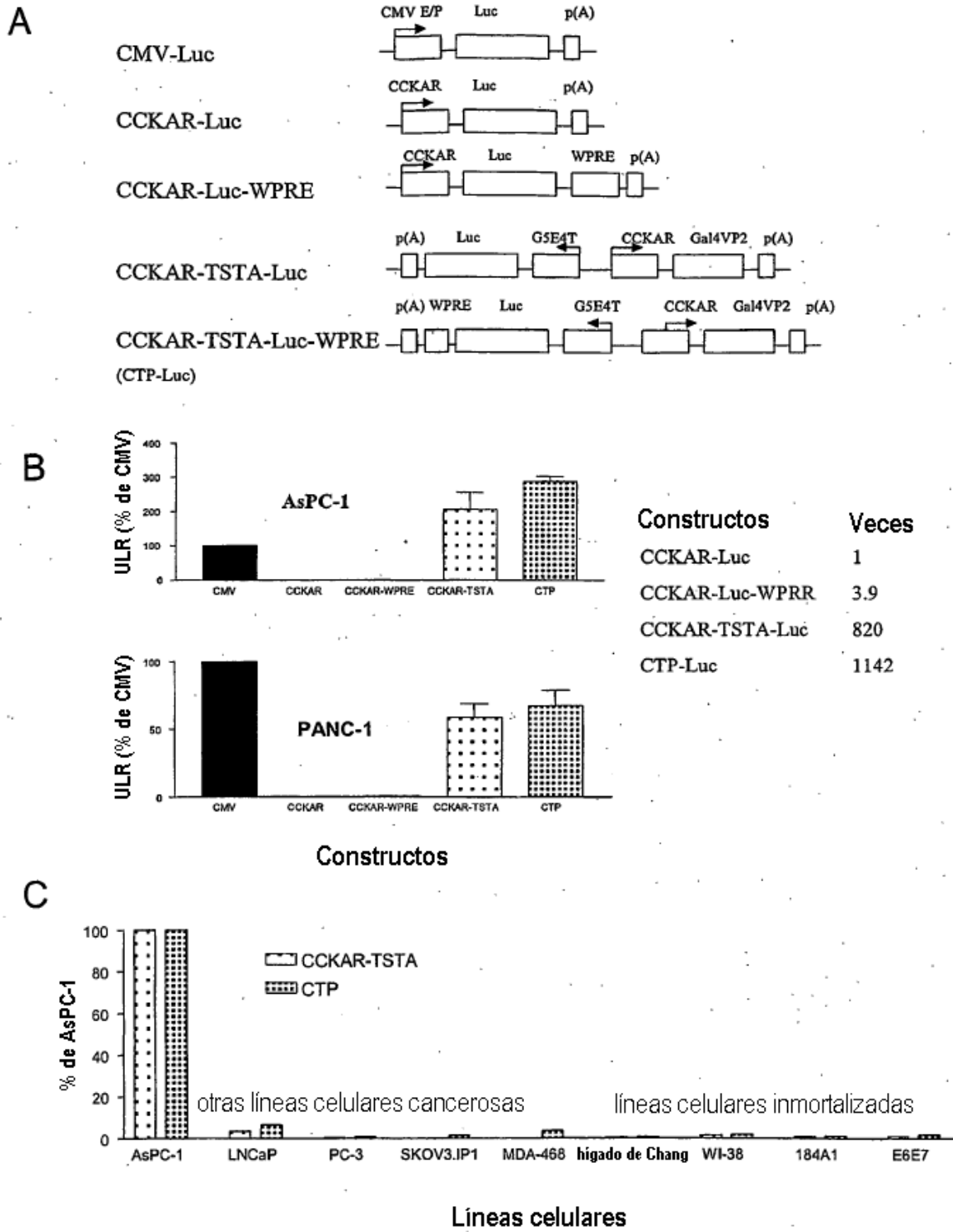
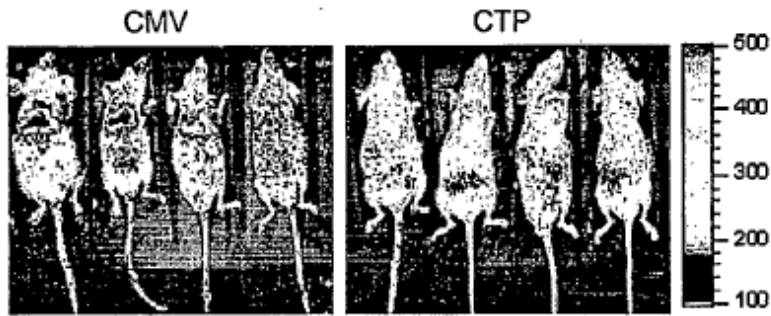


FIG. 10

A. Formación de imágenes in vivo con el sistema IVIS



B. Biodistribución con luminómetro

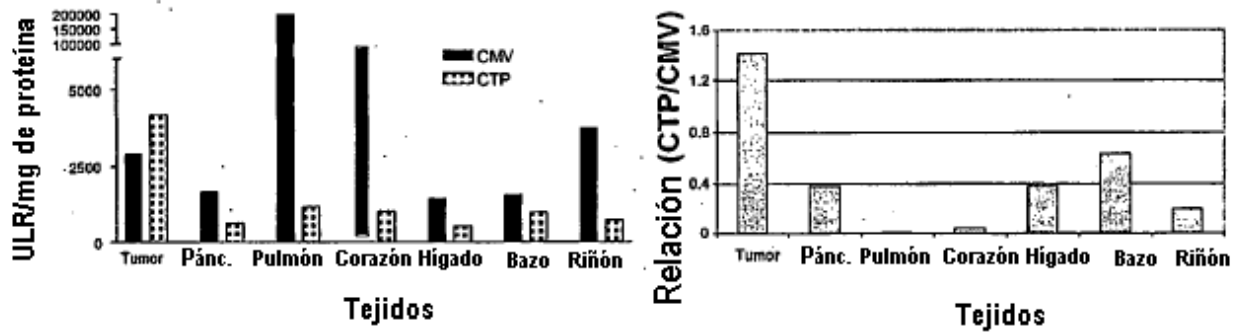
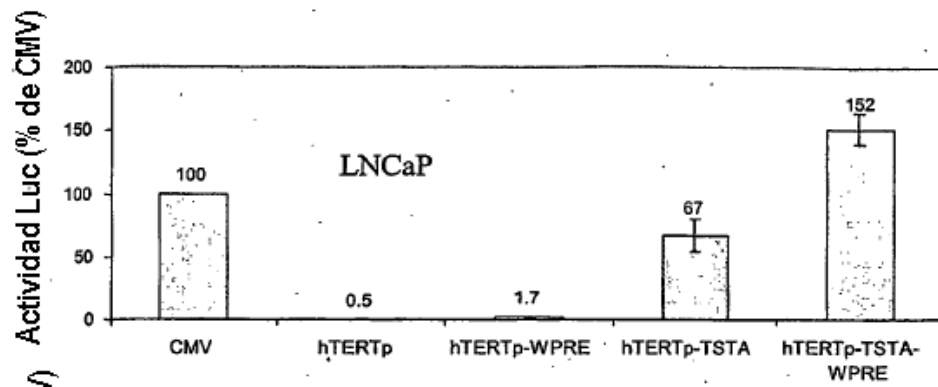
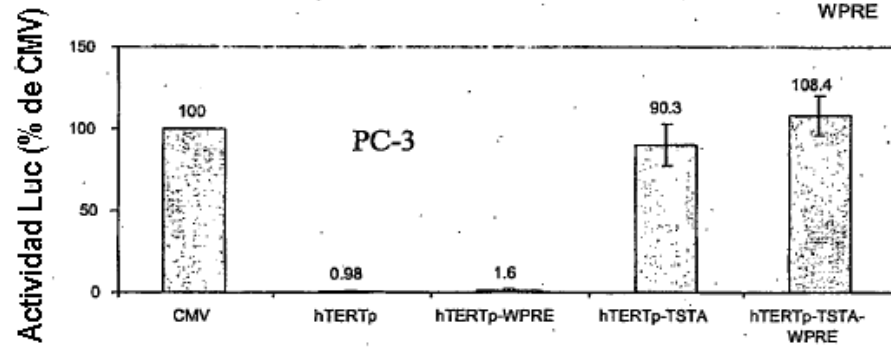


FIG. 11

A

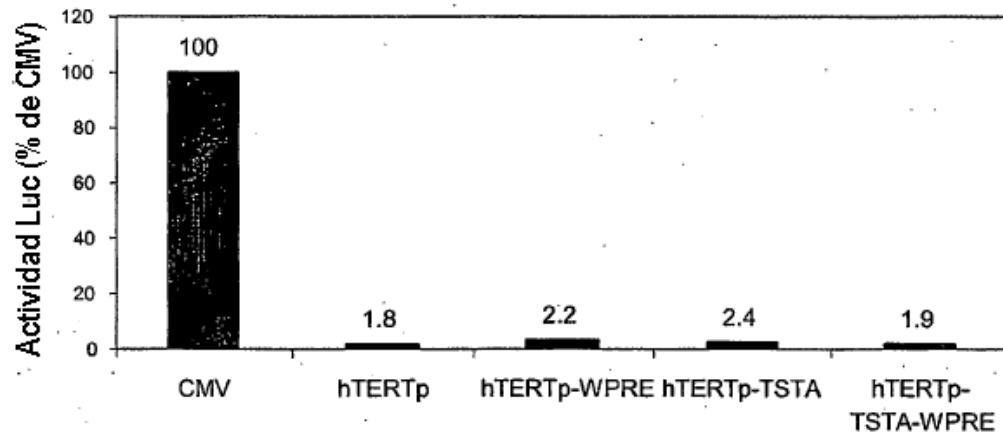


B



Constructos

C



Constructos

FIG. 12

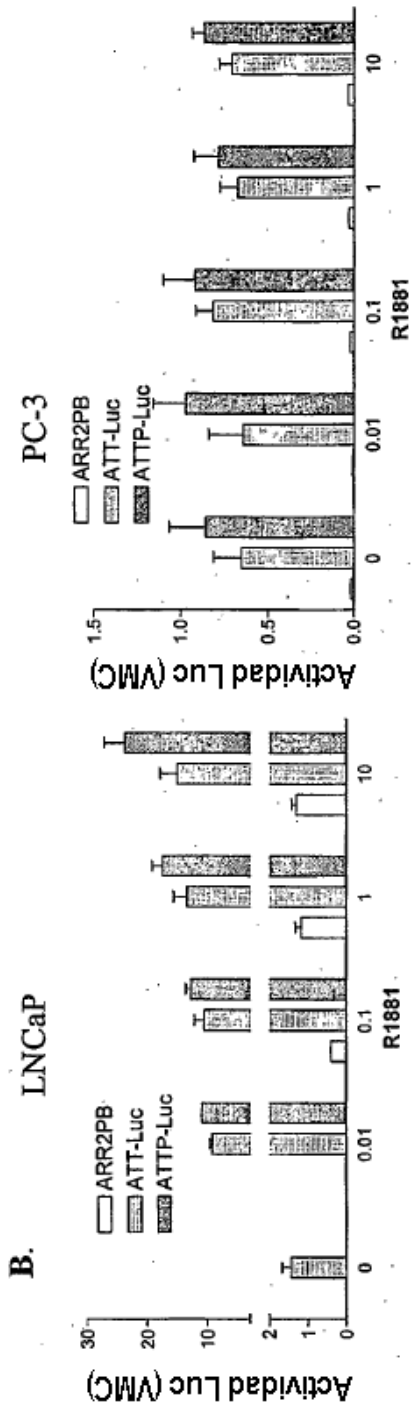
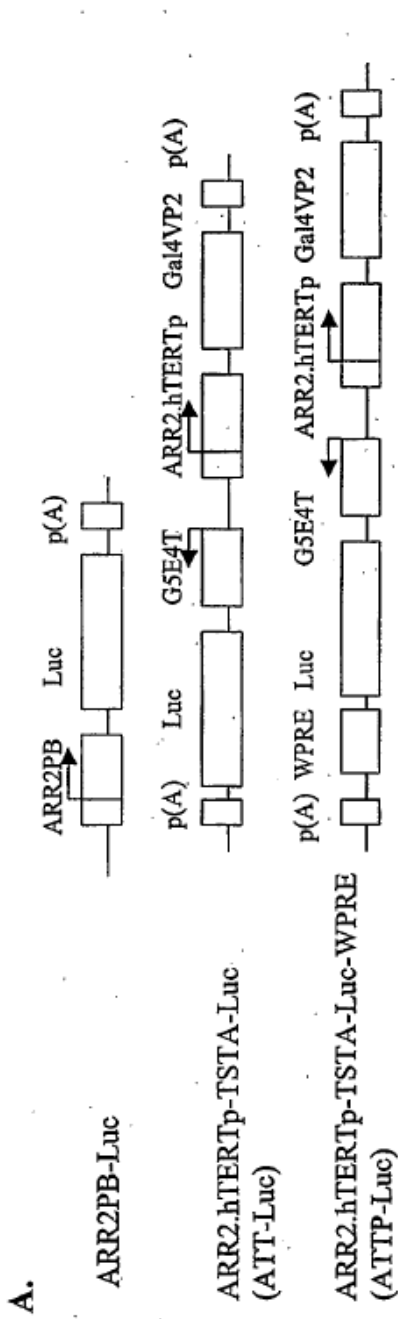


FIG. 13

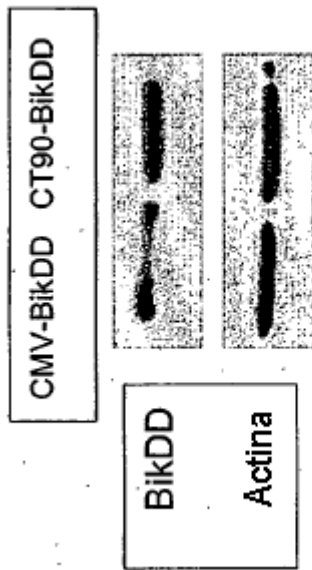
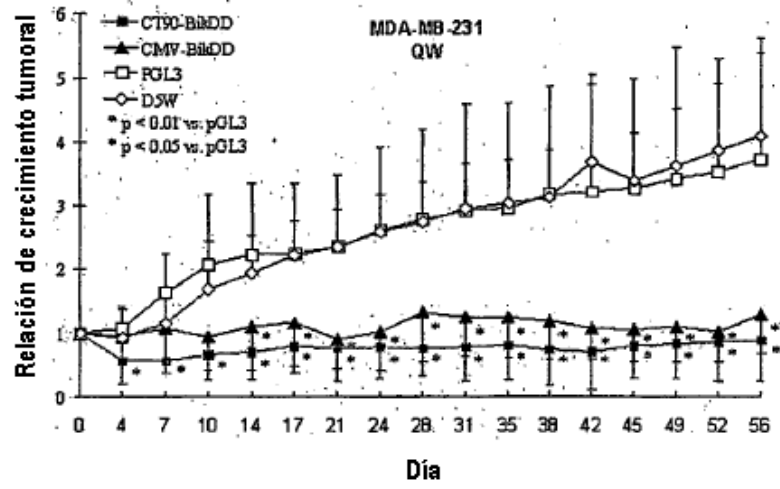


FIG. 14

A



B

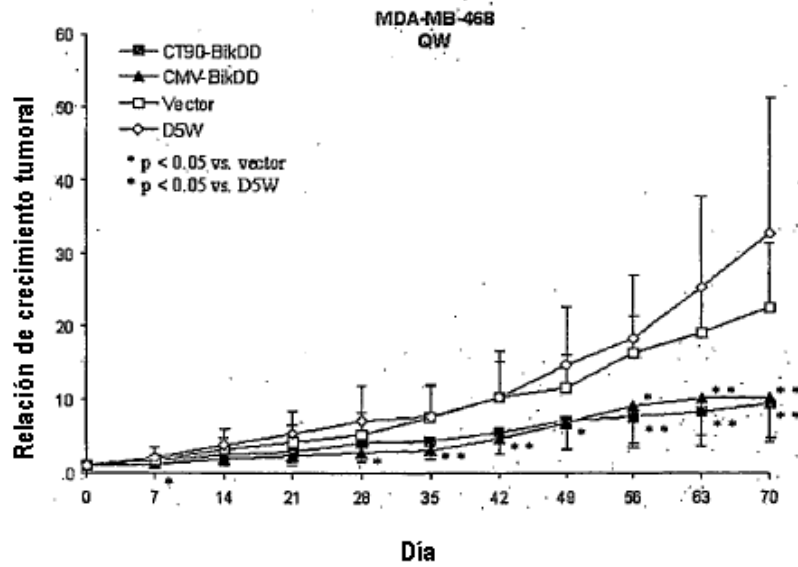
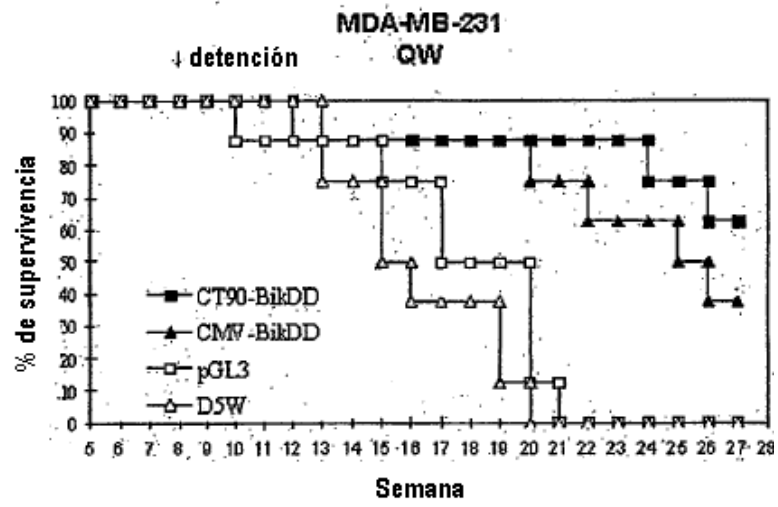


FIG. 15



	Nº de animales	Tiempo medio de superv. (semanas)	vs. D5W	vs. pGL3
CT90-BikDD	8	25.25± 1.83	p<0.002	p<0.002
CMV-BikDD	8	23.75± 1.74	p<0.002	p<0.005
pGL3	8	17.50± 1.3	N.S.	
D5W	8	16.25± 0.68		

FIG. 16

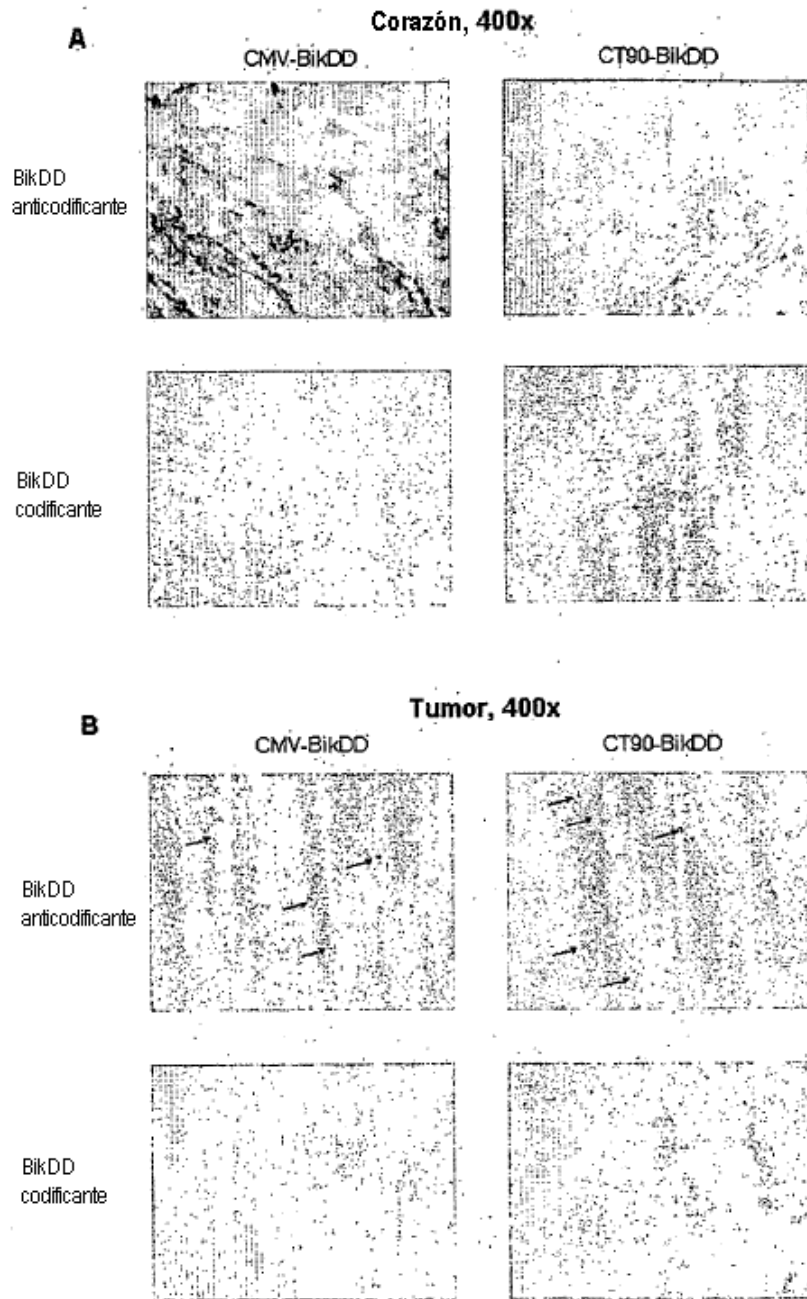


FIG. 17

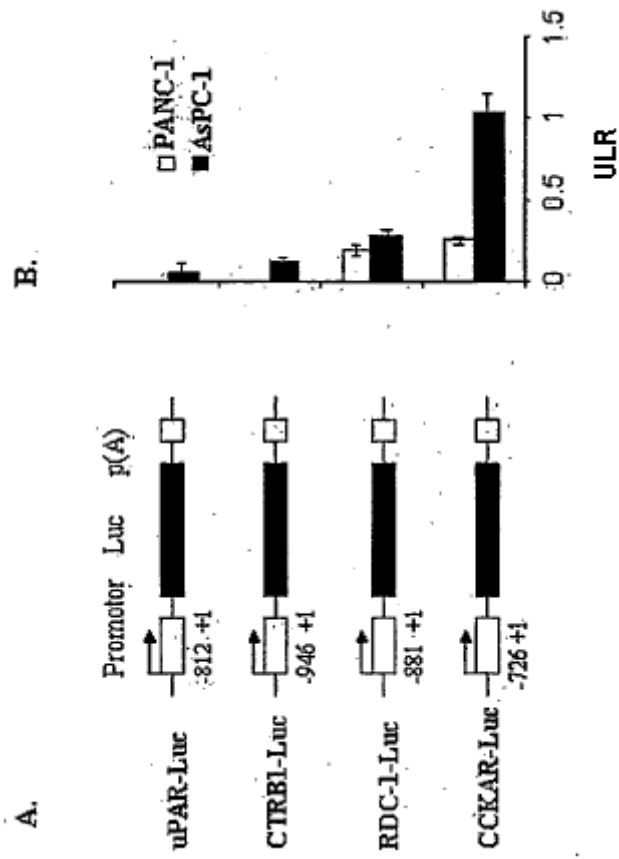
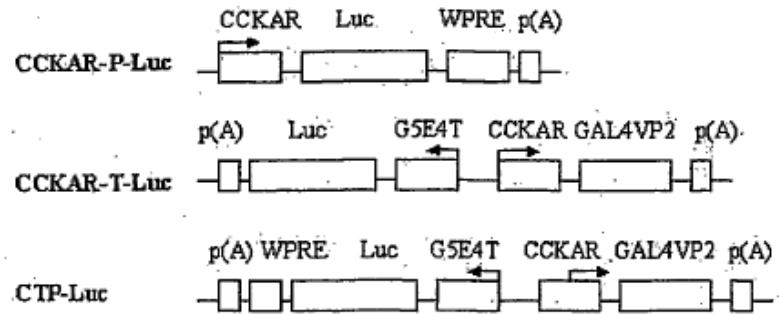


FIG. 18

A



B

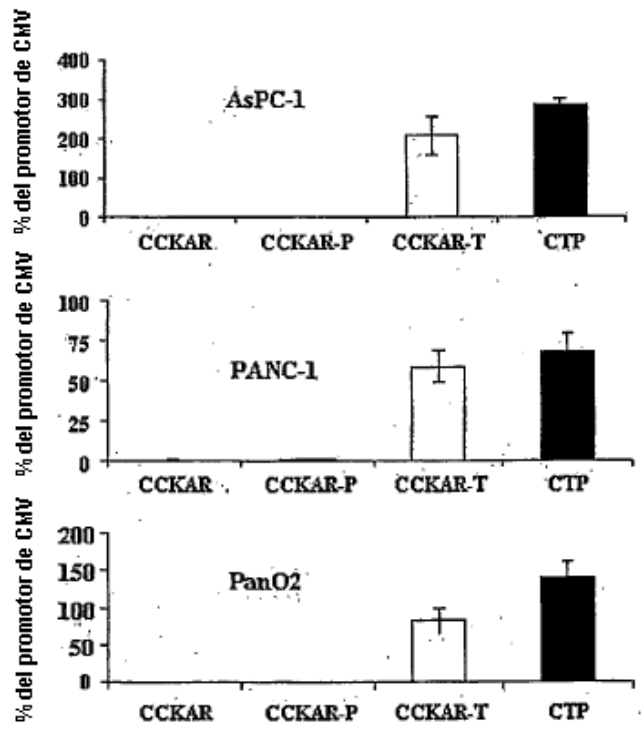


FIG. 19

C

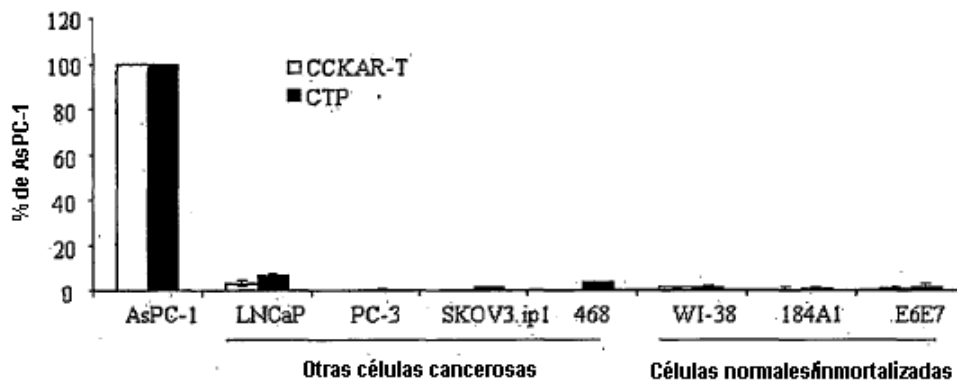


FIG. 19

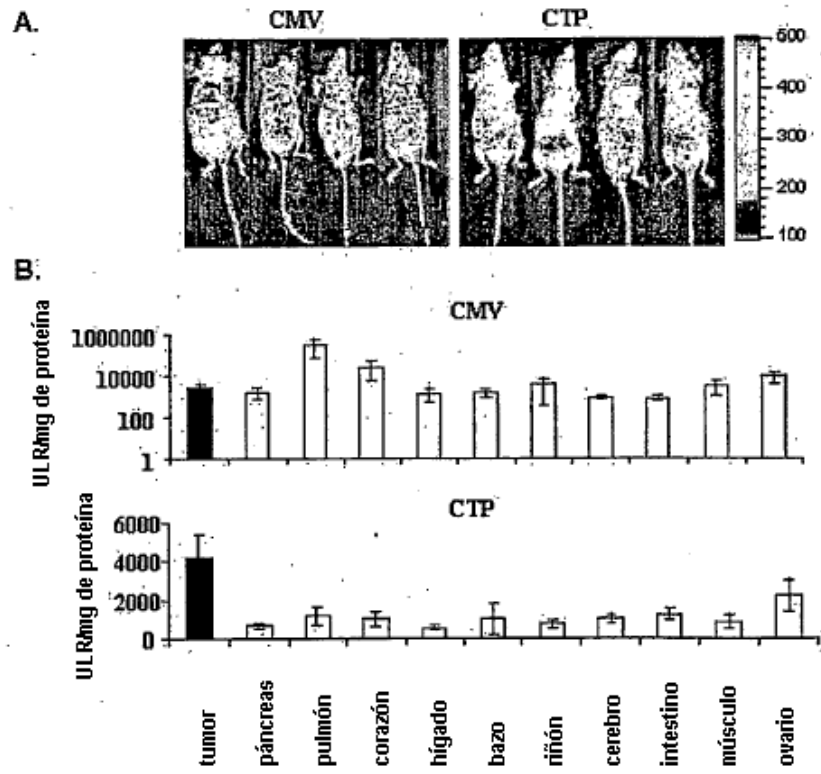


FIG. 20

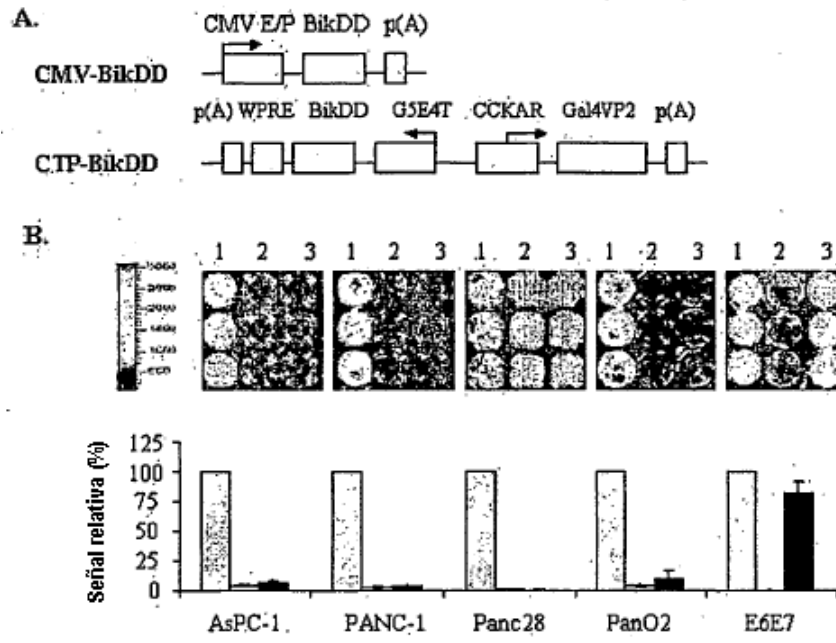


FIG. 21

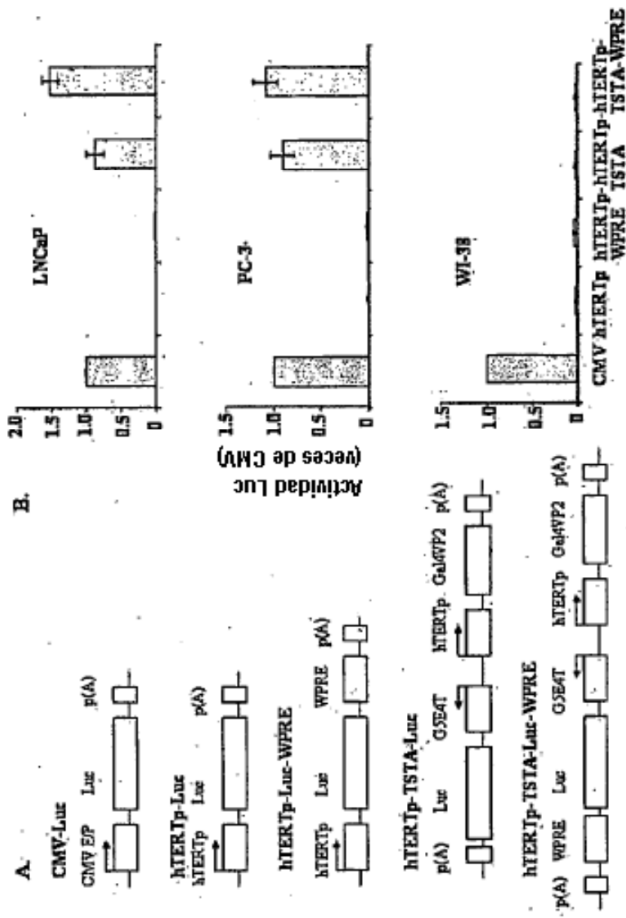


FIG. 22

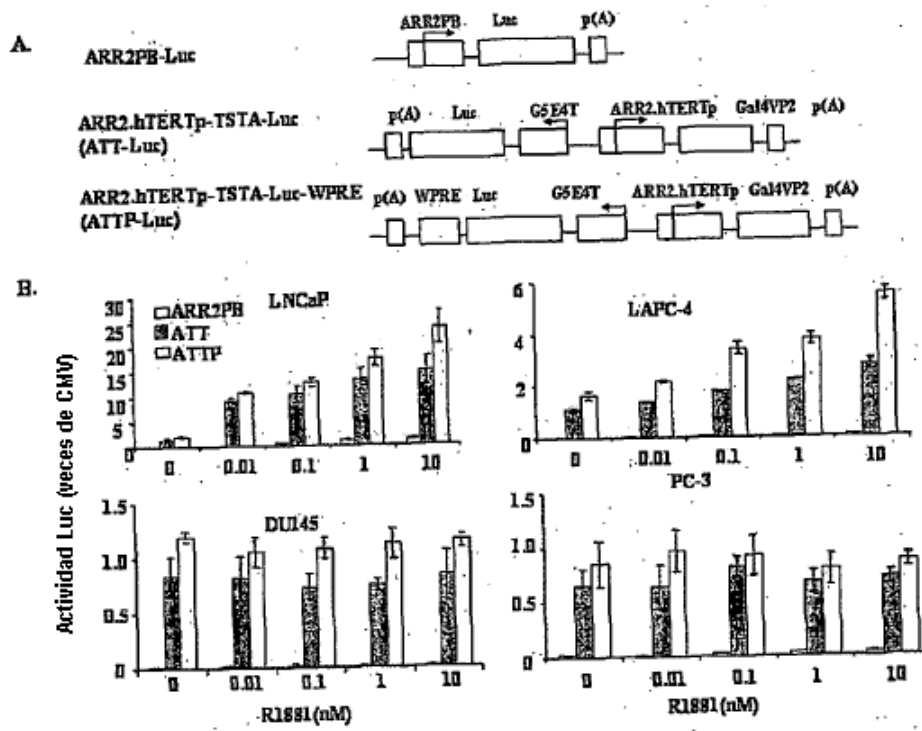


FIG. 23

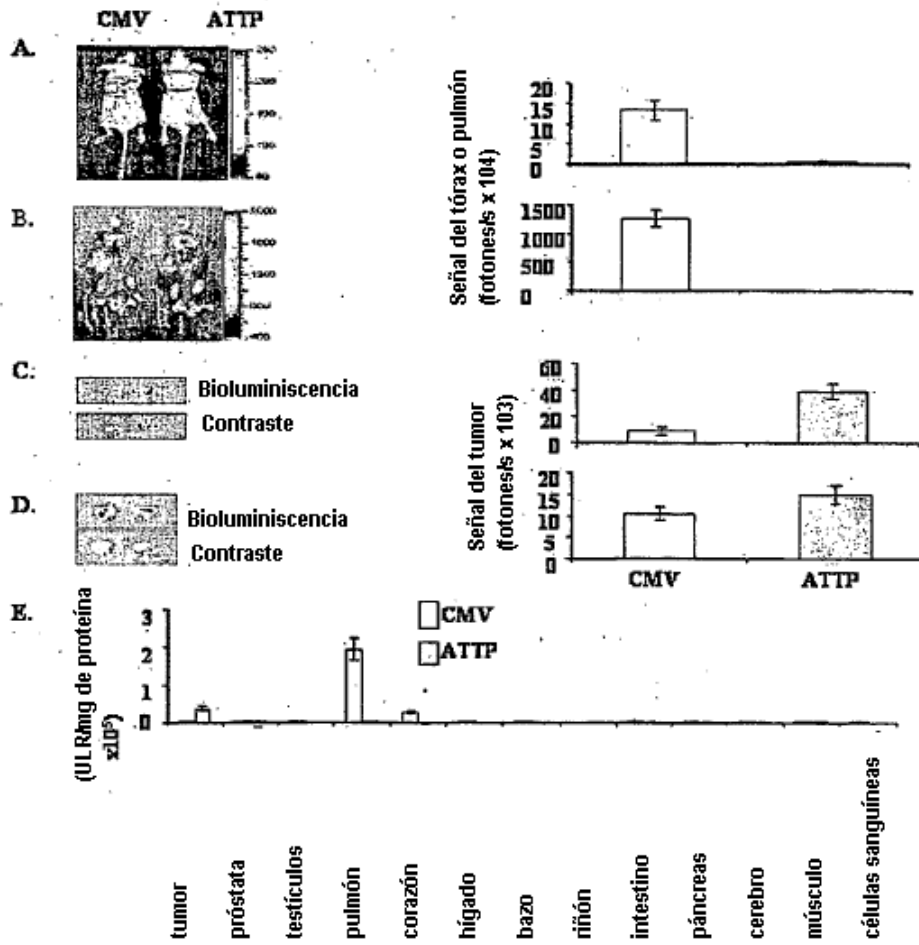


FIG. 24