

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 425 321**

51 Int. Cl.:

A61K 48/00 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.11.2001** **E 10185193 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.06.2013** **EP 2386319**

54 Título: **Promotores que muestran especificidad por células endoteliales y métodos de utilización de los mismos**

30 Prioridad:

17.11.2000 US 248582 P

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

14.10.2013

73 Titular/es:

VASCULAR BIOGENICS LTD. (100.0%)
6 Jonathan Netanyahu Street
60376 Or Yehuda, IL

72 Inventor/es:

HARATS, DROR y
BLOOM, NIRA

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 425 321 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 que muestran especificidad por células endoteliales y métodos de utilización de los mismos

Campo y antecedentes de la invención

La presente descripción hace referencia a secuencias de polinucleótidos aisladas que muestran una actividad promotora específica de las células endoteliales, y los métodos de utilización de las mismas y, más concretamente, a un promotor de preproendotelina-1 (PPE-1) modificado que muestra un incremento de actividad y especificidad en las células endoteliales. La descripción hace referencia adicionalmente a modificaciones del promotor de PPE que intensifican su expresión en respuesta a las condiciones fisiológicas incluyendo hipoxia y angiogénesis.

La terapia génica es una modalidad emergente para el tratamiento de enfermedades humanas heredadas y adquiridas. Se han dirigido grandes esfuerzos al desarrollo de métodos para la terapia génica del cáncer, las enfermedades cardiovasculares y vasculares periféricas, pero todavía existe un obstáculo principal en la liberación eficaz y específica de los genes. En general, el principal factor limitante de la terapia génica con un gen de interés utilizando un vector viral recombinante como lanzadera es la capacidad para dirigir específicamente el gen de interés al tejido diana. Los adenovirus que se utilizan para este fin son capaces de infectar una gran variedad de células con diferentes afinidades. En efecto, la utilización de un promotor no específico del tejido induce hasta 95% de la expresión del gen de interés en el hígado; por lo tanto es muy requerida la regulación de la expresión. Adicionalmente, actualmente no es viable diferenciar entre el endotelio vascular normal y el endotelio vascular en desarrollo en un tumor en crecimiento cuando se redirecciona un gen.

Tanto en el desarrollo del cáncer como en las enfermedades vasculares, la angiogénesis, creación de nuevos vasos, juega un papel principal. Por lo tanto, la regulación de este proceso por medio de terapia génica para el endotelio vascular puede ser tremendamente importante en la inducción de una terapia dirigida para estas enfermedades.

Se obtuvo una elevada eficacia de la preproendotelina-1 humana (PPE-1), liberada por un vector retroviral, en células endoteliales (CE) in vitro, y en modelos de animales transgénicos. Sin embargo, la técnica anterior no ilustra el uso de este promotor para la terapia génica in vivo. La PPE-1 humana carece de los elementos reguladores encontrados en los genes de PPE-1 de otros animales, muy notablemente de ratón.

La patente de los Estados Unidos 5.747.340 ilustra el uso del promotor de PPE-1 murino y porciones del mismo. Sin embargo, esta patente no contiene indicios o sugerencias de que se pueda emplear un intensificador específico endotelial para incrementar el nivel de expresión logrado con el promotor de PPE a la vez que se conserva la especificidad endotelial. Adicionalmente, esta patente no ilustra que el promotor de PPE-1 sea inducido a niveles más altos de transcripción en condiciones hipóxicas.

Existe por lo tanto una necesidad ampliamente reconocida de, y sería muy ventajoso tener, un promotor específico de células endoteliales mejorado, métodos de uso del mismo y células transformadas con el mismo desprovistas de las limitaciones anteriores. Se espera que la invención descrita demuestre una utilidad añadida en el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares, el cáncer y la curación de heridas con respecto a las configuraciones previamente conocidas.

Compendio de la invención

De acuerdo con un aspecto de la presente descripción se proporciona un polinucleótido aislado funcional como promotor en células eucarióticas. El polinucleótido aislado incluye un elemento intensificador que incluye al menos dos copias de la secuencia mostrada en el SEQ ID NO: 6.

De acuerdo con otro aspecto de la presente descripción se proporciona un método de expresión de una secuencia de ácido nucleico de interés, que codifica una molécula de ARN activa o una proteína tal como una enzima, una molécula informadora, y similares, en las células endoteliales. El método incluye administrar a un sujeto un constructo que incluye la secuencia de ácido nucleico de interés situada bajo el control regulador de un promotor funcional en células eucarióticas. El constructo incluye adicionalmente un elemento intensificador que incluye al menos una copia de la secuencia mostrada en el SEQ ID NO: 6.

De acuerdo con otro aspecto más de la presente descripción se proporciona un método de regulación de la angiogénesis en un tejido. El método incluye administrar un constructo de ácido nucleico que incluye: (a) un promotor específico de células endoteliales; (b) al menos una copia de un elemento de respuesta a hipoxia mostrado en el SEQ ID NO: 5; y (c) una secuencia de ácido nucleico que codifica un regulador de la angiogénesis, estando la secuencia de ácido nucleico bajo el control regulador del promotor y el elemento de respuesta a hipoxia.

De acuerdo con otro aspecto de la presente descripción se proporciona un polinucleótido aislado funcional como promotor en células eucarióticas. El polinucleótido aislado incluye un elemento intensificador que incluye la secuencia mostrada en el SEQ ID NO: 7.

- De acuerdo con un aspecto adicional de la presente descripción se proporciona un método de regulación de la angiogénesis en un tejido. El método incluye administrar un constructo de ácido nucleico que incluye: (a) un promotor específico de células endoteliales; (b) un elemento intensificador que incluye la secuencia mostrada en el SEQ ID NO: 7; (c) al menos una copia de un elemento de respuesta a hipoxia mostrado en el SEQ ID NO: 5; y (d)
- 5 una secuencia de ácido nucleico que codifica un regulador de la angiogénesis, estando la secuencia de ácido nucleico bajo el control regulador del promotor, el elemento intensificador y el elemento de respuesta a hipoxia.
- De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención se proporciona un polinucleótido aislado funcional como promotor en células eucarióticas, el polinucleótido aislado incluye un elemento intensificador que incluye al menos una copia de la secuencia mostrada en el SEQ ID NO: 8.
- 10 De acuerdo con un aspecto adicional de la presente descripción se proporciona un método de expresión de una secuencia de ácido nucleico de interés en células endoteliales, incluyendo el método administrar a un sujeto un constructo, incluyendo el constructo la secuencia de ácido nucleico de interés situada bajo el control regulador de un promotor funcional en células eucarióticas, y un elemento intensificador que incluye al menos una copia de la secuencia mostrada en el SEQ ID NO: 8.
- 15 De acuerdo con otro aspecto adicional de la presente invención se proporciona un polinucleótido aislado funcional como promotor en células eucarióticas, incluyendo el polinucleótido aislado un elemento intensificador que incluye la secuencia mostrada en el SEQ ID NO: 8.
- De acuerdo con características adicionales de las realizaciones preferidas de la descripción descritas más abajo, el elemento intensificador incluye tres copias de la secuencia mostrada en el SEQ ID NO: 6.
- 20 De acuerdo con otras características adicionales de las realizaciones preferidas de la descripción, las al menos dos copias de la secuencia mostrada en el SEQ ID NO: 6 son contiguas.
- De acuerdo con otras características adicionales de las realizaciones preferidas de la descripción, el polinucleótido aislado incluye adicionalmente un elemento promotor específico endotelial.
- 25 De acuerdo con otras características adicionales de las realizaciones preferidas de la descripción, el elemento promotor específico endotelial incluye al menos una copia del promotor de PPE-1.
- De acuerdo con otras características adicionales de las realizaciones preferidas de la descripción, el polinucleótido aislado incluye adicionalmente un elemento de respuesta a hipoxia.
- De acuerdo con otras características adicionales de las realizaciones preferidas de la invención, el elemento de respuesta a hipoxia incluye al menos una copia de la secuencia mostrada en el SEQ ID NO: 5.
- 30 De acuerdo con otras características adicionales de las realizaciones preferidas de la invención, el elemento intensificador es como se muestra en el SEQ ID NO: 7.
- De acuerdo con otras características adicionales de las realizaciones preferidas de la invención, se proporciona un constructo de ácido nucleico que incluye un polinucleótido aislado reivindicado y una secuencia de ácido nucleico de interés, estando la secuencia de ácido nucleico de interés bajo el control regulador del polinucleótido aislado.
- 35 De acuerdo con otras características adicionales de las realizaciones preferidas de la descripción, la secuencia de ácido nucleico de interés se selecciona del grupo que consiste en VEGF, p53 y PDGF-BB.
- De acuerdo con otras características adicionales de las realizaciones preferidas de la descripción, se proporciona una célula de mamífero transformada con un polinucleótido aislado reivindicado.
- 40 De acuerdo con otras características adicionales de las realizaciones preferidas de la descripción, el promotor muestra especificidad para las células endoteliales.
- De acuerdo con otras características adicionales de las realizaciones preferidas de la invención, el promotor es el promotor de PPE-1 mostrado en el SEQ ID NO: 1.
- De acuerdo con otras características adicionales de las realizaciones preferidas de la descripción, la administración se efectúa mediante un método seleccionado del grupo que consiste en: (i) administración sistémica in vivo; (ii)
- 45 administración ex vivo a células retiradas del organismo de un sujeto y reintroducción posterior de las células en el organismo del sujeto; y (iii) administración local in vivo.
- De acuerdo con otras características adicionales de las realizaciones preferidas de la invención, el constructo de ácido nucleico incluye adicionalmente un elemento intensificador que incluye el menos dos copias de la secuencia mostrada en el SEQ ID NO: 6.
- 50 De acuerdo con otras características adicionales de las realizaciones preferidas de la invención, el promotor específico de células endoteliales incluye al menos una copia del promotor de PPE-1.

De acuerdo con otras características adicionales de las realizaciones preferidas de la invención, se proporciona un constructo de ácido nucleico que incluye un polinucleótido aislado reivindicado y una secuencia de ácido nucleico de interés, estando la secuencia de ácido nucleico de interés bajo el control regulador del polinucleótido aislado.

5 De acuerdo con otras características adicionales de las realizaciones preferidas, el elemento intensificador incluye adicionalmente al menos una copia de la secuencia mostrada en el SEQ ID NO: 6.

De acuerdo con otras características adicionales de las realizaciones preferidas descritas, el elemento intensificador incluye una copia de la secuencia mostrada en el SEQ ID NO: 8 y al menos dos copias de la secuencia mostrada en el SEQ ID NO: 6.

10 De acuerdo con otras características adicionales de las realizaciones preferidas descritas, el elemento intensificador incluye adicionalmente al menos una copia de la secuencia mostrada en el SEQ ID NO: 6.

De acuerdo con otras características adicionales de las realizaciones preferidas descritas, la al menos una copia incluye dos copias.

15 De acuerdo con otras características adicionales de las realizaciones preferidas descritas, el constructo de ácido nucleico incluye adicionalmente un elemento intensificador que incluye al menos una copia de la secuencia mostrada en el SEQ ID NO: 8.

20 De acuerdo con otro aspecto adicional de la presente descripción, se proporciona un método de regulación de la angiogénesis en un tejido, comprendiendo el método administrar un constructo de ácido nucleico que incluye: (a) un promotor específico de células endoteliales; (b) un elemento intensificador que incluye al menos una copia de la secuencia mostrada en el SEQ ID NO: 8; y (c) una secuencia de ácido nucleico que codifica un regulador de la angiogénesis, estando la secuencia de ácido nucleico bajo el control regulador del promotor y el elemento intensificador.

De acuerdo con otras características adicionales de las realizaciones preferidas descritas, el elemento intensificador incluye adicionalmente al menos una copia de la secuencia mostrada en el SEQ ID NO: 6.

25 De acuerdo con otras características adicionales de las realizaciones preferidas descritas, el elemento intensificador incluye una copia de la secuencia mostrada en el SEQ ID NO: 8 y al menos dos copias de la secuencia mostrada en el SEQ ID NO: 6.

30 La presente invención aborda con éxito los defectos de las configuraciones actualmente conocidas proporcionando secuencias de polinucleótidos aisladas mejoradas con especificidad para las células endoteliales, y los métodos de uso de las mismas. Las mejoras en la secuencia hacen factibles métodos de tratamiento de una variedad de enfermedades, trastornos y afecciones que anteriormente se consideraban inviables. Específicamente, las mejoras hacen referencia a un aumento de la especificidad para las células endoteliales, un incremento de los niveles de expresión de una secuencia de interés y una intensificación de la inducción por afecciones que incluyen isquemia y angiogénesis.

Breve descripción de los dibujos

35 La invención se describe en la presente memoria, a modo de ejemplo solamente, con referencia a los dibujos adjuntos. Con una referencia específica a continuación a los dibujos con detalle, se hace hincapié en que las particularidades mostradas están a modo de ejemplo y para ilustrar la discusión de las realizaciones preferidas de la presente invención únicamente, y se presentan con el fin de proporcionar lo que se cree que es la descripción más útil y fácilmente comprendida de los principios y los aspectos conceptuales de la invención. En este sentido, no se intenta mostrar detalles estructurales de la invención con más detalle del necesario para una comprensión fundamental de la invención, tomando la descripción junto con los dibujos que hacen evidente a los expertos en la técnica cómo se pueden poner en práctica las diversas formas de la invención.

En los dibujos:

45 La FIG. 1 es un histograma que ilustra el efecto del elemento intensificador de la presente invención sobre la expresión de la Luciferasa en líneas celulares endoteliales tanto bovinas como humanas utilizando la línea celular B2B como control no endotelial.

La FIG. 2 es un histograma que ilustra la especificidad endotelial de un promotor de la presente invención en un vector adenoviral sobre la expresión de la Luciferasa en diferentes líneas celulares.

50 Las FIG. 3A y 3B son fotomicrografía s que ilustran la expresión de GFP bajo el control de Ad5PPE-1-3X de la presente invención y un constructo de control Ad5CMV en la línea celular BAEC.

La FIG. 4 es un histograma del % de apoptosis inducido por pACPPE-1-3Xp55, pACPPE-1-3XLuciferasa y pCCMVp55 en células endoteliales y no endoteliales.

La FIG. 5 es un histograma que ilustra el efecto de introducir un elemento intensificador de acuerdo con la presente invención en un constructo promotor sobre la respuesta a la hipoxia.

La FIG. 6 es un histograma que ilustra el efecto de introducir un elemento intensificador de acuerdo con la presente invención en un promotor de un constructo de adenovector sobre la respuesta a la hipoxia.

- 5 La FIG. 7 es un histograma que ilustra el efecto de introducir un elemento intensificador de acuerdo con la presente invención en un promotor sobre los niveles de expresión en líneas celulares endoteliales bovinas y humanas.

La FIG. 8 es un histograma que ilustra los niveles de expresión de un gen informador observados en diferentes órganos después de la inyección de un constructo adenoviral que contiene un promotor endotelial (PPE-1) o un promotor de control (CMV);

- 10 Las FIG. 9A-B son dos fotomicrografía s que ilustran la expresión celular de un constructo de Ad5CMVGFP (Figura 9a) y un constructo de Ad5PPE-1-GFP (Figura 9b) en tejido hepático de ratones a los que se han inyectado los constructos.

La FIG. 10 es un histograma que ilustra el efecto de introducir un elemento intensificador de acuerdo con la presente invención en un promotor sobre los niveles de expresión en líneas celulares endoteliales y no endoteliales.

- 15 La FIG. 11 es un histograma que ilustra el efecto de introducir un elemento intensificador de acuerdo con la presente invención en un promotor sobre los niveles de expresión en líneas celulares endoteliales y no endoteliales.

Las FIG. 12A-C son fotomicrografía s que ilustran la expresión de GFP en células transducidas con Ad5PPE-1-3XGFP, células transducidas con Ad5PPE-1GFP y células transducidas con Ad5CMVGFP respectivamente.

- 20 Las FIG. 13A-B ilustran la expresión de GFP en SMC transducidas por un moi-1 de Ad5PPE-1-3XGFP y Ad5CMVGFP respectivamente.

Las FIG. 14A-B muestran los resultados de un experimento similar al de las Figuras 13A-B llevado a cabo con células HeLa.

Las FIG. 15A-B muestran los resultados de un experimento similar al de las Figuras 13A-B llevado a cabo con células HepG2.

- 25 Las FIG. 16A-B muestran los resultados de un experimento similar al de las Figuras 13a-b llevado a cabo con células NSF.

Las FIG. 17A-B son fotomicrografía s que ilustran la expresión de GFP en células endoteliales que recubren los vasos sanguíneos de ratones a los que se han inyectado los constructos de Ad5PPE-1GFP y Ad5PPE-1-3XGFP respectivamente.

- 30 Las FIG. 18A-C son fotomicrografía s que ilustran los resultados de tejido de riñón de ratones inyectados. Ratones a los que se ha inyectado Ad5CMVGFP (Figura 18A), Ad5PPE-1GFP (Figura 18B; es visible la expresión ligeramente superior de GFP en la pared del vaso sanguíneo; indicado por una flecha) y Ad5PPE-1-3XGFP (Figura 18C).

Las FIG. 19A-C ilustran experimentos similares a los descritos en las Figuras 18A-C, llevados a cabo en secciones de tejido de bazo.

- 35 Las FIG. 20A-D y 20C'-D' ilustran la expresión de GFP en pulmones metastásicos de ratones de control a los que se ha inyectado Solución Salina (Figura 20A), ratones a los que se ha inyectado Ad5CMVGFP (Figura 20 B), ratones a los que se ha inyectado Ad5PPE-1GFP (Figura 20 C) y ratones a los que se ha inyectado Ad5PPE-1-3XGFP (Figura 20D). La inmunotinción anti-Cd31 (Figuras 20C' a 20D') confirma la co-localización de la expresión de GFP y la expresión de CD31 en cada tejido metastásico.

- 40 La FIG. 21 es un histograma que ilustra que la actividad Luciferasa (unidades de luz/μg de proteína) en BAEC transfectadas con un plásmido que contenía el promotor de PPE-1 murino es significativamente mayor cuando las células transfectadas fueron incubadas en condiciones hipoxicas.

La FIG. 22 es un histograma como el de la Figura 21, excepto que se emplearon Ad5PPE-1Luc y Ad5CMVLuc.

- 45 FIG. 23 es una serie de histogramas como los de la Figura 22 que muestra los efectos de la hipoxia en diferentes líneas celulares.

La FIG. 24 es un histograma que ilustra el efecto de la secuencia 3X de la presente invención sobre la respuesta a la hipoxia de PPE-1 en células BAEC. Las células fueron transducidas por Ad5PPE-1Luc y Ad5PPE-1-3XLuc.

La FIG. 25 es un histograma que muestra los niveles de expresión de Luciferasa en ratones transgénicos PPE-1-Luc después de la ligadura de la arteria femoral.

Las FIG. 26A-B son mapas plasmídicos de constructos empleados junto con la presente invención.

Las FIG. 27A-D son una serie de imágenes de ultrasonido de miembros ligados de animales representativos de los diferentes grupos de tratamiento, 21 días después de la ligadura. Figura 27A Control, tratado con Ad5CMVLuc; Figura 27B Control, tratado con solución salina; Figura 27C tratado con Ad5PPE-3X-VEGF; Figura 27D tratado con Ad5CMV-VEGF.

La FIG. 28 es un histograma que ilustra la actividad Luciferasa en Células Endoteliales Aórticas Bovinas en proliferación y quiescentes (BAEC) transducidas con Ad5PPE-1Luc (barras vacías) y Ad5CMVLuc (barras de color negro).

La FIG. 29 es un histograma que ilustra la actividad Luciferasa en BAEC transducidas con Ad5PPE-1Luc, durante la proliferación normal, un estado quiescente y una proliferación rápida después de la adición de VEGF.

Las FIG. 30A-B son histogramas que ilustran la actividad Luciferasa (unidades de luz/ μ g de proteína) en (Figura 30A) aortas e hígados (Figura 30B) de ratones C57BL/6 normales a los que se ha inyectado Ad5PPE-1Luc y Ad5CMVLuc. Las actividades se determinaron 1 (n=13), 5 (n=34), 14 (n=32), 30 (n=20) y 90 (n=11) días después de la inyección.

Las FIG. 31A-B son histogramas que ilustran la actividad Luciferasa relativa (unidades de luz/ μ g de proteína) detectada cinco (Figura 31A) y catorce (Figura 31B) (n=10 para cada momento determinado) días después de la inyección de Ad5PPE-1Luc (barras vacías) o Ad5CMVLuc (barras de color negro) en ratones BALB/C normales inyectados. La actividad se expresa como el porcentaje de la expresión de Luciferasa corporal total de cada animal.

La FIG. 32 es una imagen de la técnica anterior que representa una Aorta diseccionada de ratones carentes de ApoE coloreada con Sudan - IV. La aorta torácica contiene menos lesión aterosclerótica teñida de color rojo mientras la región abdominal incluye muchas lesiones ateroscleróticas teñidas de color rojo. (Adaptada partir de la Formación de Imágenes de lesiones ateroscleróticas Aórticas por 125 I-HDL y 125 I-BSA. A. Shaish et al, Pathobiology – presentado para su publicación).

La FIG. 33 es un histograma que ilustra la actividad Luciferasa absoluta (unidades de luz/ μ g de proteína) detectada 5 días después de las inyecciones sistémicas de Ad5PPE-1Luc (barras vacías; n=12) o Ad5CMVLuc (barras de color negro; n=12) en ratones carentes de ApoE. Se observó la actividad Luciferasa de la aorta abdominal que contiene niveles altos de lesión y del área torácica (niveles bajos de lesión).

La FIG. 34 es un histograma que ilustra la actividad Luciferasa absoluta (unidades de luz/ μ g de proteína) 5 días después de las inyecciones sistémicas de Ad5PPE-1Luc (barras de color negro) o Ad5CMVLuc (barras vacías) para la curación de heridas en ratones inducidos C57BL/6.

La FIG. 35 es un histograma que ilustra la actividad Luciferasa en pulmón normal, pulmón metastásico y tumor primario de ratones en los que se ha inducido carcinoma pulmonar de Lewis. El carcinoma pulmonar de Lewis fue inducido por medio de una inyección de células D122-96 en los dorsos para el modelo de tumor primario y en la almohadilla plantar para el modelo metastásico. La actividad Luciferasa se midió cinco días después de la inyección sistémica de Ad5PPE-1Luc (n=9; barras vacías) o Ad5CMVLuc (n=12; barras de color negro). La actividad se expresa como unidades de luz/ μ g de proteína.

Las FIG. 36A-D son fotomicrografías que ilustran la expresión de GFP y la morfología tisular en pulmones y tumores de ratones que portan LLC después de la inyección intratumoral de Ad5PPE-1GFP. El tejido se congeló en OCT y se seccionó a 10 μ m por medio de un criostato. Todas las fotos se tomaron con un aumento de 25x. Figura 36A - GFP en vasos sanguíneos angiogénicos de metástasis de pulmón; Figura 36B - inmunotinción con anticuerpo CD31 de la sección fotografiada en la Figura 36A; Figura 36C – expresión de GFP en vasos sanguíneos de tumor primario; Figura 36D – contraste de fases de la sección de C que ilustra los vasos sanguíneos.

La FIG. 37 es un histograma que ilustra la expresión de Luciferasa en pulmón normal y metastásico de ratones en los que se ha inducido carcinoma pulmonar de Lewis, en los que se ha inyectado Ad5CMVLuc, Ad5PPE-1Luc y Ad5PPE-1-3X-Luc. El carcinoma pulmonar de Lewis se indujo por medio de células D 122-96 inyectadas en la almohadilla plantar para el modelo metastásico. La actividad Luciferasa se midió cinco días después de la inyección sistémica de Ad5CMVLuc (n=7; barras de color negro), Ad5PPE-1Luc (n=6; barras de color gris), o Ad5PPE-1-3XLuc (n=13; barras de color marrón). La actividad se expresa como unidades de luz/ μ g de proteína.

La FIG. 38 es un histograma que ilustra la actividad Luciferasa como el porcentaje de actividad hepática (en donde el hígado es 100%), pulmón normal y metástasis en pulmón de ratones en los que se ha inducido carcinoma pulmonar de Lewis a los que se ha inyectado Ad5CMV, Ad5PPE-1Luc y Ad5PPE-1(3X).

La FIG. 40 es un histograma que ilustra la actividad Luciferasa (unidades de luz/ μ g de proteína) en músculos (isquémico y normal) en ratones transgénicos para PPE-1Luciferasa a los dos, cinco, diez y 18 días después de la ligadura femoral y en el control (animales no sometidos a ligadura - día 0; n=8 para cada uno de los grupos).

La FIG. 41 es un histograma que ilustra la actividad Luciferasa (unidades de luz/ μ g de proteína) en el hígado, pulmón y aorta en músculos (isquémico y normal) de ratones transgénicos para PPE-1Luciferasa a los cinco (n=6), diez (n=6) y 18 (n=8) días de la ligadura femoral y en el control (animales no sometidos a ligadura - día 0).

5 La FIG. 42 es un histograma que ilustra la actividad Luciferasa, (unidades de luz/ μ g de proteína) detectada en los hígados, pulmones y tumores primarios de ratones LLC a los que se han inyectado tumores primarios con Ad5CMVLuc (barras de color negro) o Ad5PPE-1Luc (barras vacías).

Descripción de las realizaciones preferidas

10 La presente invención trata de un promotor específico de células endoteliales mejorado que se puede emplear para dirigir de manera fiable la expresión de alto nivel de una secuencia de interés a las células endoteliales y en particular a células endoteliales que participan en la angiogénesis.

Los principios y la utilización de la presente invención se pueden comprender mejor mediante la referencia a los dibujos y las descripciones adjuntos.

15 Antes de explicar al menos una realización de la invención con detalle, se debe entender que la invención no está limitada en su aplicación a los detalles de la construcción y la disposición de los componentes expuestos en la siguiente descripción o ilustrados en los ejemplos y dibujos. La invención es susceptible de otras realizaciones o de poner en práctica o ser llevada a cabo de diferentes maneras. Asimismo, se debe entender que la fraseología y la terminología empleadas en la presente memoria tienen el propósito de describir y no se deben considerar limitantes.

20 Aunque los promotores específicos endoteliales se han descrito previamente (p. ej. Patente de los Estados Unidos 5.747.340) estos promotores han sido típicamente ineficaces al dirigir la expresión a las células endoteliales o se ha demostrado que no son específicos de las células endoteliales in vivo.

También se han descrito elementos intensificadores específicos para las células endoteliales. Bu et al. (J. Biol Chem. (1997) 272(19): 32613-32622) han demostrado que tres copias (3X) de 1X elemento intensificador de PPE-1 (que contiene los elementos ETE-C, ETE-D, y ETE-E) confieren a las secuencias promotoras especificidad para las células endoteliales in vitro, sin embargo semejante actividad no ha sido demostrada in vivo.

25 Como es bien sabido en la técnica, los experimentos in vitro no pueden predecir de manera fiable los resultados in vivo. Como tales, los resultados presentados por Bu et al., aunque sugerentes de especificidad para las células endoteliales, no proporcionan una evidencia suficiente en cuanto a la utilidad de 3X elemento intensificador in vivo.

30 La carencia de estudios in vivo también pone en cuestión la especificidad para las células endoteliales de 3X elemento intensificador en organismos completos. La carencia de estos datos implica que la aplicación terapéutica de este elemento es cuestionable, porque cuando se emplea in vivo, y en particular cuando se emplea para regular la angiogénesis, es imperativo que la expresión del regulador de la angiogénesis (p. ej., toxina celular) esté dirigida específicamente a las células endoteliales, preferiblemente en un subgrupo específico de células endoteliales que está implicado en la angiogénesis.

35 Como se ilustra en la sección de ejemplos de más abajo, los autores de la presente invención, por medio de una experimentación laboriosa, han proporcionado, por primera vez, una evidencia concluyente en cuanto a la actividad in vivo de 3X elemento intensificador. Tal evidencia identifica 3X elemento y sus derivados de secuencia (p. ej., SEQ ID NO: 7) como muy adecuados para su uso en aplicaciones terapéuticas.

40 Además, al reducir la presente invención a la práctica, se descubrió que una configuración novedosa de la secuencia intensificadora PPE-1 de la presente invención confiere a las secuencias promotoras una actividad inesperada y altamente específica en las células endoteliales que participan en la angiogénesis.

De este modo, de acuerdo con un aspecto de la presente invención se proporciona un polinucleótido aislado funcional como promotor específico de células endoteliales en un mamífero tal como un ser humano.

45 El polinucleótido aislado incluye un elemento intensificador que incluye una o más copias de la secuencia mostrada en el SEQ ID NO: 6 y preferiblemente una o más copias de la secuencia mostrada en el SEQ ID NO: 8, que como se ilustra en la sección Ejemplos de más abajo, juega un importante papel en la regulación de la expresión en las células endoteliales que participan en la angiogénesis.

Una configuración de secuencia específica y novedosa de un elemento intensificador utilizable por la presente invención se ilustra en el SEQ ID NO: 7.

50 Para los fines de esta memoria descriptiva y de las reivindicaciones adjuntas, el término "intensificador" hace referencia a cualquier secuencia de polinucleótidos que aumenta la eficacia transcripcional de un promotor.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el polinucleótido aislado incluye copias contiguas de los SEQ ID NO: 6 y/u 8. Tales secuencias se sitúan preferiblemente en una orientación cabeza a cola, aunque, el elemento intensificador de la presente invención también puede incluir una o más copias de una porción específica de la

secuencia del SEQ ID NO: 6 u 8, en una orientación invertida, p. ej., utilizando secuencias complementarias al SEQ ID NO: 6 u 8 en la construcción del elemento intensificador.

5 Preferiblemente, el polinucleótido aislado incluye adicionalmente un elemento de la secuencia promotora específico de células endoteliales. Para los fines de esta memoria descriptiva y de las reivindicaciones adjuntas, el término "promotor" hace referencia a cualquier secuencia de polinucleótidos capaz de mediar la transcripción a ARN de una secuencia de interés aguas abajo. El elemento promotor específico endotelial puede incluir, por ejemplo, al menos una copia del promotor de PPE-1.

Preferiblemente, el polinucleótido aislado incluye adicionalmente un elemento de respuesta a hipoxia, por ejemplo al menos una copia de la secuencia mostrada en el SEQ ID NO: 5.

10 De este modo, de acuerdo con este aspecto de la presente invención, se proporciona un promotor específico de células endoteliales que incluye diferentes configuraciones del elemento intensificador.

Se apreciará que las secuencias del elemento intensificador se pueden situar dentro de la secuencia promotora utilizada, aguas arriba del promotor, entre el promotor y una secuencia de interés aguas abajo o dentro de la secuencia de interés (p. ej., intrón).

15 La secuencia de ácido nucleico aislada de la presente invención se puede utilizar para regular la expresión génica en tejido eucariótico, y en particular, en células endoteliales en proliferación, por ejemplo células endoteliales implicadas en la angiogénesis.

20 Por lo tanto, la secuencia de polinucleótidos aislada de la presente invención se puede proporcionar, en algunos casos, como parte de un constructo de ácido nucleico que incluye además una secuencia de ácido nucleico de interés que se sitúa bajo el control regulador del polinucleótido aislado de la presente invención. Se apreciará que tal constructo de ácido nucleico puede incluir además cualquiera de las secuencias de polinucleótidos adicionales, tales como por ejemplo, secuencias que codifican marcadores de selección, orígenes de replicación en bacterias, o secuencias que codifican polipéptidos informadores. Tal constructo de ácido nucleico está configurado preferiblemente para la expresión de células de mamíferos y puede ser de origen viral. Numerosos ejemplos de
25 constructos de ácido nucleico adecuados para la expresión en mamíferos son conocidos en la técnica; la sección de ejemplos que sigue proporciona detalles adicionales de varios de tales constructos.

30 Para los fines de esta memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, la frase "secuencia de interés" se refiere a cualquier secuencia de polinucleótido que tenga la capacidad de ser transcrita por una ARN polimerasa. Esta definición incluye secuencias codificantes traducibles a polipéptidos, así como secuencias para ARN antisentido, ARN que se une al ADN, ribozimas y otros radicales moleculares que no están destinados a someterse a traducción. Se proporcionan más abajo y en la sección de ejemplos que sigue ejemplos de las secuencias de ácido nucleico de interés que pueden ser utilizadas por el constructo de acuerdo con la presente invención.

35 Los ejemplos presentados a continuación ilustran que los promotores mejorados específicos de células endoteliales de la presente invención pueden dirigir de manera fiable la expresión de un gen informador a un tejido endotelial después de la administración sistémica in vivo. Estos ejemplos demuestran además, por primera vez, que el polinucleótido aislado de la presente invención se puede utilizar para expresar preferentemente una proteína informadora (GFP) en tejido aterosclerótico y/o angiogénico, proporcionando de este modo por primera vez una evidencia directa en cuanto a la importancia del elemento intensificador de PPE-1 y su derivado en aplicaciones terapéuticas.

40 Si bien el uso de una proteína informadora, tal como GFP, puede tener utilidad en la detección de las primeras etapas de crecimiento del tumor metastático, especialmente en modelos animales, o para la formación de imágenes no invasivas de metástasis (Yang, M. y col., Proc. Nat. Acad. of Sci. (2001) 27:2616-2621) tal uso es únicamente una pequeña porción de la utilidad proyectada de la invención reivindicada. Se cree, por ejemplo, que AdPPE-1GFP se puede utilizar combinado con AdPPE1tk, AdPPE-1p55 y/u otros tratamientos anti-angiogénicos, con el fin de
45 seguir y tratar la angiogénesis por medio de un método relativamente no invasivo.

Se pronostica que la sustitución del gen informador GFP por un factor inductor de apoptosis (p. ej., p55; Acceso GenBank M75866) en un constructo, por ejemplo, de AdPPE-1-3X-p55 dirige de manera fiable la apoptosis a células endoteliales que proliferan rápidamente en los vasos sanguíneos angiogénicos de un tumor en crecimiento. Debido a que tal vector puede ser administrado sistémicamente, éste se puede emplear para inducir eficazmente la
50 apoptosis en focos metastáticos en desarrollo, sin descubrir la localización de esos focos. Tal uso representa una mejora significativa en comparación con la práctica de la técnica anterior. Mediante la inducción de la apoptosis específicamente en la vasculatura en desarrollo, es factible eliminar la angiogénesis.

Se puede utilizar un enfoque opuesto para volver a vascularizar los tejidos, por ejemplo en pacientes ateroscleróticos o en pacientes que han sufrido un deterioro significativo de la circulación periférica como resultado de una enfermedad o lesión. En este caso, se puede emplear un constructo del tipo AdPPE-1-3X-GF, donde GF es un factor de crecimiento (p. ej., citoquinas) o modificaciones del mismo (p. ej., AdPPE-1-SEQ ID NO: 7-GF). Los factores de crecimiento adecuados para uso en este contexto incluyen, pero no se limitan a, VEGF (Acceso
55

GenBank M95200) y PDGF-BB de rata (Acceso GenBank; 99% de identidad con mus-AF162784) y EGR-1 (Acceso GenBank M22326), FGF (incluyendo, pero no limitado a, Acceso GenBank XM 003306) y combinaciones de los mismos.

5 Se apreciará que la incorporación de un elemento de respuesta a hipoxia (p. ej., SEQ ID NO: 5) dentro de la secuencia promotora de la presente invención se puede utilizar para mejorar aún más la selectividad de la expresión para los tejidos Isquémicos, lo que conduce a la neo-vascularización de los tejidos seleccionados. A medida que el suministro de sangre mejora, se alivia la Isquemia, el elemento de respuesta a hipoxia deja de ser inducido, los niveles de GF disminuyen y el proceso de neo-vascularización se detiene.

10 Las secuencias promotoras generadas de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención son particularmente útiles en la regulación de la angiogénesis en un tejido. Según se ilustra en la sección de ejemplos que sigue, el 3X modificado (SEQ. ID NO.: 7) que contiene la secuencia promotora de la presente invención y el promotor de PPE-1 no modificado son ambos expresados en focos metastáticos del modelo de LLC. Sin embargo el ejemplo 22 ilustra claramente que la secuencia 3X modificada es específicamente responsable tanto de una disminución de los niveles de expresión del gen informador en pulmón normal como de un drástico incremento en la expresión del gen informador en focos metastáticos. No hay ni un indicio ni una sugerencia en la técnica anterior de que tal resultado se pudiera lograr. De este modo, se puede esperar que el uso de un constructo que incluye el elemento 3X en el contexto de la terapia génica maximice el suministro a los tumores a la vez que se minimizan los efectos tóxicos en el tejido normal circundante. Significativamente, esto se verifica incluso si el tejido circundante contiene un componente endotelial, como se ilustra en la Figura 37. Esto es porque, como se demuestra en el ejemplo 11, la
15 20 secuencia 3X incrementa enormemente el nivel de expresión en tejido endotelial de rápida proliferación, incluso en el contexto del promotor de PPE-1.

Por ejemplo, el gen p55 se podría utilizar junto con un promotor de la presente invención que contiene un elemento de respuesta a hipoxia con el fin de inducir específicamente la apoptosis en tumores en crecimiento. Tal estrategia se considera factible debido a que una masa de tumor en crecimiento tiende a la isquemia ya que el crecimiento del tumor a menudo excede la capacidad angiogénica del tejido circundante. Otras toxinas expresables de células que se pueden utilizar junto con la secuencia promotora de la presente invención con el fin de reducir específicamente una masa tumoral incluyen, pero no se limitan a, otros genes pro-apoptóticos, el gen de la timidina quinasa del herpes simplex (HSV-tk; incluido en el vector de expresión pORF-HSV1tk disponible de InvivoGen, San Diego, CA), angiostatina (Número de acceso Genbank X05199), endostatina (Número de acceso Genbank M33272) y quimera de angiostatina-endostatina (incluida en el vector de expresión pORF-HSV1tk disponible de InvivoGen, San Diego, CA).
25 30

Alternativamente, o adicionalmente, los genes de angiostatina o endostatina se podrían utilizar junto con un promotor de la presente invención con el fin de bloquear específicamente la angiogénesis sin inducir apoptosis.

35 De este modo, de acuerdo con realizaciones preferidas alternativas, la angiogénesis puede ser estimulada o bloqueada. Esta flexibilidad permitirá usos variados de la invención incluyendo, pero no limitados a, la reducción de la masa tumoral y la revascularización de regiones ateroscleróticas del corazón o la neovascularización de tejidos periféricos con un suministro inadecuado de sangre. Un escenario clínico relevante es el uso de un promotor de acuerdo con la presente invención para generar nuevos vasos sanguíneos para incrementar el suministro de sangre en extremidades de pacientes diabéticos.

40 El constructo de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención se pueden administrar a un sujeto (mamíferos, preferiblemente seres humanos) *per se*, o en una composición farmacéutica donde se mezcla con vehículos o excipientes adecuados.

Según se utiliza en la presente memoria una "composición farmacéutica" hace referencia a una preparación de uno o más de los ingredientes activos descritos en la presente memoria con otros componentes químicos tales como vehículos y excipientes fisiológicamente adecuados. El propósito de una composición farmacéutica es facilitar la administración de un compuesto a un organismo.
45

En la presente memoria el término "ingrediente activo" hace referencia al constructo de ácido nucleico responsable del efecto biológico.

50 En lo sucesivo, las expresiones "vehículo fisiológicamente aceptable" y "vehículo farmacéuticamente aceptable" que se pueden utilizar indistintamente hacen referencia a un vehículo o un diluyente que no ocasiona una irritación significativa a un organismo y no anula la actividad biológica y las propiedades del compuesto administrado. En estas expresiones se incluye un coadyuvante.

En la presente memoria el término "excipiente" hace referencia a una sustancia inerte añadida a una composición farmacéutica para facilitar adicionalmente la administración de un ingrediente activo. Los ejemplos, sin limitación, de los excipientes incluyen carbonato de calcio, fosfato de calcio, diversos azúcares y tipos de almidón, derivados de celulosa, gelatina, aceites vegetales y polietilenglicoles.
55

Las técnicas para la formulación y administración de fármacos se pueden encontrar en "Remington Pharmaceutical Sciences", Mack Publishing Co., Easton, PA, Última edición.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden elaborar mediante procedimientos bien conocidos en la técnica, p. ej., por medio de procedimientos convencionales de mezcla, disolución, granulación, fabricación de grageas, levigación, emulsión, encapsulación, atrapamiento o liofilización.

Las composiciones farmacéuticas para uso de acuerdo con la presente invención se pueden formular de ese modo de manera convencional usando uno o más vehículos fisiológicamente aceptables que comprenden excipientes y agentes auxiliares, que facilitan el procesamiento de los ingredientes activos en preparaciones que se pueden utilizar farmacéuticamente. La formulación apropiada depende de la ruta de administración elegida.

Para los inyectables, los ingredientes activos de la composición farmacéutica se pueden formular en disoluciones acuosas, preferiblemente en tampones fisiológicamente compatibles tales como la disolución de Hank, la disolución de Ringer, o tampón salino fisiológico. Para la administración transmucosal, se utilizan en la formulación penetrantes apropiados para la barrera que se va a atravesar. Tales penetrantes son generalmente conocidos en la técnica.

Se apreciará que el polinucleótido aislado de la presente invención ha sido aislado basándose en su capacidad para promover o mejorar la transcripción en células eucarióticas de un linaje endotelial. Por lo tanto una célula de mamífero transformada con un polinucleótido aislado reivindicado es una realización adicional de la invención. Se proporcionan numerosos ejemplos de tales células transformadas en los ejemplos citados en la presente memoria a continuación.

Si bien los ejemplos que se proporcionan más abajo abordan específicamente el uso de la secuencia 3X junto con el promotor de PPE-1, se prevé que la secuencia intensificadora de la presente invención también ejercerá su efecto específico de la célula cuando se utiliza con otras secuencias promotoras eucariotas.

Tal previsión se basa en los hallazgos de la técnica anterior, que muestran que los elementos intensificadores son a menudo portátiles, es decir, pueden ser transferidos de una secuencia promotora a otra, a otra secuencia promotora no relacionada y todavía mantienen la actividad. Por ejemplo, véanse D. Jones et al. (Dev. Biol. (1995) 171 (1) 60-72); N.S. Yew et al, (Mol. Ther. (2001) 4:75-820) y L. Wu. et al. (Gene Ther. (2001) 8; 1416-1426). En efecto, el trabajo anterior de Bu et al. (J. Biol. Chem. (1997) 272 (19): 32613-32622) sugiere fuertemente que los elementos intensificadores relacionados con los de la presente invención, por ejemplo, intensificadores que incluyen el SEC ID NO: 6 pueden ser utilizados con promotores constitutivos, por ejemplo el promotor de SV-40. Como tales, constructos que contienen, los métodos que emplean, y los polinucleótidos aislados que incluyen un promotor eucariótico modificado para incluir la secuencia intensificadora de la presente invención están dentro del alcance de la invención reivindicada.

De este modo, se postula que una configuración mínima de un elemento intensificador de acuerdo con la presente invención es un polinucleótido aislado como se establece en el SEC ID NO: 8. Se prevé que este intensificador funcione con una amplia variedad de promotores, incluyendo pero sin limitarse a promotores endoteliales específicos (p. ej., PPE-1, SEC ID NO: 1) y promotores constitutivos, por ejemplo promotores virales tales como aquellos derivados de CMV y SV-40. Este intensificador debe ser capaz de conferir especificidad endotelial a una gran variedad de promotores. El elemento intensificador se puede aumentar, por ejemplo mediante la adición de una o más copias de la secuencia expuesta en el SEQ ID NO: 6. Estas secuencias adicionales se pueden añadir forma contigua o no contigua a la secuencia del SEQ ID NO: 8.

La presente invención incluye adicionalmente un método para expresar una secuencia de ácido nucleico de interés en células endoteliales empleando un constructo que se basa en un elemento intensificador que incluye al menos una copia de la secuencia expuesta en el SEQ ID NO: 8 y un promotor para dirigir un alto nivel expresión de la secuencia de interés específicamente a células endoteliales.

Según se utiliza en la presente memoria, "administración ex vivo a células extraídas de un organismo de un sujeto y la posterior reintroducción de las células en el organismo del sujeto" incluye específicamente el uso de células pluripotenciales como se describe en (Lyden et al. (2001) Nature Medicine 7:1194-1201).

Aunque se emplean adenovirus en los experimentos descritos en los ejemplos presentados más adelante, los constructos de la presente invención podrían ser fácilmente adaptados por los expertos en la técnica a otros sistemas de liberación viral.

Los objetos adicionales, las ventajas y las características novedosas de la presente invención resultarán evidentes para un experto normal en la técnica tras el examen de los siguientes ejemplos, que no se pretende que sean limitantes. Adicionalmente, cada una de las diversas realizaciones y aspectos de la presente invención esbozadas anteriormente y reivindicadas en la sección de reivindicaciones más abajo encuentra apoyo experimental en los siguientes ejemplos.

Ejemplos

A continuación se hace referencia a los siguientes ejemplos, que junto con las descripciones anteriores, ilustran la invención de una manera no limitante.

- En general, la nomenclatura utilizada en la presente memoria y los procedimientos de laboratorio utilizados en la presente invención incluyen, técnicas moleculares bioquímicas, microbiológicas y de ADN recombinante. Tales técnicas se explican completamente en la bibliografía. Véanse, por ejemplo, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" Sambrook et al., (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volúmenes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, New York (1988); Watson et al., "Recombinant DNA", Scientific American Books, New York; Birren et al. (eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998); metodologías mostradas las Patentes de los Estados Unidos Núms. 4.666.828; 4.683.202; 4.801.531; 5.192.659 y 5.272.057; "Cell Biology: A Laboratory Handbook", Volúmenes I-III Cellis, J. E., ed. (1994); "Current Protocols in Immunology" Volúmenes I-III Coligan J. E., ed. (1994); Stites et al. (eds), "Basic and Clinical Immunology" (8ª Edition), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell and Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman and Co., New York (1980); los inmunoanálisis disponibles se describen extensamente en la bibliografía de patentes y científica, véanse, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos Núms. 3.791.932; 3.839.153; 3.850.752; 3.850.578; 3.853.987; 3.867.517; 3.879.262; 3.901.654; 3.935.074; 3.984.533; 3.996.345; 4.034.074; 4.098.876; 4.879.219; 5.011.771 y 5.281.521; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D., and Higgins S. J., eds. (1985); "Transcription and Translation" Hames, B. D., and Higgins S. J., eds. (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R. I., ed. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) y "Methods in Enzymology" Vol. 1-317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak et al., "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996).
- Otras referencias generales se proporcionan a lo largo de todo este documento. Se cree que sus procedimientos son bien conocidos en la técnica y se proporcionan para la conveniencia del lector.

Específicamente, los experimentos que se llevaron a cabo junto con los ejemplos citados a continuación emplearon los siguientes métodos y materiales:

Materiales y métodos

30 Cultivo de células

- El Carcinoma Pulmonar de Lewis - (D122-96) (amablemente proporcionado por el profesor L. Eisenbach, The Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel), el Riñón Embrionario Humano (293) y las células HeLa se cultivaron en 4,5 gr/l de DMEM, con un suplemento de suero de ternera fetal al 10% (FCS), 50 U/ml de penicilina, 50 µg/ml de estreptomina y glutamina 2 mM (Biological Industries, Beit Haemek, Israel). Las Células Endoteliales Aórticas Bovinas - BAEC (amablemente proporcionadas por el Prof. N. Savion, Goldshlager Institute, Sheba Medical Center, Tel-Hashomer, Israel), los fibroblastos de piel normal - NSF, HepG2 y las células endoteliales umbilicales humanas - HUVEC-304 (ATCC, USA) se cultivaron en 1,0 gr/l de DMEM (Biological Industries, Beit-Haemek, Israel), con un suplemento de FCS al 5%, 50 U/ml de penicilina, 50 mg/ml de estreptomina y glutamina 2 mM. Las células BAEC se complementaron con el factor de crecimiento de fibroblastos completo (Sigma, St. Louis. MO.). Se cultivaron RINr1046-38 (RIN-38) en medio de sales de Earle 199 (glucosa 5,5 M) con un suplemento de FCS al 5% (Biological Industries, Beit-Haemek, Israel), 50U de penicilina/ml, 50 µg de estreptomina y glutamina 2 mM .

"HepG2" según se utiliza en la presente memoria hace referencia a ATCC-HB-8065.

"HeLa" según se utiliza en la presente memoria hace referencia a ATCC-CCL-2.

- "Células Epiteliales Bronquiales Humanas" y "B2B", según se utiliza en la presente memoria , hace referencia a ATCC-CRL-9609.

"HUVEC" y "Células Endoteliales de Vena Umbilical Humana" según se utiliza en la presente memoria hace referencia a ATCC-CRL-1730.

"CHO" y "Ovario de Hámster Chino" según se utiliza en la presente memoria hace referencia a ATCC-61.

Inducción de hipoxia

- Veintiséis horas después de la transfección o transducción las células se incubaron en una cámara aislada que se había lavado durante 30 minutos por medio de un flujo de gas que contenía O₂ al 0,5%, CO₂ al 5% en equilibrio de N₂. La cámara aislada se colocó en una incubadora humidificado con CO₂ al 5% a 37°C.

Actividad luciferasa en células y tejidos

Para analizar la actividad del promotor de PPE-1 cuantitativamente *in vitro* e *in vivo*, se empleó un kit para el sistema de expresión de gen de luciferasa (Promega Corp., Madison, WI). Cuarenta y ocho horas después de la transfección o la transducción las células se lavaron y se añadieron 200 µl de tampón de lisis durante 15 minutos. Los productos

5 lisados celulares se recogieron y se centrifugaron durante 15 minutos (14.000 rpm) a 4°C. Con posterioridad, se añadieron 10 µl del sobrenadante a 50 µl de tampón de análisis de luciferasa. Se midió la actividad en un Luminómetro a lo largo de un período de 20 segundos.

Para analizar la actividad luciferasa en tejido sólido se extirpó una muestra de 20 mg y se homogeneizó en 1 ml de la disolución de homogenización y se centrifugó durante 15 minutos (14.000 rpm) a 4°C, y se analizaron 10 ml del sobrenadante para determinar la actividad de la luciferasa, como se ha descrito anteriormente. Los resultados se expresaron como unidades de luz de Luciferasa por 1 µg de proteína. La proteína se midió utilizando el análisis de Bradford con albúmina de suero bovino (BSA) como patrón.

10

Actividad de GFP *in vitro* e *in vivo*

Para someter a ensayo la expresión de GFP *in vitro*, las células se lavaron dos veces con PBS y se fijaron durante 30 minutos con paraformaldehído al 4% en PBS recién elaborado. Después de la fijación, se llevó a cabo el examen por microscopía fluorescente.

15

Con el fin de someter a ensayo la distribución celular del gen suministrado *in vivo*, los tejidos se fijaron en paraformaldehído al 4% en tampón de fosfato 0,1 M recién elaborado durante 6 horas a 4°C, se empaparon durante la noche en sacarosa al 30% a 4°C y se congelaron en compuesto OCT (Sakura, USA). Los bloques de tejido se

20 cortaron por medio de un criostato a un grosor de 10 µm y se observaron directamente bajo microscopía de fluorescencia (filtro FITC).

Células en proliferación y quiescentes

Con el fin de comparar la actividad del promotor de PPE-1 en BAEC en proliferación y quiescentes, las células se dividieron en dos grupos: 1. células en proliferación - crecen e infectan en medio FCS al 10%. 2. células quiescentes - crecen e infectan en medio libre de suero comenzado 72 horas antes de la transducción.

25

Todas las células se cultivaron en una incubadora humidificada, CO₂ al 5%, 37°C.

Preparación de adenovirus recombinantes carentes de replicación.

Se construyeron varios adenovirus recombinantes carentes de replicación (tipo 5). Se ligó una casete de expresión que incluía el promotor de la preproendotelina-1 (PPE-1) murino (SEC ID NO: 1) situado aguas arriba del gen de luciferasa (originado a partir de pGL2-basic número de acceso GenBank X65323) y el sitio políA de SV40 (originado a partir de pGL2-basic número de acceso GenBank X65323) en el sitio de restricción BamHI de pPAC.plpA (constructo sin promotor). El gen GFP (originado a partir de pEGFP, número de acceso GenBank AAB02572) se ligó al promotor de PPE-1 en el sitio de restricción NotI. Se prepararon los adenovirus recombinantes carentes de replicación denominados Ad5PPE-1Luc o Ad5PPE-1GFP mediante co-transfección de pPACPPE-1Luc o Ad5PPE-1GFP con el plásmido de adenovirus pJM17 como describen Becker, T.C. et al. (Methods Cell. Biol. 43, Roth M. (ed.). Nueva York. Academic Press, 1994, págs. 161-189) seguido de la recolección de los viriones recombinantes.

30

Los virus se prepararon para la producción a gran escala. Las provisiones de partida de virus se almacenaron a 4°C a una concentración de 10⁹-10¹² unidades formadoras de placa/ml (PFU/ml). Los virus Ad5CMV-Luc (amablemente proporcionados por R. Gerard de UTSW Dallas, Texas) y Ad5CMV-GFP (Quantum Biotechnologies, Carlsbad, Canadá) que contenían el promotor temprano inmediato de citomegalovirus (CMV), (número de acceso GenBank U47119) se prepararon para la preparación a gran escala como se ha descrito para los vectores virales de PPE-1 y se utilizaron como control específico sin tejido.

40

Modificaciones del promotor de PPE

El promotor de PPE-1 murino modificado se desarrolló mediante la inserción de tres copias del elemento de transcripción positivo descubierto por Bu et al (J. Biol. Chem. (1997) 272 (19): 32613-32622) En el sitio de la enzima de restricción NheI localizado aguas abajo (-286 pb) con respecto al elemento positivo endógeno de 43 pares de bases (-364 a -320 pb).

45

El fragmento intensificador denominado en la presente memoria "3X" es una copia por triplicado de un elemento de secuencia endógeno (coordenadas de nucleótidos 407-452 de el SEQ ID NO: 1) presente en el promotor de PPE-1 murino. Se ha demostrado previamente que la inducción de la actividad del promotor de PPE-1 en las células endoteliales vasculares depende de la presencia de este elemento Bu et al (J. Biol. Chem. (1997) 272 (19): 32613-32622). El fragmento 3X se sintetizó mediante el uso de dos hebras de ADN de hebra sencilla complementarias de 96 pares de base de longitud (BioTechnology Industries; Nes Tziona, Israel), (SEQ ID NO: 2 y 3). Los dos

50

fragmentos de ADN de hebra sencilla se recocieron y se rellenaron utilizando el fragmento Klenow (NEB); el ADN de doble hebra resultante tenía 145 pares de bases de longitud e incluía sitios de restricción NHE-1 (SEC ID NO: 4).

El fragmento 3X se ligó en el murino promotor de PPE-1 aguas abajo del sitio de NHE-1 endógeno usando la Ligasa de T4. El constructo resultante se propagó en células DH5α competentes y se produjo una preparación de plásmido a gran escala usando el kit Qiagene maxi-prep.

Plásmidos adicionales

Promotor de PPE-1 de tipo salvaje

La casete de PPE-1-luciferasa (5249 pb) que contenía 1,4 kb del promotor de preproendotelina-1 murino (PPE-1), el gen de la luciferasa con un sitio para la señal poliA de SV40 (número de acceso Genbank X 65323) y el primer intrón del gen de ET-1 murino se origina a partir del plásmido pEL8 (8848 pb) utilizado por Harats et al., (J. Clin. Inv. (1995) 95: 1335-1344). La casete de PPE-1-luciferasa se extrajo del plásmido pEL8 mediante el uso de la enzima de restricción BamHI, seguido de la extracción del fragmento de ADN de un gel de agarosa al 1% usando un kit de extracción (Qiagen, Hilden, Alemania).

Plásmido pPAC.plpA sin promotor

El plásmido pPAC.plpA sin promotor (7594 pb) que contenía las secuencias del adenovirus tipo 5 se originó a partir de pPACCMV.plpA (8800 pb). El promotor de CMV, el sitio de clonación múltiple y el sitio de poliadenilación de SV40 (1206 pb) se eliminaron por medio de la enzima de restricción NotI. El ADN fragmentado se extrajo a partir del gel de agarosa al 1%. El plásmido lineal (7594 pb) se rellenó mediante el fragmento Klenow y el conector BamHI se ligó mediante el kit de ligación de ADN rápido a ambos extremos cohesivos. El plásmido lineal se volvió a ligar mediante ADN ligasa de T4 y se transformó en células DH5α competentes, con el fin de amplificar pPAC.plpA con los sitios de restricción BamHI. El plásmido se preparó para la preparación a gran escala y se purificó mediante el kit de purificación de ADN Maxi prep.

Plásmido pPACPPE-1Luciferasa

El plásmido pPACPPE-1Luciferasa se construyó insertando la casete de PPE-1-luciferasa en el sitio de restricción BamHI del plásmido pPAC.plpA, mediante el uso de ADN ligasa de T4. El plásmido se utilizó posteriormente para transformar células DH5α competentes. El plásmido (12843 pb) se preparó para la preparación a gran escala y se purificó mediante el kit de purificación de ADN Maxi prep.

Plásmido pPACPPE-1GFP

El plásmido pPACPPE-1GFP se construyó mediante subclonación del gen GFP (originado a partir de pEGFP, número de acceso GenBank AAB02572) aguas abajo del promotor de PPE-1 en el sitio de restricción NotI, por medio de la ADN ligasa de T4.

El plásmido se utilizó con posterioridad para transformar células DH5α competentes. El plásmido (11.801 pb) se preparó para la preparación a gran escala y se purificó mediante el kit de purificación de ADN Maxi prep.

plásmidos pACPPE-13X luciferasa y pACPPE-13X GFP

El pPACPPE-1-3XLuciferasa y pPACPPE-1-3XGFP se construyeron mediante la inserción de la casete PPE-1-3XLuc o PPE-1-3XGFP digerida por la enzima de restricción BamHI a partir de pEL8-3X (Figura 26B) que contenía Luc o GFP en el sitio de restricción BamHI del plásmido pPAC.plpA. pEL8-3X contiene el promotor de PPE-1 murino modificado (1,55 kb) (rojo) - localizado entre BamHI y NotI que contiene el intensificador específico endotelial por triplicado 3X (como se establece en SEC ID NO: 7) situado entre dos sitios NheI. El promotor, el gen de la luciferasa o GFP, los sitios poli A de SV40 y el primer intrón del gen de endotelina-1, todos denominados casete promotor modificado de PPE-1 se digirieron y se extrajeron por medio de la enzima de restricción BamHI como se describe en materiales y métodos. Se prepararon los plásmidos (12843 pb) para la preparación a gran escala y se purificaron mediante el kit de purificación de ADN Maxi prep.

Experimento in vitro, transducción de ADN

Las células se cultivaron en placa en fuentes de 16 mm 24 horas antes de la transducción. La transducción del ADN de células BAEC (Células Endoteliales Aórticas Bovinas), HUVEC (Células Endoteliales de Vena Umbilical Humana), LLC (Carcinoma Pulmonar de Lewis) y RIN (Insulinoma de Rata), HepG2, HeLa y Fibroblastos de piel normal (NSF) se realizó mediante la incubación de cada línea celular con multiplicidad de infección (moi) de 1, 5 y 10 de Ad5PPE-1Luc durante 4 h en un volumen total de 500 µl de medio de crecimiento, seguido de incubación con el medio de crecimiento en un volumen total de 2 ml durante 48 horas. Se utilizó Ad5CMVLuc como control específico sin tejido.

Animales

Todos los procedimientos con animales fueron aprobados por el "Animal Care and Use Committee", del Centro Médico Sheba, Tel-Hashomer.

Se utilizaron diferentes cepas de ratón:

- 5 (I) Ratones C57BL/6 de tipo salvaje, 3 meses de edad, macho (Harlan Farms, Jerusalén, Israel).
- (II) Ratones Balb/C, 3 meses de edad, macho (Harlan Farms, Jerusalén, Israel).
- (iii) Híbridos de ratones carentes del gen ApoE de 6 meses de edad, macho y hembra de ratones C57BL/6xSJ129 (Plump AS. et al. Cell (1991) 71:343-353).
- 10 (iv) 3 meses de edad, macho y hembra de que expresan en exceso el gen de la luciferasa bajo el control del promotor de PPE-1 murino (5,9 kb), generados por Harats et al. (J. Clin. Inv. (1995) 95: 1335-1344).

Todos los ratones se hicieron crecer en el Lipids and Atherosclerosis Research Institute.

Expresión de genes de tejidos en ratones normales

- 15 Para analizar la eficacia y la especificidad del tejido, se suspendieron 10^{10} pfu/ml de Ad5PPE1Luc o Ad5CMVLuc (como control específico sin tejido), en 100 μ l de solución salina fisiológica y se inyectaron en la vena de la cola de los ratones descritos anteriormente. La actividad luciferasa se analizó 1, 5, 14, 30 y 90 días después de la inyección. Para localizar la distribución celular de los genes informadores expresados, se inyectaron Ad5PPE-1GFP o Ad5CMVGFP (10^{10} pfu/ml en 100 μ l de solución salina fisiológica) en la vena de la cola de ratones C57BL/6 macho de 3 meses de edad, normales. La expresión de GFP se detectó cinco días después de la inyección. Todos los ratones parecían sanos y no se observó toxicidad o inflamación en el hígado u otro tejido.

20 Actividad de GFP en los tejidos

- 25 Para someter a ensayo la distribución celular del gen liberado in vivo, las muestras de tejido de los ratones inyectados se fijaron en paraformaldehído al 4% en tampón de fosfato 0,1 M recién elaborado durante 6 horas a 4°C, se empaparon durante la noche en sacarosa al 30% a 4°C y se congelaron en el compuesto OCT (Sakura, California, USA). Los bloques de tejido se cortaron a un grosor de 10 μ m y se observaron directamente bajo microscopía de fluorescencia (filtro FITC).

Implantación del tumor

- 30 Las células de carcinoma de pulmón de Lewis (LLC) se cosecharon con tripsina/EDTA, se lavaron 3 veces con PBS y se contaron con azul de tripano al 0,1% (Biological Industries, Beit-Haemek, Israel) para evaluar su viabilidad. Con el fin de someter a ensayo el nivel de actividad de la actividad del promotor de PPE-1 en la angiogénesis tumoral en ratones, se utilizaron dos modelos de tumores diferentes.

En el modelo de tumor primario, las células (1×10^6 células/ml en 100 μ l de solución salina fisiológica) se inyectaron subcutáneamente en los dorsos de los ratones ($n = 17$). Veintiún días después de la inyección se inyectaron Ad5PPE-1, Ad5PPE-1GFP, Ad5CMV o Ad5CMVGFP (10^{10} pfu/ml) en el tejido tumoral (IT) o por vía intravenosa y se detectó su actividad como se ha descrito anteriormente.

- 35 En el modelo de tumor metastásico, las células (5×10^5 células/ml en 50 μ l de solución salina fisiológica) se inyectaron a los ratones de la almohadilla plantar ($n = 12$). Cuando el tejido tumoral alcanzó un tamaño de 0,7 mm de diámetro, la almohadilla plantar (con el tumor primario) se resecó en condiciones anestésicas y estériles. Catorce días después de la cirugía, los virus (Ad5PPE-1, Ad5PPE-1GFP, Ad5CMVLuc o Ad5CMVGFP) se inyectaron en la vena de la cola del ratón.

- 40 En ambos modelos experimentales de tumor los ratones se sacrificaron 5 días después de la inyección viral, sus tejidos se cortaron y se realizarán las pruebas de actividades de luciferasa y GFP.

Modelo de cicatrización de heridas

- 45 Se anestesiaron ratones C57BL/6 de 3 meses de edad, macho mediante inyección subcutánea de pentobarbital sódico (6 mg/kg). Sus dorsos se afeitaron y se realizaron incisiones rectas de 5 cm. Las incisiones se suturan inmediatamente por medio de hilos de seda estéril 4/0. El proceso angiogénico en la cicatrización de la herida se examinó cada dos horas mediante tinción inmunohistoquímica con H y E y anticuerpo anti-von Willebrand.

Diez días después de las incisiones se inyectaron sistémicamente 10^{10} pfu/ml de Ad5PPE-1Luc o Ad5CMVLuc en la vena de la cola. Cinco días después de las inyecciones se sacrificaron los ratones y se analizó la actividad luciferasa como se ha descrito anteriormente en la piel del sitio de la incisión y en el sitio contralateral normal como control.

Examen histológico

Con el fin de evaluar el grado de la angiogénesis en el tejido tumoral y metastatizado, los tejidos se cortaron en secciones de 5 µm y se tiñeron con hematoxilina y eosina (H y E). Se utilizaron anticuerpos anti-CD31 (Ab monoclonal anti-CD31 de ratón de rata, Pharminogen, NJ, USA) para los análisis de neovascularización en los modelos tumorales.

Análisis estadístico

El análisis entre grupos para determinar las diferencias estadísticamente significativas se llevó a cabo utilizando la prueba t de ANOVA, o la prueba de Rango de Mann-Whitney. Los datos se muestran como media $\pm$ ET.

Ejemplo 1

Análisis de la actividad del plásmido 3X-PPE-1 in vitro

Con el fin de analizar la actividad de PPE-1-3X, se llevó a cabo una comparación de la expresión del gen informador en el plásmido del promotor de PPE-1-3X y el plásmido del promotor PPE-1 no modificado. Los plásmidos con genes informadores que contienen o bien el fragmento PPE-1-3X o bien el fragmento PPE-1 no modificado y el gen informador de luciferasa se transfectaron en las líneas celulares endoteliales y no endoteliales así como en una línea celular de epitelio bronquial (B2B) que expresa el promotor de PPE-1 (véase materiales y métodos más arriba). La línea de células B2B se seleccionó para proporcionar una indicación de la capacidad del elemento 3X para reducir la expresión en líneas de células no endoteliales con respecto al promotor de PPE-1. La transfección se logró usando lipofectamina (Promega Corp., Madison, WI). Se empleó un plásmido β gal-neo como un indicador de la eficacia de transfección en cada caso de acuerdo con la práctica aceptada en biología molecular.

Cuarenta y ocho horas después de la transfección, las células se recogieron utilizando tampón de lisis (Promega Corp., Madison, WI) y se analizó la actividad luciferasa por medio de un luminómetro (TD-20e - Turner Designs, Sunnyvale, California). En paralelo, se analizó la actividad betagal con el fin de normalizar las diferentes eficacias de transformación. Los resultados se resumen en la Figura 1 y en la Tabla 1. La actividad de luciferasa bajo el control de PPE-3X es 15-20 veces superior a la actividad de la luciferasa bajo el control del PPE-1 no modificado. En las líneas celulares no endoteliales se detectó una expresión mínima utilizando tanto PPE-1 como PPE-1-3X. Esto demuestra que PPE-3X es un candidato prometedor para la liberación de un gen específicamente en las células endoteliales *in vivo*.

Tabla 1 - Actividad luciferasa en células transfectadas con constructos con luciferasa PPE-1 y PPE-1-3X

Plásmido	Actividad de luciferasa en: líneas celulares endoteliales		líneas celulares no endoteliales
	HUVAC	BAEC	RIN
PPE-1	135,12	1121,3	0,73
PPE-1-3X	768	18331,7	0,32

Ejemplo 2

Actividad y especificidad de Ad5PPE-1/Luciferasa in vitro

También se ligaron PPE-1/Luciferasa, PPE-1-3X/Luciferasa, PPE-1/GFP y PPE-1-3X/GFP en el plásmido Ad5 para producir Ad5PPE-1/Luc y Ad5PPE-1-3X/luc, Ad5PPE-1/GFP y Ad5PPE-1-3X/GFP (Varda-Bloom et al., (2001) Gene Therapy 8:819-827). Estos constructos se analizaron por separado, como se detalla a continuación.

Con el fin de someter a ensayo la actividad de Ad5PPE-1/luc, se llevaron a cabo las transfecciones de B2B (Células Epiteliales Bronquiales Humanas), BAEC (Células Endoteliales Aórticas Bovinas) y HUVEC (Células Endoteliales de Vena Umbilical Humana). Estas tres líneas celulares expresan el gen de endotelina y se seleccionaron para indicar los niveles de expresión del constructo sometido a ensayo en una célula endotelial. La línea celular RIN (Insulinoma de Rata), que no expresa endotelina, se empleó como control negativo y se transfectó con el mismo constructo. Se utilizó Ad5CMV/Luc (Luciferasa bajo el control del promotor de CMV) como control específico no endotelial en todas las líneas celulares.

La Figura 2 ilustra claramente que se logró una expresión de luciferasa superior en las líneas celulares BAEC y HUVEC endoteliales con el promotor de PPE-1 que con el promotor de CMV. En las células RIN, que no son de origen endotelial, el promotor de CMV produjo más actividad Luciferasa que el promotor de PPE-1. Estos resultados demuestran la especificidad endotelial del promotor de PPE-1 no modificado.

Ejemplo 3

Actividad y especificidad de Ad5PPE-3XLuc y Ad5PPE-3XGFP

Se utilizaron los constructos Ad5PPE-3X/Luciferasa y Ad5PPE-3X/GFP para transfectar las líneas celulares descritas anteriormente en el Ejemplo 2 con el fin de determinar el impacto del elemento 3X sobre la especificidad y los niveles de expresión. Como en el ejemplo 2, se utilizó Ad5CMVLuc, como control específico no endotelial. Se detectó una expresión de luciferasa superior en líneas celulares BAEC y HUVEC bajo el control del promotor de PPE-3X en comparación con el promotor de CMV.

La Figura 3a es una fotomicrografía que ilustra la expresión de GFP bajo el control de Ad5PPE-1-3X en la línea celular BAEC. La Figura 3b es una fotomicrografía que ilustra la expresión de GFP de Ad5CMV en la línea BAEC. Como se muestra claramente mediante estas Figuras, el promotor de PPE-1-3X es más activo en células endoteliales. Estos resultados indican claramente que el elemento 3X no resta valor a la especificidad endotelial del promotor de PPE-1. Las actividades relativas de los promotores de PPE-1 y PPE-1-3X en cultivo celular se presentan en el ejemplo 6 de más abajo.

Ejemplo 4

Análisis in vitro de la actividad pro-apoptótica del gen p55

Después de la subclonación de P55 (TNFR1, número de acceso GenBank M75866) en PACPPE3X (que contiene el promotor de PPE-1-3X), y en PACCMV, se realizó la co-transfección de estos plásmidos y GFP (vector pEGFP-C1; Clontech, Palo Alto, CA) como se ha descrito anteriormente. En pocas palabras, el gen se subclonó aguas abajo del promotor de PPE-1 (en lugar del gen de luciferasa) en el sitio de restricción NotI, por medio de la ADN ligasa de T4, seguido de su transformación en células DH5 α competentes. Veinticuatro horas después de la transfección, las células apoptóticas pequeñas y redondeadas eran discernibles visualmente de las células normales. La microscopía electrónica de células transfectadas con los plásmidos pro-apoptóticos mostró la apariencia típica de la apoptosis, confirmando la evaluación visual.

Bajo el control del promotor de PPE-1-3X, se indujo la apoptosis por medio de p55 únicamente en células endoteliales (Figura 4), mientras que el promotor CMV no mostró ninguna actividad específica de las células. La luciferasa bajo el control de PPE-1-3X no indujo apoptosis en ninguna de las líneas celulares sometidas a ensayo. Estos resultados indican que mediante el empleo del promotor de PPE-1-3X, es factible inducir la apoptosis específicamente en células endoteliales.

Ejemplo 5

El elemento de respuesta a hipoxia (HRE) puede aumentar la expresión del gen diana en las células endoteliales sensibles hipóxicas

La hipoxia es un regulador importante del tono y la estructura de los vasos sanguíneos. También se ha demostrado que es un potente estímulo de la angiogénesis (tanto en enfermedades cardíacas isquémicas como en el cáncer (Semenza, G.L. et al. (2000) Adv Exp Med Biol.; 475:123-30; Williams, K.J. (2001) Breast Cancer Res. 2001: 3; 328-31 y Shimo, T. (2001) Cancer Lett. 174, 57-64). Adicionalmente, se ha informado de que la hipoxia regula la expresión de muchos genes incluyendo eritropoyetina, VEGF, enzimas glicolíticas y ET-1. Estos genes están controlados por una ruta de sensibilización al oxígeno común, un complejo de transcripción inducible llamado factor inducible por hipoxia-1 (HIF-1). El complejo HIF-1 media las respuestas transcripcionales a la hipoxia mediante la unión del elemento respuesta a hipoxia que actúa en cis (HRE) de los genes diana. El HRE es una secuencia conservada localizada en los promotores de unos pocos genes que responden a la hipoxia incluyendo: VEGF, Óxido Nítrico Sintasa-2, eritropoyetina y otros, incluyendo endotelina-1, ET-1. El promotor de ET-1 contiene un elemento de respuesta a hipoxia invertido en la posición -118 pb aguas arriba del sitio de inicio de la transcripción, el elemento contiene 7 pares de bases y está localizado entre los sitios GATA-2 y AP1 5' GCACGTT 3' - 50 pares de bases (SEQ ID NO: 5).

El promotor de la preproendotelina-1 (PPE-1) contiene un elemento de respuesta a hipoxia (HRE) que tiene el potencial de incrementar su expresión en el microentorno hipóxicos de tejidos tumorales o isquémicos, haciéndolo de este modo "específico de tejido tumoral" y/o "específico de tejido isquémico". Con el fin de evaluar la función real de este HRE, se llevaron a cabo análisis del promotor de PPE-1 y el promotor de PPE-1-3X junto con un gen informador de luciferasa o GFP y liberado por un vector adenoviral.

La actividad de luciferasa bajo el control del promotor de PPE-1 o el promotor de PPE-1-3X se comparó en células BAEC bajo condiciones normóxicas e hipóxicas (0,5% de O₂ durante 16 h). La actividad luciferasa bajo el control del promotor de PPE-1 fue 5 veces mayor cuando se expuso a hipoxia (Figuras 5 y 6). Adicionalmente, la actividad luciferasa bajo el control del promotor de PPE-1-3X fue 2,5 veces mayor bajo condiciones hipóxicas. En resumen, la introducción del elemento 3X dentro del promotor de PPE-1 todavía es capaz de aumentar los niveles de expresión de un gen aguas abajo en respuesta a la hipoxia, incluso aunque los niveles normóxicos de expresión con el gen PPE-1-3X sean más altos que los observados con el promotor de PPE-1 no modificado.

Ejemplo 6

Evaluación adicional de la actividad del promotor de PPE-1-3X y PPE-1 en líneas celulares endoteliales

La Figura 7 resume los resultados de los experimentos de transfección de B2B, HUVEC y BAEC utilizando pPPE-1/Luciferasa y pPPE-1-3X/Luciferasa. Se observó una expresión de luciferasa superior (30, 8,5 y 1,5 veces más) bajo el control del promotor de PPE-1-3X que bajo el promotor de PPE-1 en B2B, HUVEC y BAEC, respectivamente. Estos resultados confirman los presentados anteriormente y sirven para establecer que PPE-1-3X se adapta bien para dirigir la expresión de alto nivel específicamente a las células endoteliales. En el contexto de la futura liberación in vivo, los niveles más altos de expresión alcanzados con el constructo PPE-1-3X se traducen en una administración de cantidades más pequeñas de ADN. Esto, a su vez, servirá para incrementar aún más la especificidad.

Ejemplo 7

Eficacia, especificidad y estabilidad de Ad5PPE-1Luc in vivo

Con el fin de confirmar que la especificidad endotelial de la expresión observada en los ejemplos 2 a 6 no era un artefacto del cultivo celular, el constructo de Ad5PPE-1/Luciferasa se inyectó en ratones C57BL/6 como se ha descrito anteriormente en "Expresión de genes en tejidos de ratones normales". Al igual que en los estudios in vitro, se empleó Ad5CMV/Luciferasa como control negativo.

Después de la inyección de los vectores adenovirales, se analizaron la actividad específica y la estabilidad de la Luciferasa en tejidos vascularizados y no vascularizados. Los resultados se resumen en la Figura 8 (expresión de Luciferasa con respecto a la expresión en el hígado) y en la Tabla 2 (expresión de Luciferasa como un porcentaje de la expresión total en el organismo). Como era de esperar, en los ratones tratados con Ad5CMV/Luciferasa la mayor parte de la actividad luciferasa (>80% de la expresión total en el organismo) se encontró en el hígado. La actividad luciferasa controlada por el promotor de PPE-1 fue menor en el hígado (37-54% de la expresión total en el organismo). La expresión derivada de PPE-1 fue mucho mayor en la aorta (23-33% de la expresión total en el organismo 5 y 14 días después de la inyección, respectivamente), en comparación con los ratones tratados con Ad5CMV/Luciferasa (hasta 1,8% de la expresión total en el organismo; Tabla 2). Estos resultados confirman la especificidad endotelial observada en el cultivo celular. Se debe recordar que el hígado es un órgano altamente vascularizado. Por lo tanto se llevó a cabo el examen de la expresión celular en los órganos, como se detalla a continuación.

Tabla 2 - Expresión de luciferasa en los órganos 5 y 14 días después de la inyección de constructos basados en PPE-1 y CMV

Día después de la inyección	5		14	
	Unidades de luz/ μ g de proteína		Unidades de luz/ μ g de proteína	
Órgano	PPE-1	CMV	PPE-1	CMV
Aorta	13,0 $\pm$ 2,9 (32,7%)	1,4 $\pm$ 0,5 (0,56%)	10,6 $\pm$ 2,4 (12,6%)	1,3 $\pm$ 0,3 (1,1%)
Corazón	0,2 $\pm$ 0,1 (0,5%)	1 $\pm$ 0,6 (0,4%)	1,5 $\pm$ 0,3 (1,7%)	1,8 $\pm$ 0,6 (1,6%)
hígado	22,7 $\pm$ 4,5 (57%)	219 $\pm$ 111,5 (88,6%)	34,9 $\pm$ 7,8 (41,6%)	52,8 $\pm$ 10,6 (46,8%)
pulmón	0,2 $\pm$ 0,1 (0,5%)	2,3 $\pm$ 1,0 (0,9%)	3,6 $\pm$ 0,8 (4,3%)	2,0 $\pm$ 0,9 (1,8%)
músculo	0,3 $\pm$ 0,1 (0,7%)	0,8 $\pm$ 0,2 (0,3%)	1,2 $\pm$ 0,3 (1,4%)	1,5 $\pm$ 0,5 (1,3%)

Día después de la inyección	5		14	
	Unidades de luz/ μ g de proteína		Unidades de luz/ μ g de proteína	
bazo	1,3 $\pm$ 0,8 (3,2%)	1,6 $\pm$ 0,9 (0,6%)	2,0 $\pm$ 0,4 (2,4%)	2,3 $\pm$ 0,9 (2,0%)
páncreas	2 $\pm$ 0,6 (5,0%)	20,1 $\pm$ 6,8 (8,1%)	26,4 $\pm$ 5,9 (31,5%)	45,2 $\pm$ 24,5 (40,1%)
riñón	0,1 $\pm$ 0 (0,25%)	0,9 $\pm$ 0,6 (0,4%)	0,6 $\pm$ 0,1 (0,71%)	0,8 $\pm$ 0,3 (0,7%)

Las Figuras 30A y 30B demuestran la actividad luciferasa absoluta (unidades de luz/ μ g de proteína) en las aortas (A) e hígados (B) de los 110 ratones inyectados. La actividad de luciferasa se midió 1 (n = 13), 5 (n = 34), 14 (n = 32), 30 (n = 20) y 90 (n = 11) días después de la inyección. Los resultados en la aorta representan la actividad de los promotores (PPE-1 o CMV) principalmente en células endoteliales, mientras que los resultados en los hígados representan su actividad principalmente en hepatocitos.

Ejemplo 8

Análisis de eficacia, especificidad y estabilidad de Ad5PPE-1 in vivo en ratones BALB/C

Los experimentos del ejemplo 7 se repitieron en ratones BALB/C de 12 semanas de edad (n = 10 para cada grupo) con el fin de demostrar que los resultados observados no fueron un artefacto de una cepa concreta de animales.

Debido a que los resultados absolutos con los vectores adenovirales fueron menores en ratones BALB/C que en ratones C57BL/6, la expresión de Luciferasa se expresa como el porcentaje de la actividad total de la Luciferasa en todos los tejidos.

La expresión Luciferasa relativa más alta de 5 días después de la inyección se observó en los bazo de los ratones a los que se había inyectado Ad5PPE-1 (90,9%), y en los hígados de los ratones a los que se había inyectado Ad5CMV (86,2%). También se observó un aumento significativo en la actividad luciferasa relativa en las aortas de los ratones en los que se había inyectado Ad5PPE-1 14 días después de la inyección (32,9%), en comparación con su actividad cinco días después de la inyección (1,75%) (Figuras 31A y 31B; Ad5PPE-1Luc - barras vacías, Ad5CMVLuc - barras de color negro).

Estos resultados confirman que independientemente de la cepa de ratón, la especificidad de tejido del promotor de PPE-1 es suficientemente fuerte para eliminar eficazmente la expresión en hepatocitos, a pesar de la captación preferente del ADN inyectado por los hepatocitos.

Ejemplo 9

Localización celular del gen liberado por Ad5PPE-1 in vivo

Con el fin de determinar los sitios de expresión celular del gen expresado por PPE-1 *in vivo*, se utilizó Proteína Fluorescente Verde (GFP) liberada por el vector adenoviral Ad5PPE-1-GFP. Se utilizó Ad5CMVGFP (Quantum, Canadá) como control negativo específico de las células no endoteliales. Cinco días después de la inyección intravenosa, los ratones se sacrificaron y sus tejidos se analizaron mediante microscopía de fluorescencia.

En los ratones a los que se había inyectado el vector Ad5CMVGFP, la mayor parte de la expresión se detectó en los hepatocitos, y no se detectó expresión en las células endoteliales en el hígado (Figura 9A). En agudo contraste, los ratones a los que se había inyectado Ad5PPE-1-GFP (Figura 9B), no mostraron expresión en hepatocitos, pero mostraron una expresión significativa en células endoteliales en los vasos sanguíneos del hígado. Se obtuvieron resultados similares en otros tejidos en los que prácticamente toda la expresión derivada de PPE 1 se detectó en el endotelio, si bien ninguna expresión derivada de CMV fue endotelial. Estos resultados indican que la especificidad endotelial se preserva incluso dentro de un órgano que contiene células endoteliales y no endoteliales. Este hallazgo tiene implicaciones importantes para la prevención de la angiogénesis en tumores en crecimiento.

Ejemplo 10

Ensayos de la eficacia y la especificidad endotelial de Ad5PPE-1-3XLuc y Ad5PPE-1-3X GFP in vitro

Con el fin de determinar la eficacia relativa de Ad5PPE-1 y Ad5PPE-1-3X al dirigir la expresión de los genes informadores de luciferasa y proteína fluorescente verde (GFP) en las células, se sometió a ensayo la actividad específica en células endoteliales *in vitro* utilizando las líneas celulares descritas anteriormente. Se emplearon Ad5CMVLuc y Ad5CMVGFP como controles no específicos de tejido. Se emplearon Ad5PPE-1Luc y Ad5PPE-1GFP para determinar los cambios relativos en el nivel de expresión causados por la adición de la secuencia 3X.

Los resultados, resumidos en las Figuras 10 y 11, indican que las actividades de luciferasa bajo el control del promotor de PPE-1-3X fueron 5-10 veces mayores en las líneas CE (Células Endoteliales Aórticas Bovinas - BAEC) en comparación con la actividad en células no endoteliales - insulinooma de rata - RIN, HeLA, HepG2 y fibroblastos de piel normal (NSF) (figuras 10 y 11).

La Figura 10 muestra la actividad luciferasa como unidades de luz/μg de proteína en células B2B, BAEC y RIN transducidas por Ad5PPE-1Luc, Ad5PPE-1-3XLuc, y Ad5CMVLuc. Se observó la expresión de luciferasa más alta en células RIN transducidas por Ad5CMVLuc, sin embargo este constructo fue escasamente expresado en células BAEC y B2B. Se observó el siguiente nivel más alto de expresión de Luciferasa en las células BAEC transducidas por Ad5PPE-1-3XLuc. Ad5PPE-1Luc se expresó a niveles bajos en las células BAEC. En la línea celular B2B, Ad5PPE-1Luc y Ad5PPE-1-3XLuc se expresaron a niveles casi idénticos.

En general, la actividad luciferasa en las líneas celulares endoteliales bajo el control del promotor de PPE-1-3X fue 23 veces mayor que bajo el control del promotor de PPE-1 y 23-47 veces mayor que bajo el control del promotor de CMV en las mismas condiciones de infección (moi = 10). Esto es a pesar del hecho de que la expresión de Luciferasa en células RIN no endoteliales fue 3000 veces mayor bajo el control del promotor de CMV (figura 10).

Con el fin de establecer que PPE-1 y PPE-1-3X son inactivos en otros linajes de células no endoteliales se transdujeron las líneas celulares HeLA, HepG2, NSF. Se empleó BAEC como control endotelial. La Figura 11 muestra la actividad luciferasa como unidades de luz/μg de proteína en células HeLA, HepG2, NSF y BAEC transducidas por Ad5PPE-1Luc, Ad5PPE-1-3XLuc y Ad5CMVLuc. La transducción con Ad5CMVLuc causó niveles elevados de expresión de luciferasa en las células HeLA, HepG2 y NSF. Estas líneas celulares no lograron expresar la Luciferasa bajo el control de PPE-1 y expresaron la Luciferasa a niveles bajos con el promotor de PPE-1-3X. Como era de esperar, las células BAEC transducidas con Ad5PPE-1Luc o Ad5PPE-1-3XLuc mostraron una expresión de Luciferasa elevada.

Tomados en conjunto estos resultados indican que la introducción de la secuencia 3X en el promotor de PPE-1 causó niveles de expresión más altos en líneas celulares endoteliales a la vez que evitaba la expresión no deseada en células no endoteliales.

La adición de la secuencia 3X al promotor de PPE-1 también aumentó los niveles de expresión de la Proteína fluorescente verde en las líneas EC (Células Endoteliales Aórticas Bovina - BAEC) como se indica en las figuras 12A-C, que representan la expresión de GFP en BAEC transducidas con moi = 1. No se observó expresión de GFP utilizando un promotor de CMV en este experimento.

En la Figura 12, el panel A indica las células transducidas con Ad5PPE-1-3XGFP, el panel B indica las células transducidas con Ad5PPE-1GFP y el panel C indica Ad5CMVGFP. Una vez más, la introducción de la secuencia 3X en el promotor de PPE-1 aumentó significativamente la expresión del gen informador. Este resultado indica que la capacidad de la secuencia 3X para funcionar como un intensificador endotelial específico no es una función del gen aguas abajo que está siendo transcrito.

Por otra parte, la transducción con Ad5PPE-1-3X-GFP y Ad5PPE-1GFP no dio como resultado la expresión de GFP en células no endoteliales SMC, HeLA, HepG2 y fibroblastos de piel normal (NSF) en comparación con la alta expresión bajo el promotor de CMV como se resume en las Figuras 13-16.

La Figura 13 muestra la expresión de GFP en SMC transducidas con moi = 1 ya sea de Ad5PPE-1-3XGFP (panel A) o Ad5CMVGFP (panel B). Si bien el elevado nivel de expresión de GFP fue el resultado de la transducción con Ad5CMVGFP, no se produjo expresión de GFP a partir de la transducción con Ad5PPE-1-3XGFP.

La Figura 14 muestra los resultados de un experimento similar llevado a cabo en células HeLa. Al igual que en la figura anterior, el panel A indica las células transducidas con Ad5PPE-1-3XGFP y el panel B indica las células transducidas con Ad5CMVGFP. Una vez más, si bien el elevado nivel de expresión de GFP fue el resultado de la transducción con Ad5CMVGFP, no se produjo expresión de GFP a partir de la transducción con Ad5PPE-1-3XGFP.

La Figura 15 muestra los resultados de un experimento similar llevado a cabo en células HepG2. Al igual que en la figura anterior, el panel A indica las células transducidas con Ad5PPE-1(3X)GFP y el panel B indica las células transducidas con Ad5CMVGFP. Una vez más, si bien el elevado nivel de expresión de GFP fue el resultado de la transducción con Ad5CMVGFP, no se produjo expresión de GFP a partir de la transducción con Ad5PPE-1-3XGFP.

La Figura 16 muestra los resultados de un experimento similar llevado a cabo en células NSF. Al igual que en la figura anterior, el panel A indica las células transducidas con Ad5PPE-1-3XGFP y el panel B indica las células transducidas con Ad5CMVGFP. Una vez más, si bien el elevado nivel de expresión de GFP fue el resultado de la transducción con Ad5CMVGFP, se produjo una expresión muy baja de GFP a partir de la transducción con Ad5PPE-1-3XGFP.

Estos resultados, tomados en conjunto, indican un alto nivel de especificidad endotelial y se obtiene un alto nivel de expresión endotelial mediante el uso de un promotor de PPE-1 modificado que contiene la secuencia 3X del SEQ ID NO: 7.

Ejemplo 11

Localización celular de un gen informador liberado por Ad5PPE-1-3X *in vivo*

Con el fin de determinar el patrón de localización celular de un gen informador expresado bajo el control del promotor de PPE-1-3X *in vivo*, se inyectaron Ad5PPE-1-3XGFP y Ad5PPE-1GFP en ratones como se ha descrito anteriormente. Cinco días después de la inyección intravenosa, los ratones se sacrificaron y sus tejidos se analizaron mediante microscopía fluorescente.

Se observó una actividad GFP significativamente mayor en las células endoteliales los vasos sanguíneos del hígado, riñón y bazo de los ratones a los que se había inyectado Ad5PPE-1-3XGFP en comparación con los ratones a los que se había inyectado Ad5PPE-1GFP. Las Figuras 17A y B muestran los resultados representativos.

La Figura 17A muestra el bajo nivel de expresión de GFP en las células endoteliales que revisten un vaso sanguíneo de un ratón al que se había inyectado Ad5PPE-1GFP. La Figura 17B muestra el nivel mucho mayor de expresión de GFP resultante de la adición de la secuencia 3X al constructo.

A pesar de la alta expresión en el revestimiento de los vasos sanguíneos, no se detectó expresión en los hepatocitos, glomérulos, células epiteliales y esplenocitos (Figuras 18 y 19).

La Figura 18 muestra los resultados representativos de tejido de riñón de los ratones inyectados. Los ratones a los que se había inyectado Ad5CMVGFP (Figura 18A), Ad5PPE-1GFP (Figura 18B) y Ad5PPE-1-3XGFP (Figura 18C) mostraron todos una baja actividad de GFP en células de riñón. En la figura 18B, es visible una expresión de GFP ligeramente superior en la pared del vaso sanguíneo (indicada por la flecha).

La Figura 19 muestra los resultados representativos de tejido del bazo de ratones inyectados. Los ratones a los que se había inyectado Ad5CWGFP (Figura 19A), los ratones a los que se había inyectado Ad5PPE-1GFP (Figura 19B) y los ratones a los que se había inyectado Ad5PPE-1-3XGFP (Figura 19C) exhibieron todos un bajo nivel de actividad de GFP en células del bazo. Es visible una actividad de GFP superior en los vasos sanguíneos de los ratones a los que se había inyectado Ad5PPE-1-3XGFP (indicada por la flecha).

Estos resultados confirmaron que tanto el promotor de PPE-1 como el de PPE-1-3X son específicos de células endoteliales *in vivo*. Sugieren adicionalmente que la actividad de ambos promotores estaba limitada en tejido endotelial sin proliferación (es decir, vasos sanguíneos de órganos sanos. Por lo tanto, se llevaron a cabo análisis en un modelo angiogénico tumoral.

Ejemplo 12

Análisis del constructo de Ad5PPE-1 en la neovascularización tumoral *in vivo*

Con el fin de determinar la capacidad de Ad5PPE para dirigir específicamente a la expresión de un gen informador a vasos sanguíneos angiogénicos en un tumor, se empleó el modelo de LLC murino (descrito anteriormente en materiales y métodos).

En un experimento, se sometió a ensayo la expresión de luciferasa en la neovascularización tumoral cinco días después de inyecciones sistémicas de Ad5PPE-1Luc o Ad5CMVLuc (10^{10} pfu/ml cada uno).

En este experimento, la inyección sistémica de Ad5CMVLuc a modelos de tumores tanto primarios como metastáticos dio como resultado una expresión mínima en el tumor primario o en el pulmón metastático. Este nivel de expresión fue similar a la expresión mínima de Luciferasa dirigida por CMV en pulmones normales no sometidos a tratamiento previo (Figura 35; barras de color negro; $n = 12$). En agudo contraste, bajo el control del promotor de PPE-1 (Figura 35; barras vacías, $n = 9$), las metástasis de pulmón altamente angiogénicas se asociaron con la actividad luciferasa, que fue aproximadamente 200 veces mayor que la actividad de la Luciferasa en el tumor primario escasamente vascularizado y los pulmones no sometidos a tratamiento previo.

La expresión de la Luciferasa en tejidos no metastáticos tales como el hígado, riñón, corazón y páncreas fue mínima. El nivel de expresión en la aorta fue aproximadamente el 30% de los niveles en los pulmones metastáticos.

En un experimento adicional en el modelo de LLC se utilizaron los constructos Ad5PPE-1GFP y Ad5CMVGFP para localizar la expresión del gen informador en el tumor primario y los pulmones metastáticos.

Ratones a los que se había inyectado Ad5PPE-1GFP, mostraron niveles altos de expresión específica de GFP en los vasos sanguíneos del tumor primario (Figura 36C), aunque no se detectó expresión en las propias células tumorales. Esta observación es coherente con los resultados del modelo de cultivo de células LLC presentado en el ejemplo 20. En las metástasis de pulmón, se detectaron altos niveles de expresión de GFP en tanto en las arterias grandes como en los pequeños vasos angiogénicos de los focos metastáticos (Figura 36A). No se detectó expresión en el tejido pulmonar normal. La localización de las células endoteliales se demostró por la co-localización de la expresión de GFP (Figura 16A) y la inmunotinción con el anticuerpo CD31 (Figura 16B). En notable contraste, en los ratones a los que se había inyectado Ad5CMVGFP, no fue detectable actividad de GFP ni en el tumor primario ni en las metástasis de pulmón.

La figura 36C ilustra la expresión de GFP en los vasos sanguíneos de un tumor primario después de la inyección intratumoral de Ad5PPE-1GFP. La Figura 36D es una imagen de contraste de fase de la misma presentada como panel C que ilustra el tumor y sus vasos sanguíneos.

Estos resultados indican que si bien PPE-1 no dirige un alto nivel de expresión en las células tumorales per se, el promotor dirige el alto nivel de expresión en los endotelios vasculares dentro del tumor, especialmente en los vasos angiogénicos que proliferan rápidamente.

La inyección intratumoral de Ad5CMV en el modelo de tumor subcutáneo primario dio como resultado una alta expresión de Luciferasa en el tejido tumoral y niveles de expresión moderados en el hígado (10% de la cantidad expresada en el tumor; Figura 42). No se detectó expresión en los pulmones metastáticos. Por otro lado, cuando se inyectó intratumoralmente, la expresión de la luciferasa bajo el control del promotor de PPE-1 dio como resultado niveles de expresión de Luciferasa similares en el tumor primario y los pulmones metastáticos y no se detectó expresión en el hígado.

Ejemplo 13

Análisis del constructo de Ad5PPE-1 en un sistema de cultivo de células de carcinoma

Con el fin de analizar la eficacia de Ad5PPE-1 y Ad5CMV para dirigir la expresión de luciferasa en las células cancerosas, se utilizó la línea celular de Carcinoma Pulmonar de Lewis D122-96.

De llevó a cabo la transducción *In-vitro* a multiplicidades de infección (moi) variables. Los resultados indican que ambos vectores adenovirales son capaces de transducir el gen de la luciferasa de estas células (Tabla 3). Sin embargo, la actividad luciferasa dirigida por el promotor de PPE-1 fue mucho menor en las células LLC que la actividad detectada en las células endoteliales, 50 versus 1000-2500 unidades de luz/ μ g de proteína, respectivamente.

Tabla 3 - Transducción in vitro de la línea celular de carcinoma pulmonar de Lewis (D122-96) con Ad5PPE-1Luc y Ad5CMVLuc.

	MOI = 1	MOI = 5	MOI = 10
Ad5PPE-1	8,1 $\pm$ 0,06	33,95 $\pm$ 7,0	50,7 $\pm$ 5,0
Ad5CMV	9,3 $\pm$ 1,1	47,3 $\pm$ 4,0	88,13 $\pm$ 10,1

Ejemplo 14

Análisis del efecto de la secuencia 3X en vasos sanguíneos angiogénicos tumorales in vivo

Con el fin de determinar el efecto de la secuencia 3X sobre el promotor de PPE-1 en vasos sanguíneos angiogénicos, se empleó el modelo de metástasis de carcinoma pulmonar de Lewis (LLC) (descrito anteriormente en material y métodos). Cinco días después de la inyección IV de 10^{10} unidades infecciosas de Ad5PPE-1GFP, Ad5PPE-1-3XGFP o Ad5CMVGFP, se sacrificaron los ratones y se analizaron sus tejidos como se describe en materiales y métodos.

Las Figuras 20A-D resumen la expresión de GFP en pulmones metastáticos de ratones de control a los que se había inyectado solución salina (Figura 20A), ratones a los que se había inyectado Ad5CMVGFP (Figura 20B), ratones a los que se había inyectado Ad5PPE-1GFP (Figura 20C) y ratones a los que se había inyectado Ad5PPE-1-3XGFP (Figura 20D). La inmunotinción con anti-CD31 (Figuras 20C' a 20D') confirma la localización de la expresión de GFP en cada tejido metastático. Los resultados demuestran que si bien no se detectó expresión de GFP en los ratones de control - a los que se había inyectado solución salina (Figura 20A), hubo una ligera expresión alrededor de los bronquios epiteliales de los ratones a los que se había inyectado CMV, pero no en los vasos sanguíneos

angiogénicos de los pulmones metastáticos de estos ratones (Figura 20B). Se observó una baja expresión de GFP en los pulmones metastáticos de los ratones a los que se había inyectado Ad5PPE-1GFP (Figuras 20C y 20C'), mientras que se observó una expresión alta y específica en los nuevos vasos sanguíneos de los ratones a los que se había inyectado Ad5PPE-1-3XGFP (Figura 20D y 20D').

- 5 Estos resultados explican la aparente disparidad entre los resultados *in vivo* del ejemplo 10 y los resultados *in vitro* de los ejemplos 2, 3 y 6. Tanto el promotor de PPE-1 como el de PPE-1-3X son específicos endoteliales. Sin embargo, la secuencia 3X aumenta enormemente el nivel de expresión en tejido endotelial que prolifera rápidamente, tal como los vasos sanguíneos recién formados en un tumor en crecimiento.

Ejemplo 15

- 10 Efecto del elemento 3X sobre el promotor de PPE-1 en vasos sanguíneos angiogénicos tumorales

Con el fin de estudiar el efecto del elemento 3X de la presente invención sobre la eficacia y la actividad específica del promotor de PPE-1 en vasos sanguíneos angiogénicos tumorales, se empleó el modelo de metástasis de LLC. Cinco días después de la inyección *iv* de 10^{10} pfu/ml de Ad5PPE-1Luc, Ad5PPE-1-3XLuc, Ad5CMVLuc, Ad5PPE-1GFP, Ad5PPE-1-3X-GFP o Ad5CMVGFP, se sacrificaron los ratones y se analizaron sus tejidos para determinar la

- 15 expresión de Luciferasa o GFP como se ha descrito anteriormente.

La Figura 37 es un histograma que compara la expresión de luciferasa en pulmones normales frente a la de pulmones metastáticos después de inyección sistémica de Ad5PPE-1-3XLuc, Ad5PPE-1Luc o Ad5CMVLuc. Los grupos experimentales fueron Ad5CMVLuc (n = 7; barras de color negro), Ad5PPE-1Luc (n = 6; barras de color gris) y Ad5PPE-1-3XLuc (n = 13; barras de color marrón). La actividad se expresa como unidades de luz/ μ g de proteína.

- 20 La expresión de luciferasa bajo el control del promotor de PPE-1-3X fue 35 veces mayor en los pulmones metastáticos con respecto a su actividad en pulmones normales y 3,5 veces superior que la expresión dirigida por el promotor de PPE-1 sin el elemento 3X ($p < 0,001$). Se detectó muy baja actividad luciferasa en otros tejidos de ratones a los que se había inyectado Ad5PPE-1-3XLuc. El cálculo de la expresión de luciferasa en los pulmones como porcentaje del hígado de cada animal inyectado reveló que la actividad aumentaba 10 veces en el pulmón metastático en comparación con la actividad en el pulmón normal (Figura 38).

- 25 Con el fin de localizar la expresión del gen informador para los tipos de células específicos, se emplearon constructos de GFP. Se ha mostrado la expresión de GFP en pulmones metastáticos de ratones a los que se había inyectado Ad5PPE-1-3XGFP. La inmunotinción por medio del anticuerpo CD31 confirma la localización de la expresión de GFP en los nuevos vasos sanguíneos. No se detectó expresión de GFP en los ratones de control - a los que se había inyectado solución salina. Un bajo nivel de expresión alrededor de los bronquios epiteliales de los ratones a los que se había inyectado CMV, pero no en los vasos sanguíneos angiogénicos del pulmón metastático. En resumen, estos resultados indican que se produjeron grandes incrementos en el nivel de expresión como resultado de la introducción de un elemento 3X en los constructos de Ad5PPE-1 y que este incremento de expresión era específico para los vasos sanguíneos angiogénicos de los tumores. Potencialmente, el efecto observado puede estar acoplado a la respuesta a la hipoxia descrita anteriormente para potenciar aún más los niveles de expresión de una secuencia de interés.

Ejemplo 16

Caracterización adicional de la respuesta a hipoxia de PPE-1

- 40 Con el fin de caracterizar adicionalmente el efecto de la hipoxia sobre la actividad del promotor de PPE-1 murino, se transfectaron células endoteliales aórticas bovinas (BAEC) por medio de un plásmido de ADN (pEL8; Figura 26A). El plásmido pEL8 contiene el promotor de PPE-1 murino (1,4 kb) (rojo), el gen de la luciferasa (1842 pb), los sitios poli A de SV40 y el primer intrón del gen de endotelina-1, denominados en conjunto casete del promotor de PPE-1, fue digerido y extraído por medio de la enzima de restricción BamHI como se describe en materiales y métodos. Después de la transfección, las células se sometieron a condiciones de hipoxia.

- 45 La expresión de luciferasa en BAEC transfectadas sometidas a 18 horas de hipoxia (0,5% O₂) fue ocho veces mayor que la expresión de luciferasa en las células cultivadas en un ambiente normóxico (Figura 21). La Figura 21 demuestra que la actividad de luciferasa (unidades de luz/ μ g de proteína) en BAEC transfectadas por un plásmido que contiene el promotor de PPE-1 murino fue significativamente mayor cuando las células transfectadas se incubaron en un entorno hipóxico. Las eficacias de transfección equivalente se confirmaron mediante co-transfección con un vector informador de β -galactosidasa y análisis de la actividad de LacZ.

- 50 Con el fin de determinar si promotor de PPE-1 murino liberado por el vector adenoviral también está regulado al alza por la hipoxia, se transdujeron las BAEC por medio de Ad5PPE-1Luc. Se utilizó Ad5CMVLuc como control no específico en este experimento. Los resultados se resumen en la Figura 22. Actividad Luciferasa con hipoxia en BAEC transducidas por Ad5PPE-1Luc. En marcado contraste, no se detectó ninguna diferencia significativa entre normoxia e hipoxia en las células transducidas con Ad5CMV (Figura 22).

Para comprender si la mejora de la actividad del promotor de PPE-1 es específica de las células endoteliales, se transdujeron diferentes líneas celulares (BAEC, B2B, CHO, RIN y miocitos cardíacos) por medio de Ad5PPE-1 (moi = 10) y se sometieron a entorno de hipoxia (0,5% O₂) o normoxia. Los resultados se resumen en la figura 23. La expresión de luciferasa aumentó ligeramente en células B2B y aumentó significativamente en células BAEC cultivadas en un entorno hipóxico. La expresión de luciferasa en las otras líneas celulares se redujo por el entorno hipóxico, en comparación con el normóxico. Estos resultados confirman que la inducción hipóxica del promotor de PPE-1 se produce principalmente en los linajes de células endoteliales.

Ejemplo 17

Efecto de la secuencia 3X sobre la respuesta a hipoxia de PPE-1

- Con el fin de determinar el efecto de la secuencia 3X sobre la respuesta a hipoxia de PPE-1, se transdujeron BAEC por medio de Ad5PPE-1Luc y Ad5PPE-1(3X)Luc. Después de la transducción, se incubaron las células BAEC en un entorno o bien hipóxico o bien normóxico como se ha detallado anteriormente. Los resultados se resumen en la Figura 24. La expresión de luciferasa usando el constructo de Ad5PPE-1Luc aumentó significativamente (siete veces) en respuesta a la hipoxia (2578 en hipoxia y 322,1 en normoxia). En contraste, el constructo de Ad5PPE-1(3X)Luc mostró un incremento de sólo 1,5 veces en respuesta a la hipoxia (de 2874,5 en condiciones de normoxia a 4315 en condiciones de hipoxia). Estos resultados indican que el elevado nivel de expresión en normoxia observado cuando se añade la secuencia 3X al promotor de PPE-1 sirve para enmascarar la respuesta hipóxica en cierta medida.

Ejemplo 18

- Análisis de la respuesta de PPE-1 a hipoxia en un modelo de ratón transgénico

Con el fin de examinar la actividad del promotor de PPE-1 murino en tejidos sometidos a hipoxia/isquemia regional, se emplearon ratones transgénicos para mPPE-1-Luc, descritos anteriormente en materiales y métodos. Se indujo en los ratones una isquemia regional de la extremidad posterior como se ha descrito anteriormente (Couffignal T. y col. (1998) Am. J. Pathol. 152; 1667-1679). En resumen, los animales se anestesiaron con pentobarbital sódico (40 mg/kg, IP). Se indujo la isquemia unilateral de la extremidad posterior mediante ligadura de la arteria femoral derecha, aprox. 2 mm proximal con respecto a la bifurcación de las arterias safena y poplítea. Para verificar la inducción del cambio funcional en la perfusión, se llevó a cabo la formación de imágenes ultrasónicas los días 4 y 14 por medio del sistema de ultrasonidos Sinergy (GE) equipado con un transductor de 7,5 MHz y un soporte lógico angiográfico. Los animales se alojaron en condiciones convencionales durante un máximo de 18 días.

- La expresión de la luciferasa se analizó 2, 5, 10 y 18 días después de la ligadura en el músculo isquémico, en el músculo no ligado normal, en el hígado, el pulmón, y la aorta.

Los resultados, resumidos en la Figura 25, muestran que mientras que no se detectó ninguna diferencia significativa en el hígado, pulmón y aorta durante los días posteriores a la ligadura, la expresión del gen de luciferasa aumentó después de la ligadura femoral tanto en el músculo no ligado normal como en el isquémico. Si bien la expresión de luciferasa pico en el músculo isquémico se detectó cinco días después de la ligadura, la expresión de luciferasa pico en el músculo no ligado se detectó diez días después de la ligadura de la arteria femoral. Esto indica que la respuesta hipóxica del promotor de PPE-1 es funcional en un sistema *in vivo*. La expresión de luciferasa en el músculo no isquémico no cambió durante los días del ensayo, en comparación con su expresión en el tejido de control no operado (día = 0). En contraste, la expresión de luciferasa en el músculo isquémico fue significativamente superior el día 5 que en otros momentos determinados.

El día 5, la expresión de luciferasa dirigida por PPE-1 fue 2,5 veces mayor que en los ratones de control no operados, y en comparación con el músculo isquémico en los días 10 y 18 (Figura 40).

La expresión de Luciferasa en otros tejidos no isquémicos incluyendo hígado, pulmones y aorta de los ratones transgénicos sometidos a isquemia regional no reveló cambios significativos en el plazo de 18 días después de la inducción de la isquemia en la expresión de luciferasa en estos tejidos (Figura 41).

Adicionalmente, estos resultados confirman que la expresión de Luciferasa fue mayor en tejidos que contienen un alto porcentaje de tejido endotelial (pulmón y aorta) que en aquellos tejidos que contienen un bajo porcentaje de tejido endotelial (hígado y músculo no isquémico).

Ejemplo 19

- Efecto del nivel de proliferación celular sobre la actividad de Ad5PPE-1Luc en células endoteliales

Con el fin de determinar el efecto del nivel de proliferación celular sobre la eficacia y la actividad específica de Ad5PPE-1Luc, se sometió a ensayo *in vitro* un modelo angiogénico de células endoteliales (BAEC). Las BAEC transducidas se indujeron o bien a la quiescencia mediante privación de suero o bien se cultivaron en FCS al 10% para la proliferación normal. En resumen, las células fueron transducidas durante 48 horas ya sea como células

quiescentes - 72 horas después de la privación de suero ya sea como células en proliferación - en medio normal (FCS al 10%). La actividad de luciferasa se expresó como unidades de luz/ μ g de proteína, para normalizar la diferencia en la cantidad de células. Los resultados presentados son un promedio del ensayo por triplicado de cuatro experimentos independientes representativos.

5 La expresión de luciferasa bajo el control del promotor de PPE-1 (barras vacías; Figura 28) fue 4 veces superior en las BAEC en proliferación normales que en las células quiescentes, y 25 veces superior en BAEC en proliferación normales que la expresión de luciferasa bajo el control del promotor de CMV (barras de color negro; Figura 28). Adicionalmente, en las células en proliferación, la actividad bajo el control del promotor de PPE-1 fue 10 veces mayor que bajo el control del promotor de CMV.

10 Con el fin de simular las condiciones angiogénicas *in vitro*, se sometió a ensayo la actividad de Ad5PPE-1Luc en BAEC inducidas a una rápida proliferación mediante la adición de 40 ng/ml de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). La actividad en estas condiciones se comparó con la actividad en las células en proliferación normales y las células quiescentes como se ha descrito anteriormente. La expresión de luciferasa en BAEC inducidas a la proliferación celular con VEGF fue 44 veces mayor que en las células en proliferación normales, y 83 veces mayor que en células quiescentes (Figura 29).

Juntos, estos experimentos indican que el nivel de actividad de una secuencia de interés bajo el control transcripcional del Promotor de PPE-1 es una función del nivel de proliferación celular, causando la rápida proliferación niveles de expresión más altos.

Ejemplo 20

20 Analisis del promotor de PPE-1 en ratones en los que se ha inducido aterosclerosis

Con el fin de someter a ensayo la eficiencia y la especificidad del vector Ad5PPE-1 en vasos sanguíneos ateroscleróticos, se inyectaron sistémicamente 10^{10} pfu/ml de los vectores virales a ratones carentes de ApoE de 6 meses edad (Plump, A.S. et al. Cell; 1991; 71:343-353).

25 A medida que los ratones carentes de ApoE envejecen, desarrollan niveles elevados de colesterol y extensas placas aterogénicas sin la inducción de una dieta rica en lípidos. La figura 32 es una imagen de una aorta disecada de un ratón carente de ApoE coloreada por Sudán - IV. Obsérvese que la aorta torácica contiene menos lesiones ateroscleróticas teñidas de color rojo mientras que la región abdominal es altamente aterosclerótica. (Figura 32 adaptada de imágenes de las lesiones ateroscleróticas aórticas por 125I-HDL y 125I-BSA. A. Shaish et al, Pathobiology - Presentado para su publicación).

30 La Figura 33 resume la expresión de Luciferasa observada 5 días después de inyecciones sistémicas de Ad5PPE-1Luc (barras vacías, n = 12) y Ad5CMVLuc (barras de color negro, n = 12) a ratones carentes de ApoE. Los resultados se presentan como expresión absoluta de Luciferasa en el área torácica que contiene menos lesión aterosclerótica, y la aorta abdominal que es rica lesión aterosclerótica.

35 La expresión de luciferasa controlada por el promotor de PPE-1 fue 6 veces mayor en la región abdominal altamente aterosclerótica, y 1,6 veces superior en la aorta torácica ligeramente aterosclerótica en comparación con la expresión bajo el control del promotor de CMV.

40 No se observó ninguna diferencia significativa entre las dos regiones de la aorta en los ratones a los que se había inyectado Ad5PPE-1Luc, mientras que se observó una mayor expresión de Luciferasa en la aorta torácica del grupo al que se había inyectado Ad5CMVLuc en comparación con baja expresión en la aorta abdominal que contiene lesión.

Estos resultados indican que si bien un promotor constitutivo (CMV) tiene una tendencia a desconectarse en las zonas en las que la aterosclerosis es más severa, el promotor de PPE-1 es relativamente poco afectado por el progreso de la enfermedad.

Ejemplo 21

45 Análisis del promotor de PPE-1 de un modelo de cicatrización de herida

Con el fin de someter a ensayo la eficacia y la actividad específica de los constructos de Ad5PPE-1 al dirigir la expresión de luciferasa a los vasos sanguíneos para la cicatrización de heridas, se empleó un modelo de cicatrización de heridas murino como se ha descrito anteriormente en Materiales y Métodos.

50 Como en otros experimentos, se utilizó Ad5CMVLuc como control no específico de tejido. La actividad luciferasa bajo el control del promotor de PPE-1 (Figura 34; barras vacías) fue mayor tanto en la región normal ($6,8 \pm 3,2$) como en la región de cicatrización de la herida ($5 \pm 1,6$) en comparación con la actividad observada bajo el control de CMV (Figura 34; barras de color negro).

Debido a que tanto el promotor CMV y el promotor de PPE-1 exhibieron niveles reducidos de expresión en la cicatrización de heridas, estos resultados son difíciles de interpretar. A pesar de esta observación inesperada, resulta evidente que el promotor de PPE-1 dirige mayores niveles de expresión que el promotor de CMV tanto en tejido normal como con cicatrización. La presencia de tejido cicatricial necrótico puede dar cuenta de los niveles de expresión reducidos observados con ambos promotores en la cicatrización de heridas.

5

LISTA DE SECUENCIAS

<110> vascular Biogenics Ltd.

5 <120> PROMOTORES QUE EXHIBEN ESPECIFICIDAD DE CÉLULAS ENDOTELIALES, Y MÉTODOS PARA UTILIZAR LOS MISMOS

<130> FSS-12328

<140> 01996590.4

10 <141> 15 de Noviembre de 2001

<150> US 60/248.582

<151> 17 de Noviembre de 2000

15 <160> 8

<170> Patent In versión 3.1

<210> 1

20 <211> 1334

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 1

gtgtgtgtgtgt gtgtgtgtgtgt gtgtgtgtgtgt gtgtgtgtgtgt gtgttagtgta cttctgatcg	60
gcgatactag ggagataagg atgtacctga caaaaccaca ttgtttgtgt tatcattatt	120
atttagtttt ccttccttgc taactcctga cggaatcttt ctcacctcaa atgcgaagta	180
cttagtttta gaaaagactt ggtggaagg gtggtggtgg aaaagtaggg tgatcttcca	240
aactaatctg gttccccgcc cgccccagta gctgggattc aagagcgaag agtggggatc	300
gtccccctgt ttgatcagaa agacataaaa ggaaatcaa gtgaacaatg atcagcccca	360
cctccacccc acccccctgc gcgcgcacaa tacaatctat ttaattgtac ttcatacttt	420
tcattccaat ggggtgactt tgcttctgga gaaactcttg attcttgaac tctggggctg	480
gcagctagca aaaggggaag cgggctgctg ctctctgcag gttctgcagc ggtctctgtc	540
tagtggtgt tttctttttc ttagccctgc ccctggattg tcagacggcg ggcgtctgcc	600
tctgaagtta gccgtgattt cctctagagc cgggtcttat ctctggctgc acgttgccctg	660
25 tgggtgacta atcacacaat aacattgttt agggctggaa taaagtcaga gctgtttacc	720
cccactctat aggggttcaa tataaaaagg cgcgaggagaa ctgtccgagt cagacgcggt	780
cctgcaccgg cgctgagagc ctgaccgggt ctgctccgct gtccttgccg gctgcctccc	840
ggctgcccgc gacgttttgc cccagtgga agggcactt gctgaggacc gcgctgagat	900
ctaaaaaaaa aacaaaaaac aaaaaacaaa aaaaccaga ggcgatcaga gcgaccagac	960
accgtctctc tcgttttgca ttgagttcca ttgcaaccg agttttcttt ttttcctttt	1020
tccccactct tctgaccct ttgcagaatg gattattttc ccgtgatctt ctctctgctg	1080
ttcgtgactt tccaaggagc tccagaaaca ggtaggcgcc acttgcaat ctttctactt	1140
cagcgcagca gttatcgctt ctgttttcca cttttctttc tttcttttct ttcattcttt	1200
cctttttatt tattttttta attactgaag ctccagcagc aagtgcctta caattaatta	1260
acttctgtgt gaagcgaaag aaataaaacc cctgtttgaa tacagctgac tacaaccgag	1320
tatcgcatag cttc	1334

<210> 2

	<211> 96		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
5	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
	<400> 2		
	gctagcgtac ttcatacttt tcattccaat ggggtgactt tgcttctgga ggggtgacttt	60	
10	gcttctggag ccaatgggta cttcatactt ttcatt	96	
	<210> 3		
	<211> 96		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
15	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
	<400> 3		
20	gctagcctcc agaagcaaag tcacccatt ggaatgaaaa gtatgaagta caatgaaaag	60	
	tatgaagtac ccattggctc cagaagcaaa gtcacc	96	
	<210> 4		
	<211> 6		
	<212> ADN		
25	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Sitio de restricción Nhe-1		
30	<400> 4		
	gctagc 6		
	<210> 5		
	<211> 6		
35	<212> ADN		
	<213> Mus musculus		
	<220>		
	<221> característica_misc		
40	<223> Elemento sensible a hipoxia - E-box		
	<400> 5		
	gcacgt 6		
45	<210> 6		
	<211> 44		
	<212> ADN		
	<213> Mus musculus		
50	<220>		
	<221> característica_misc		
	<223> Elemento potenciador específico endotelial murino		
	<400> 6		
55	gtactcata ctttcattc caatggggtg acttgcttc tgga	44	
	<210> 7		
	<211> 143		
	<212> ADN		

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Una copia triplicada de una secuencia potenciadora murina originada a partir del promotor de PPE-1

5

<400> 7

```

gtacttcata cttttcattc caatgggggtg actttgcttc tggaggggtga ctttgcttct    60
ggagccagta cttcatactt ttcattgtac ttcatacttt tcattccaat ggggtgactt    120
tgcttctgga ggctagctgc cag                                           143

```

<210> 8

10

<211> 47

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15

<223> Fragmento EDC

<400> 8

```

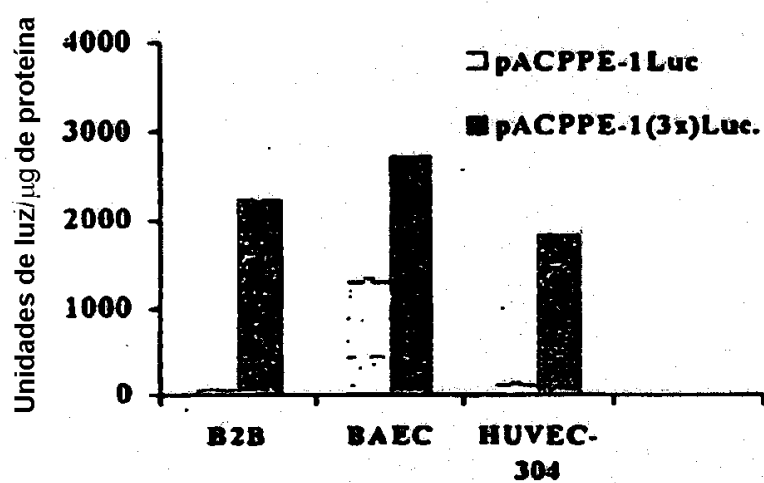
ctggaggggtg actttgcttc tggagccagt acttcatact ttcatt    47

```

REIVINDICACIONES

1. Un polinucleótido que comprende:
 - (a) un promotor funcional en células endoteliales;
 - (b) un elemento regulador que contiene al menos una copia de la secuencia expuesta en el SEQ ID NO: 8 o la secuencia complementaria de la misma conectada operablemente a dicho promotor, y
 - (c) una secuencia de ácido nucleico que codifica un factor inductor de apoptosis bajo el control regulador de dicho promotor y dicho elemento regulador.
2. El polinucleótido de la reivindicación 1, en donde dicho factor inductor de apoptosis es un gen pro-apoptótico.
3. El polinucleótido de la reivindicación 1 o 2, en donde dicho elemento regulador incluye adicionalmente al menos una copia de la secuencia expuesta en el SEQ ID NO: 6 o la secuencia complementaria de la misma.
4. El polinucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicho promotor funcional en células endoteliales comprende un promotor de prepro-endotelina-1 (PPE-1).
5. El polinucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende adicionalmente un elemento de respuesta a la hipoxia que incluye al menos una copia de la secuencia expuesta en el SEQ ID NO: 5.
6. El polinucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde dicho elemento regulador es la secuencia expuesta en el SEQ ID NO: 7 o la secuencia complementaria de la misma.
7. El polinucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende el promotor de PP-1-3X, en donde dicho promotor comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en el SEQ ID NO: 1 y dicho elemento regulador comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en el SEQ ID NO: 7 o la secuencia complementaria de la misma.
8. El polinucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7, en donde dicho gen pro-apoptótico se selecciona del grupo que consiste en una timidina quinasa de Herpes simplex, una angiostatina, p55, una endostatina y una quimera de angiostatina-endostatina.
9. Un constructo de ácido nucleico que comprende el polinucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
10. El constructo de ácido nucleico de la reivindicación 9, en donde dicho constructo es un vector de adenovirus.
11. El constructo de ácido nucleico de la reivindicación 10, en donde dicho vector de adenovirus es un vector de Ad5.
12. Una célula de mamífero transformada con el constructo de ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11.
13. El constructo de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, para su uso en la inhibición de la angiogénesis en un sujeto que lo necesite.
14. El constructo de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, para su uso en la inhibición de la angiogénesis en una masa tumoral de un sujeto que lo necesite.
15. Un vector de adenovirus recombinante que comprende:
 - (a) un polinucleótido que comprende un elemento intensificador que incluye al menos una copia de la secuencia expuesta en el SEQ ID NO: 7 o la secuencia complementaria de la misma.
 - (b) un promotor de PPE-1 funcional en células endoteliales como se expone en el SEQ ID NO: 1;
 - (c) una secuencia de ácido nucleico que codifica un factor inductor de apoptosis bajo el control de dicho promotor; y
 - (d) un elemento de respuesta a hipoxia como se expone en el SEQ ID NO: 5, en donde dicho vector de adenovirus es un vector de serotipo 5 de Ad.
16. El vector de adenovirus de la reivindicación 15, en donde dicho elemento inductor de apoptosis es un gen proapoptótico.
17. El vector de adenovirus de la reivindicación 15 o 16, para su uso en la inhibición de la angiogénesis en un tejido endotelial de un sujeto que lo necesite.

18. El vector de adenovirus de la reivindicación 17, en donde dicho tejido es una masa tumoral.

FIGURA 1.

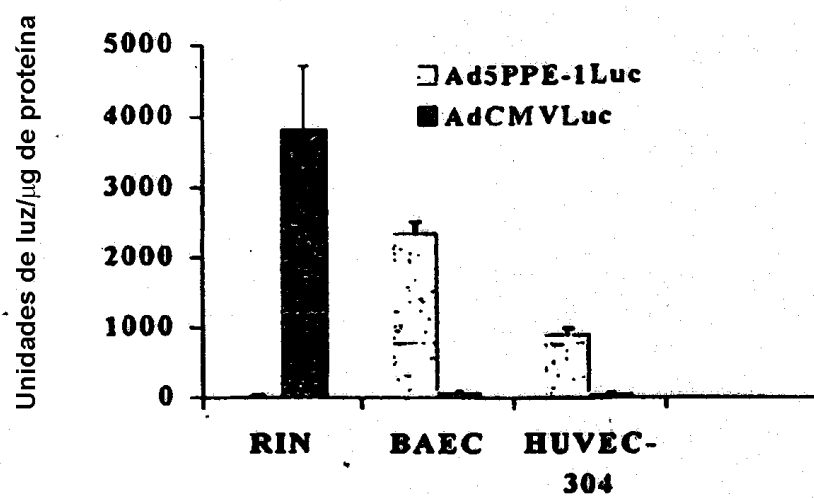
**FIGURA 2**

Figura 3a

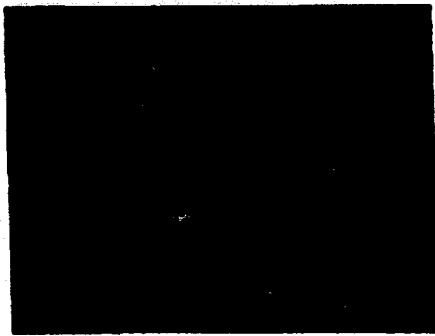
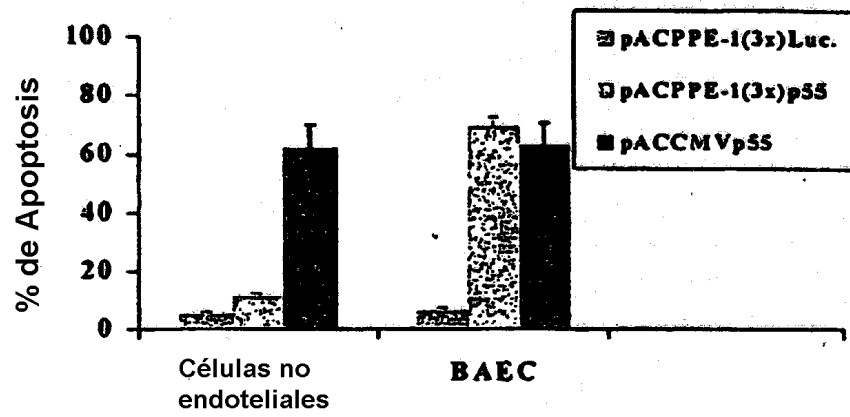


Figura 3b

Figura 4



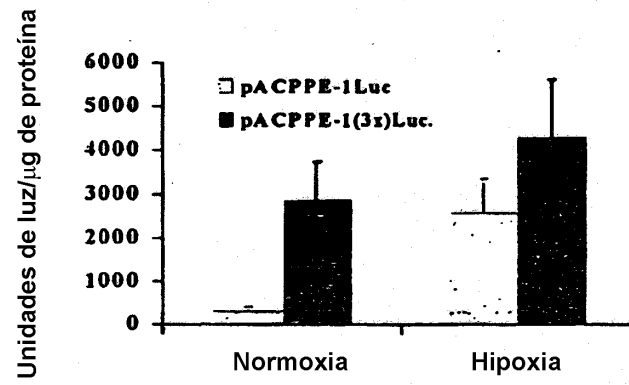


Figura 5

Figura 6

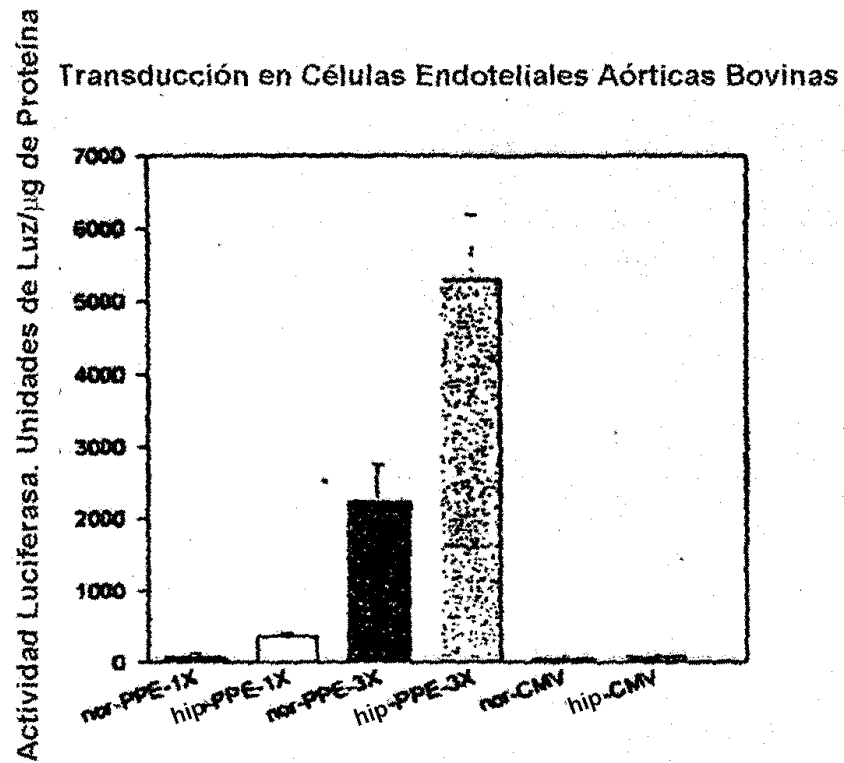


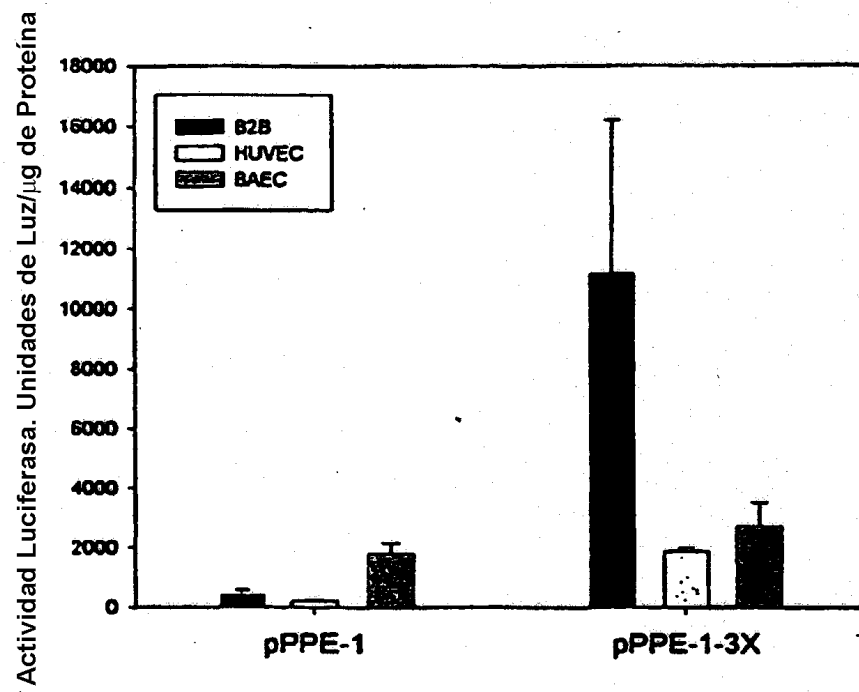
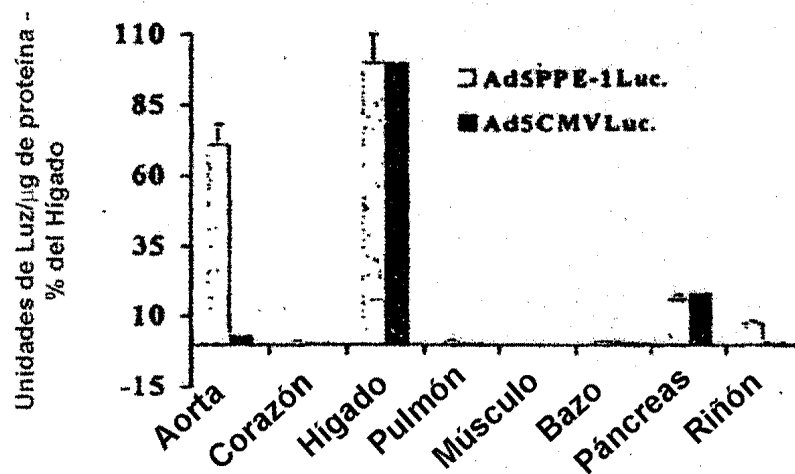
Figura 7

Figura 8

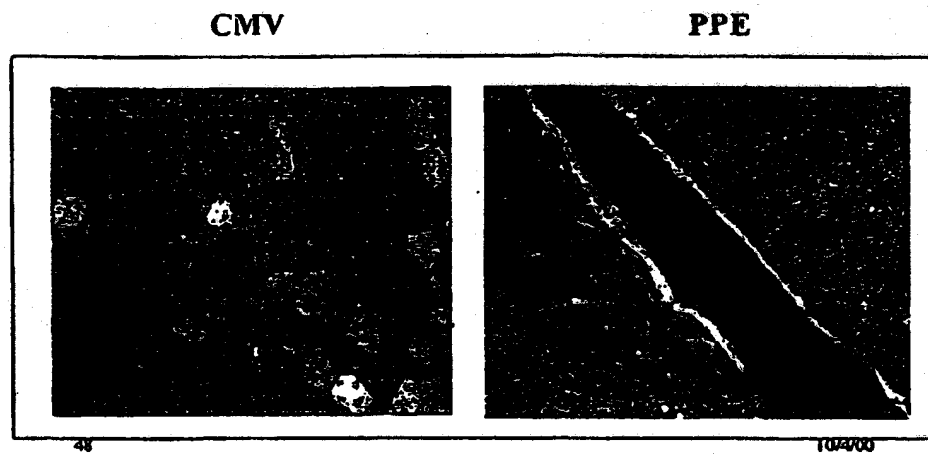
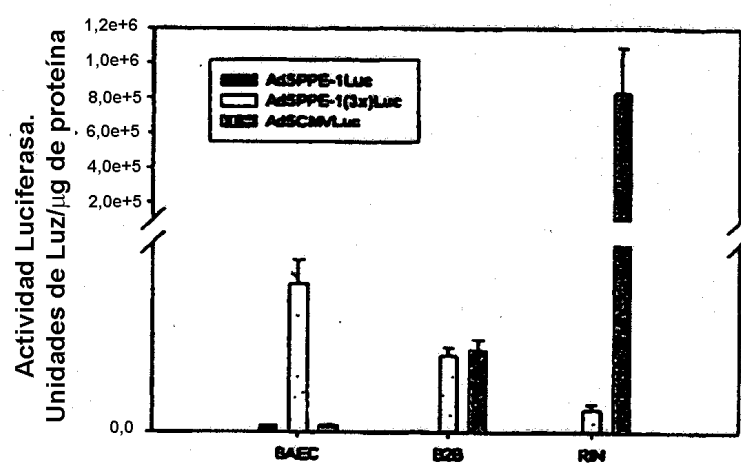


Figura 9A

Figura 9B

Figura 10

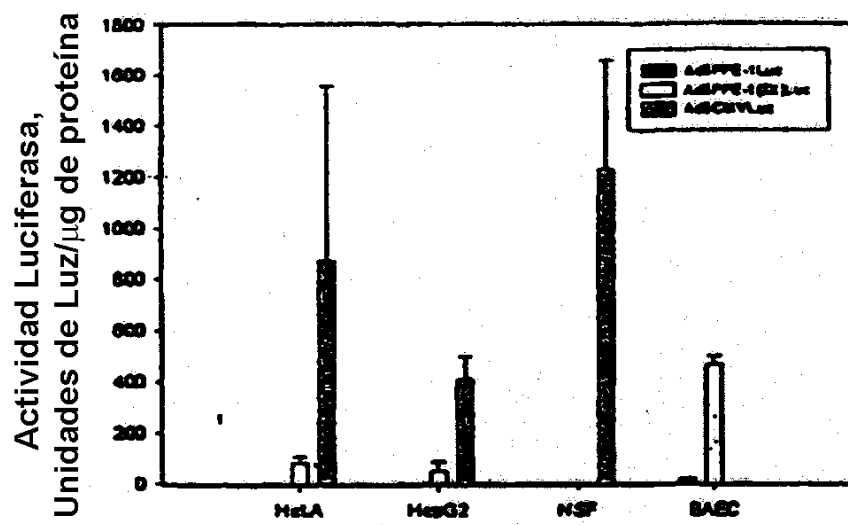


Figura 11

Figura 12A



Figura 12B



Figura 12C

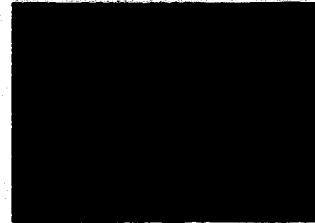


Figura 13A

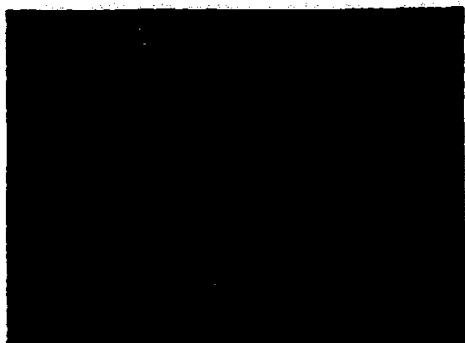


Figura 13B



Figura 14A



Figura 14B



Figura 15A

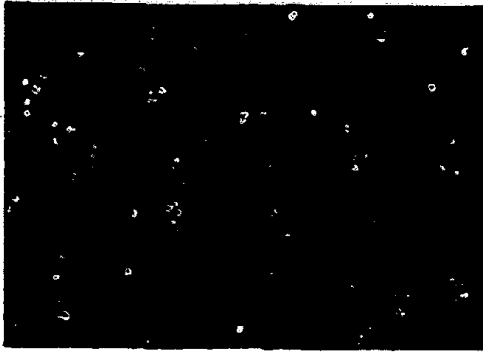


Figura 15B

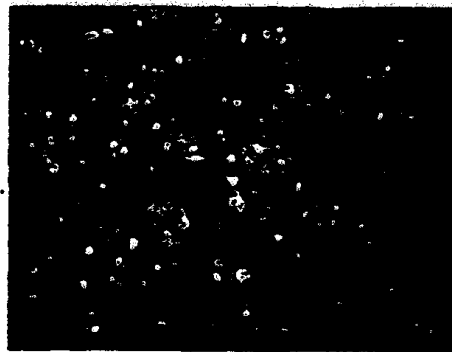


Figura 16A



Figura 16B



Figura 17A



Figura 17B



Figura 18A

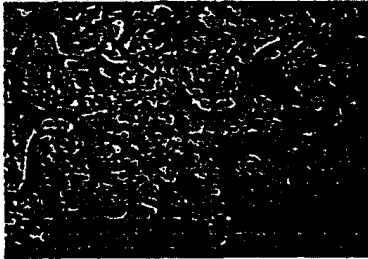


Figura 18B

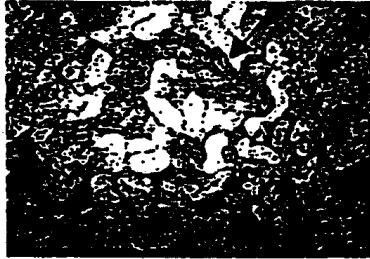


Figura 18C



Figura 19A

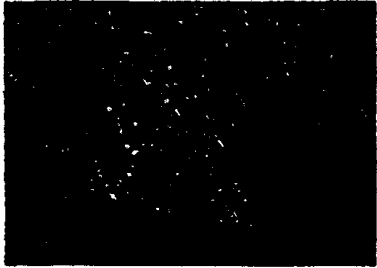


Figura 19B

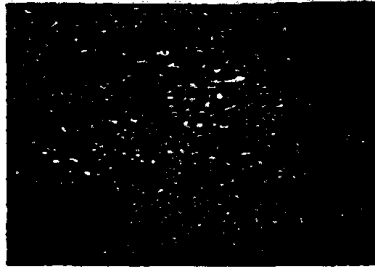


Figura 19C

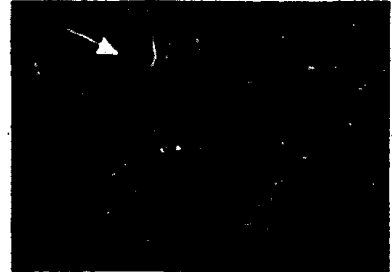




Figura 20A

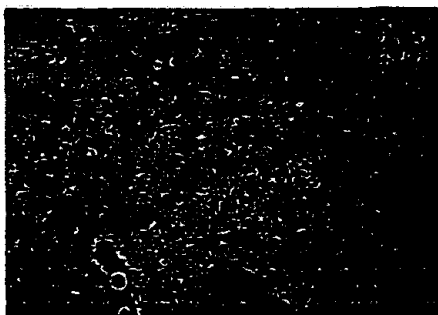


Figura 20B



Figura 20C



Figura 20C'

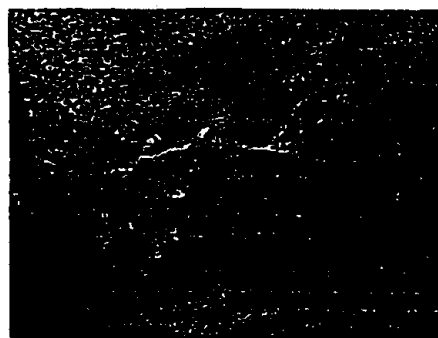


Figura 20D

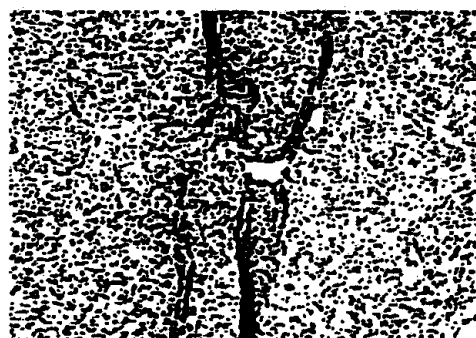


Figura 20D'

Figura 21

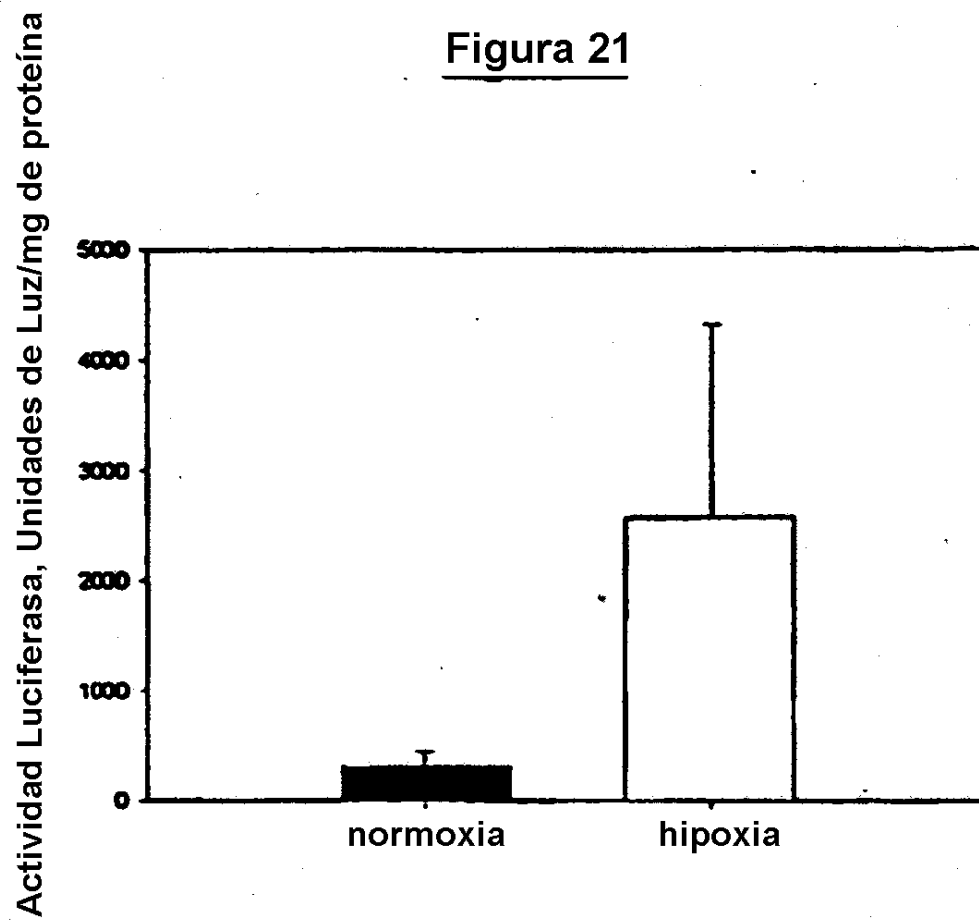


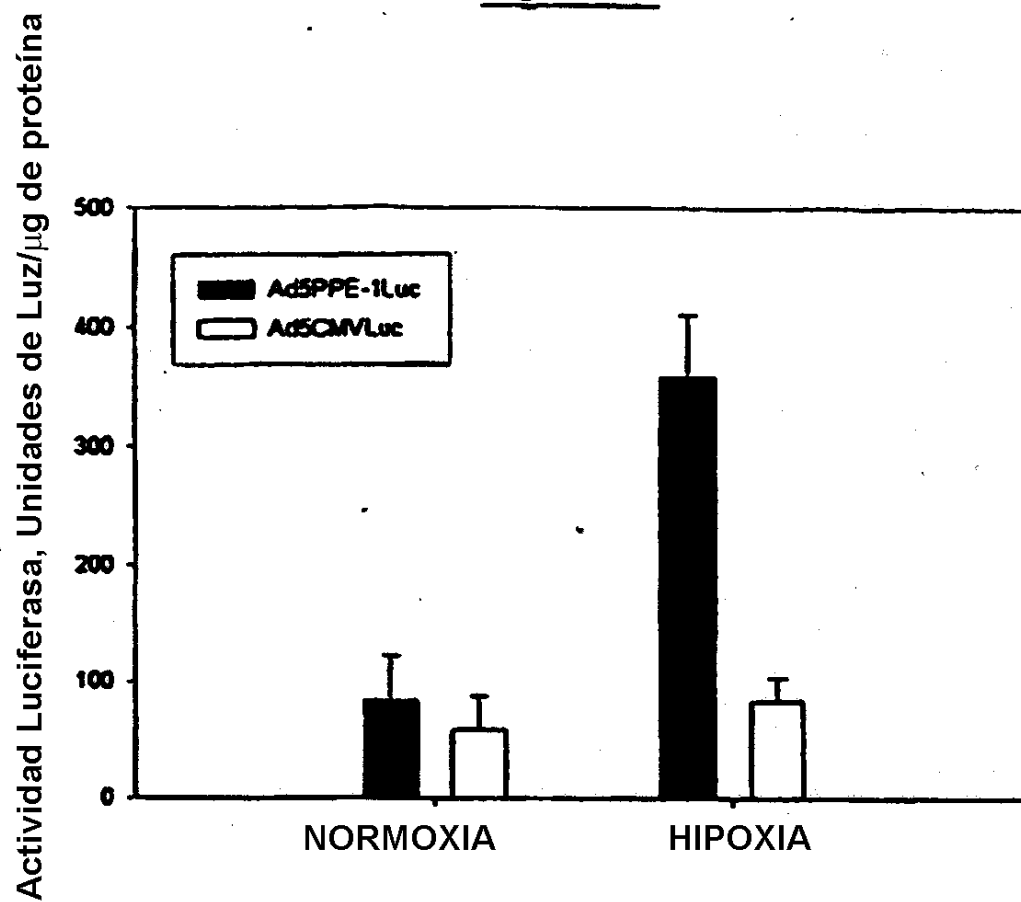
Figura 22

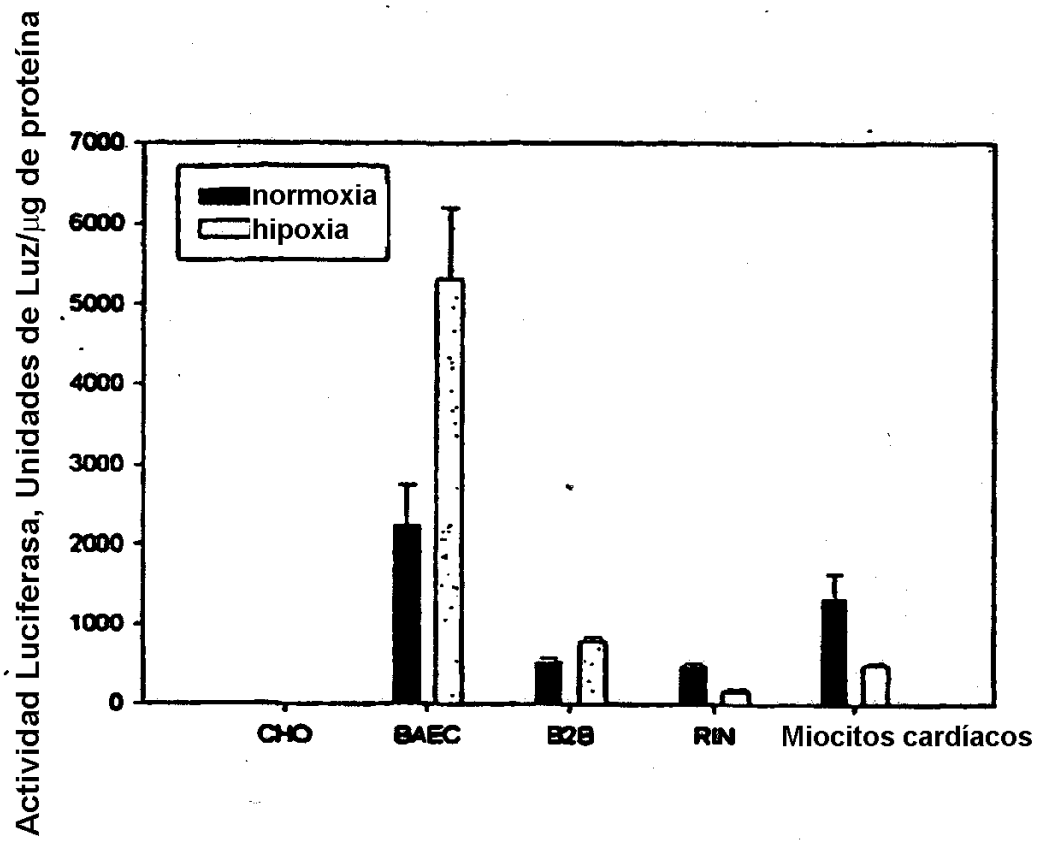
Figura 23

Figura 24

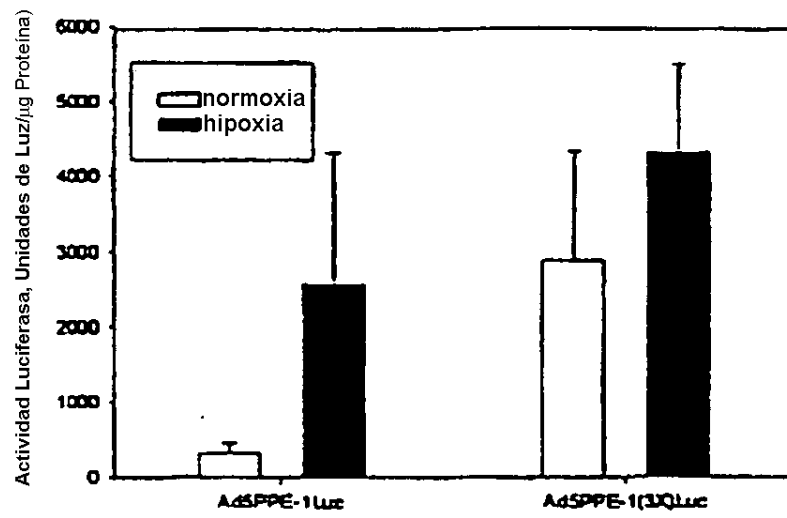
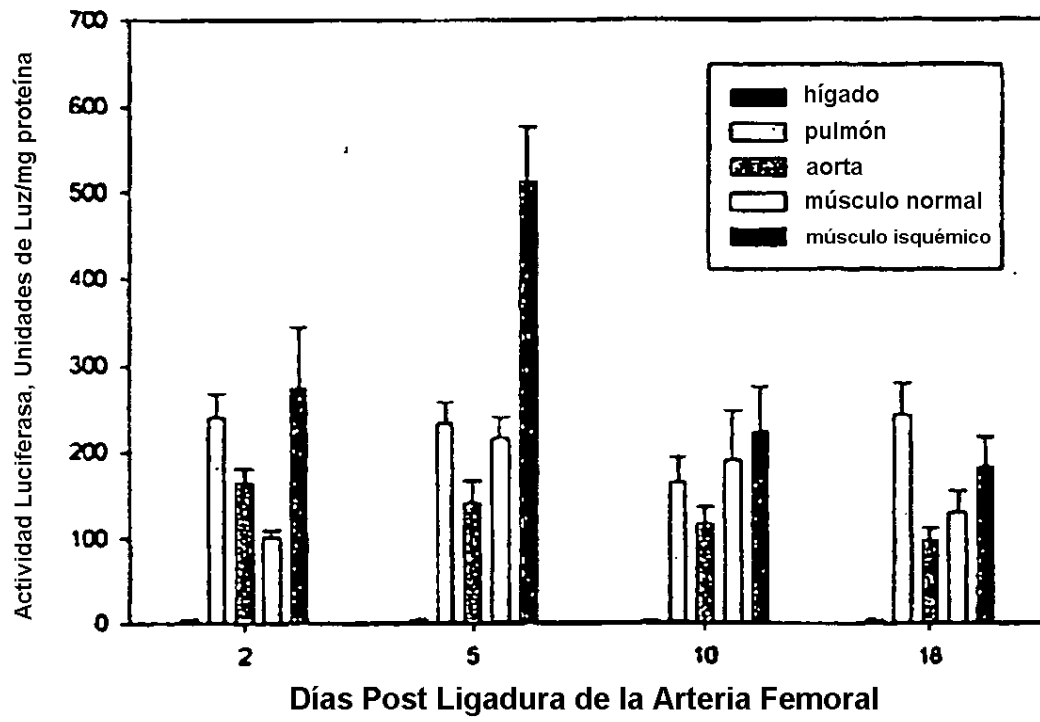


Figura 25



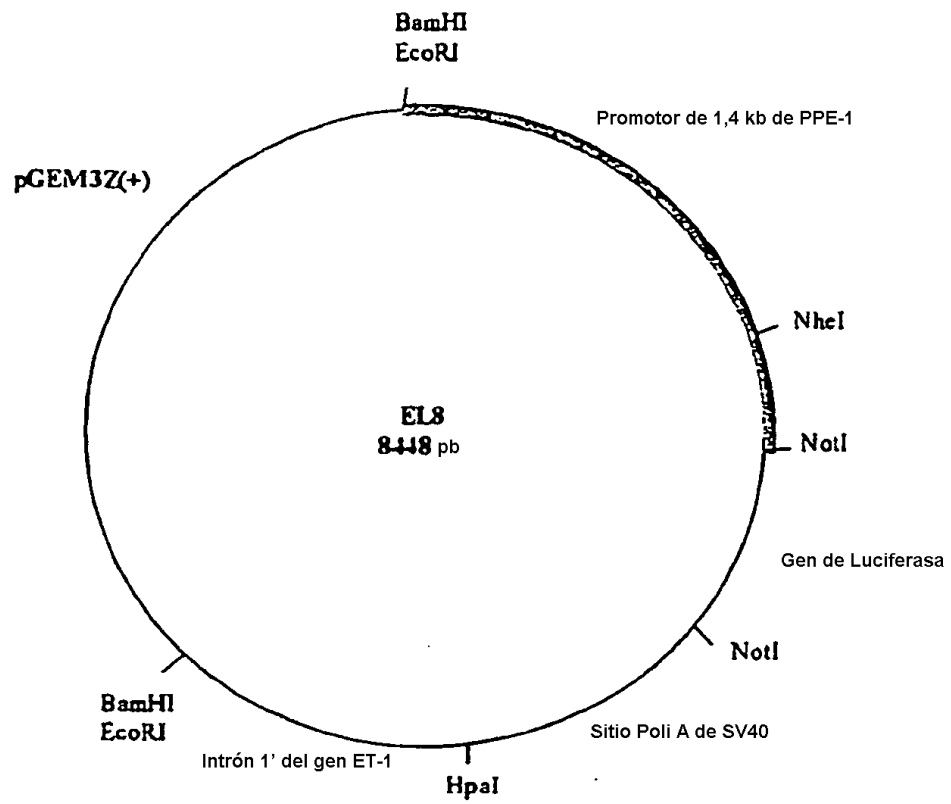


Figura 26A

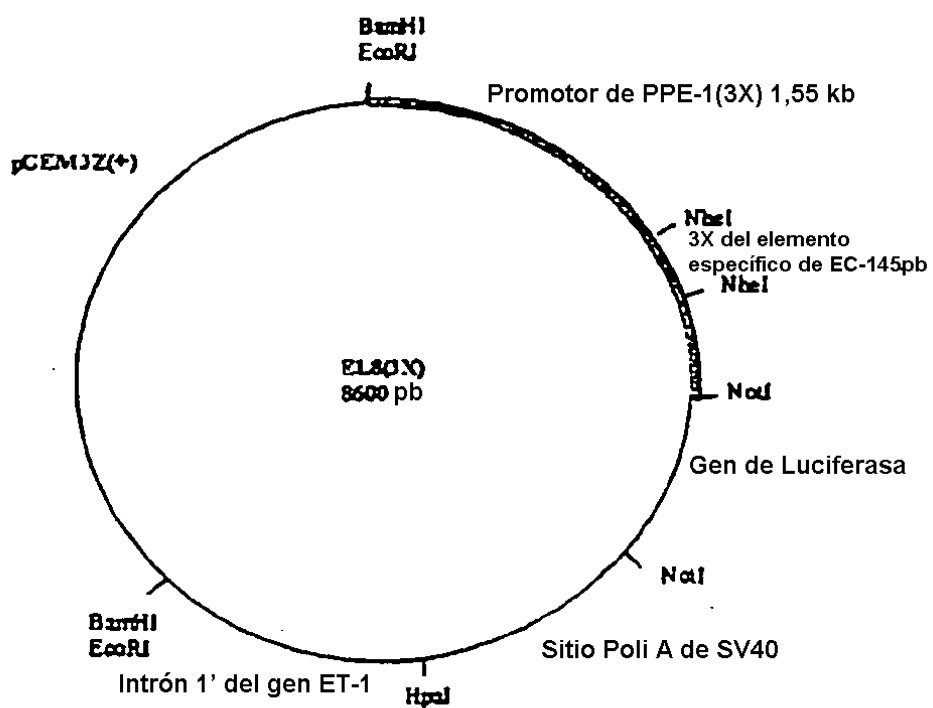


Figura 26B

Figura 27A

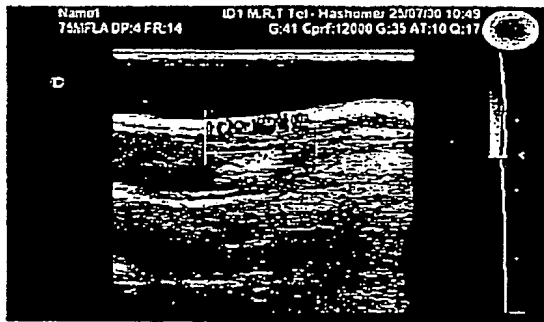


Figura 27B

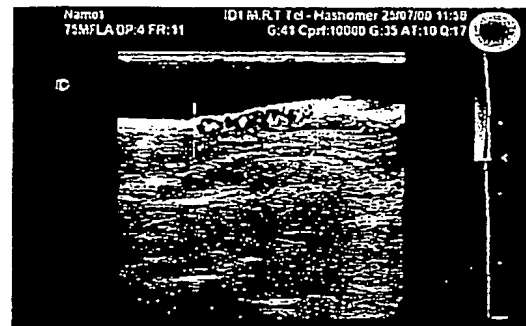
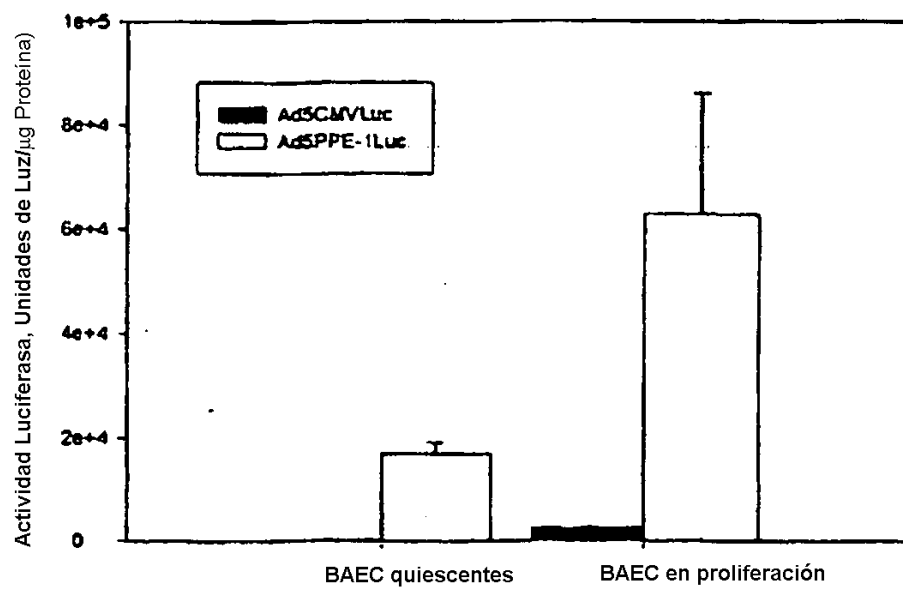


Figura 27C



Figura 27D



**Figura 28**

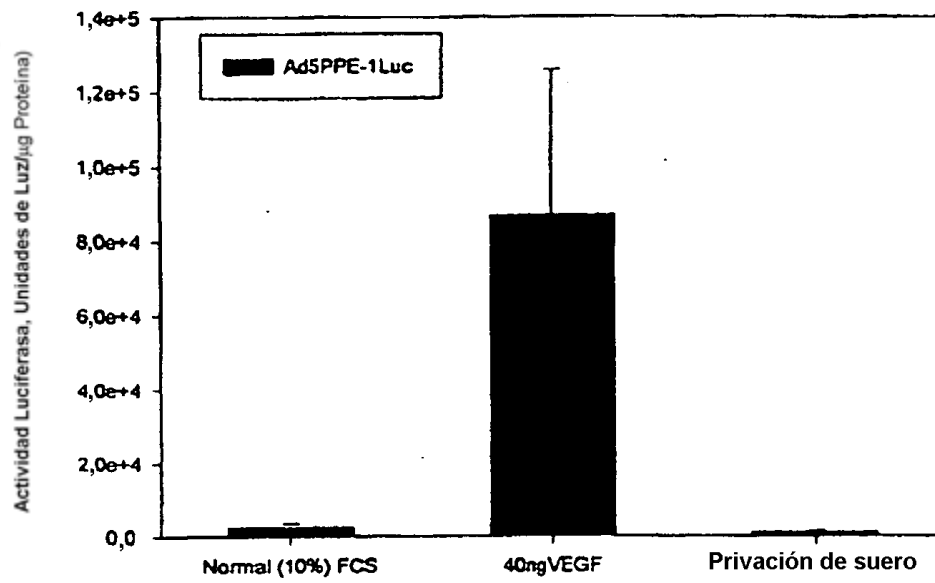


Figura 29

FIGURA 30A

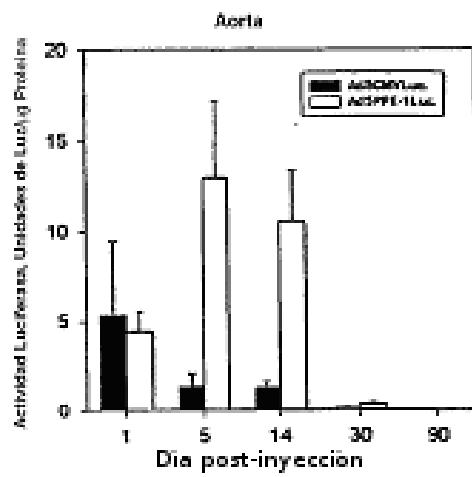


FIGURA 30B

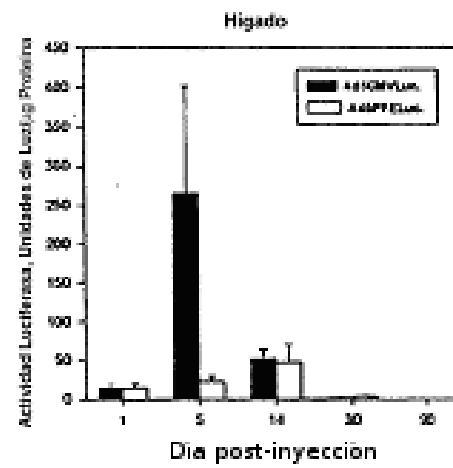


FIGURA 31A

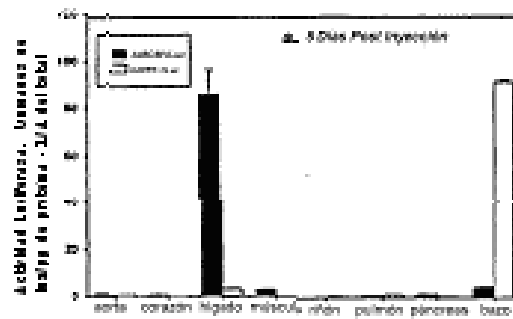


FIGURA 31B

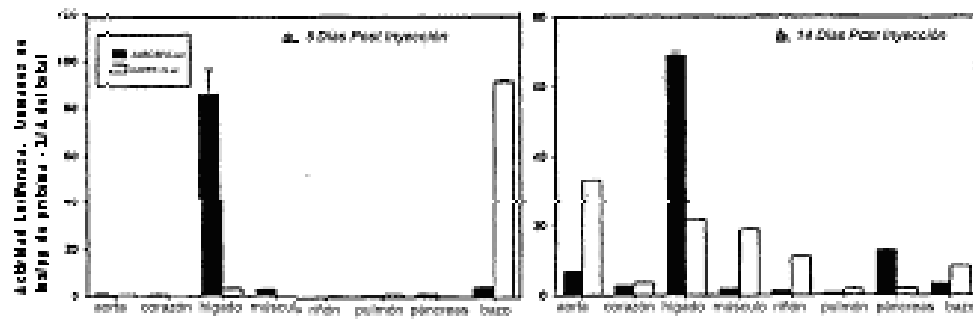


FIGURA 32



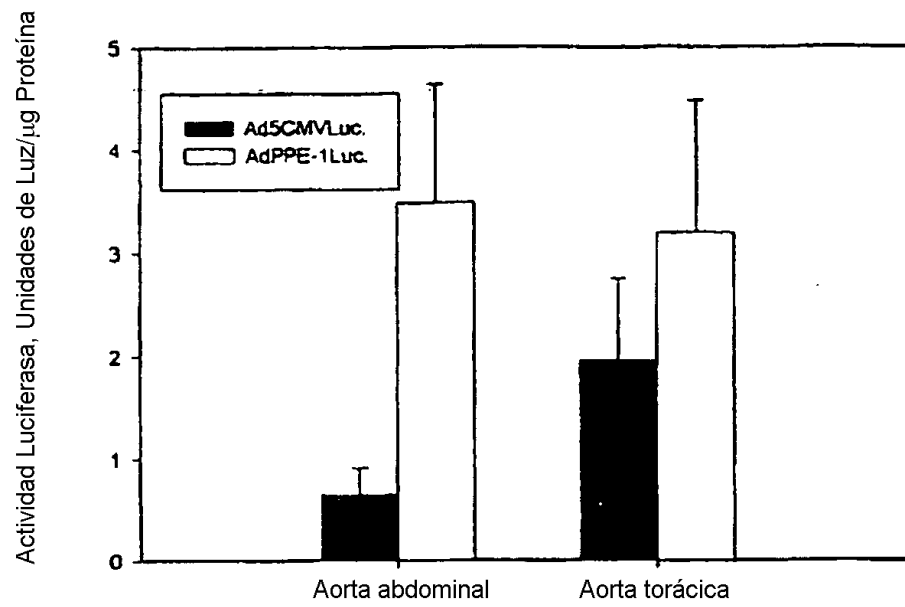
Figura 33

Figura 34

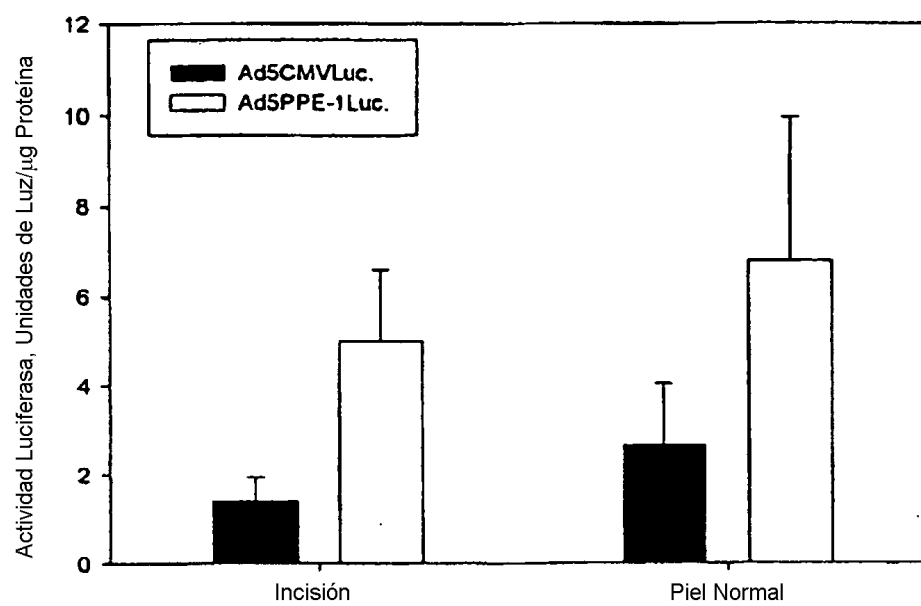


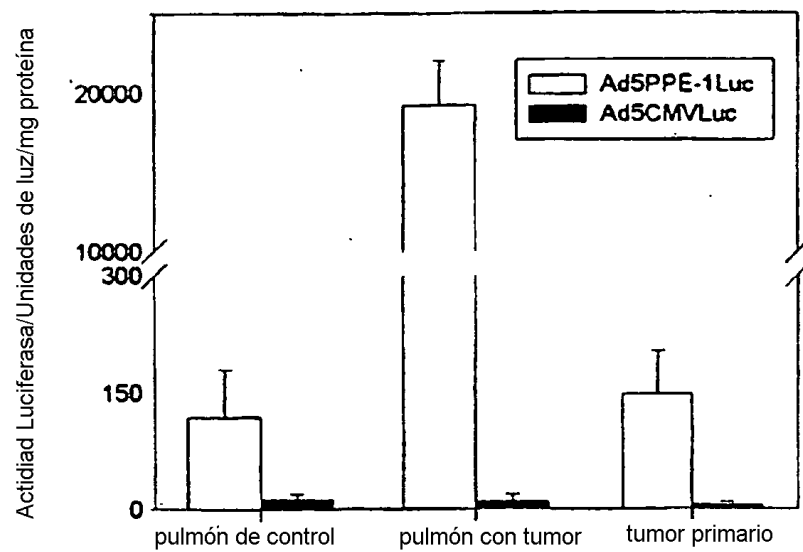
FIGURA 35

Figura 36A

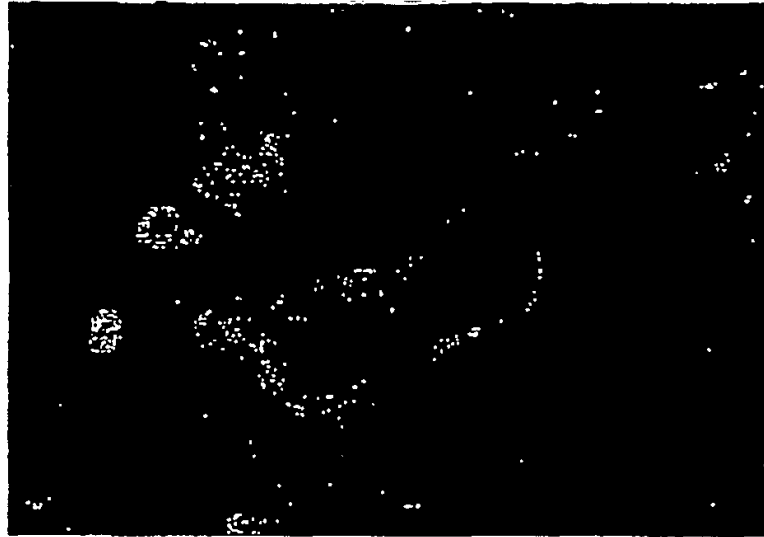
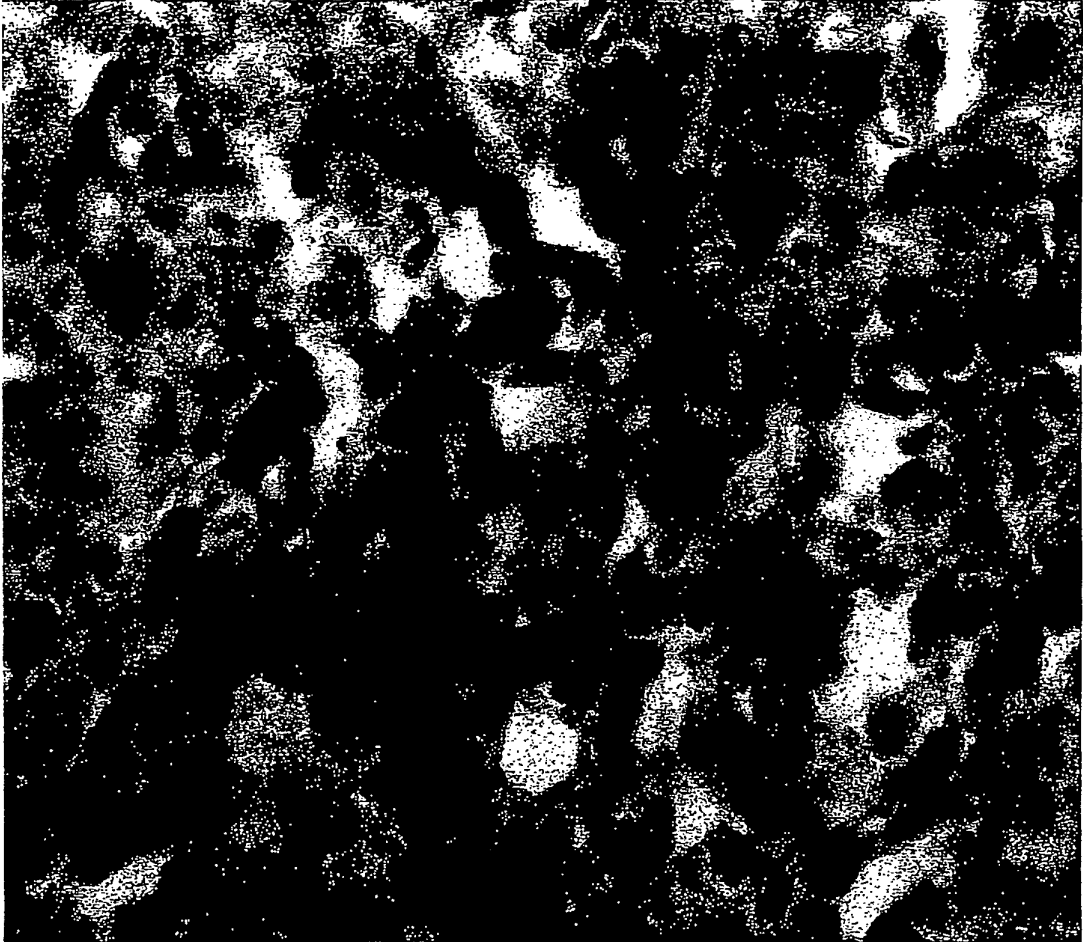


Fig. 36B



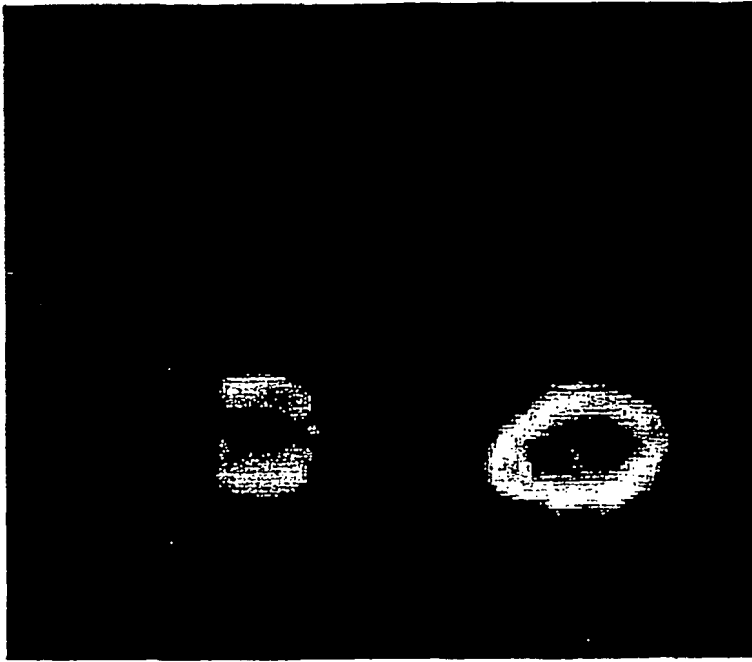


Fig. 36C

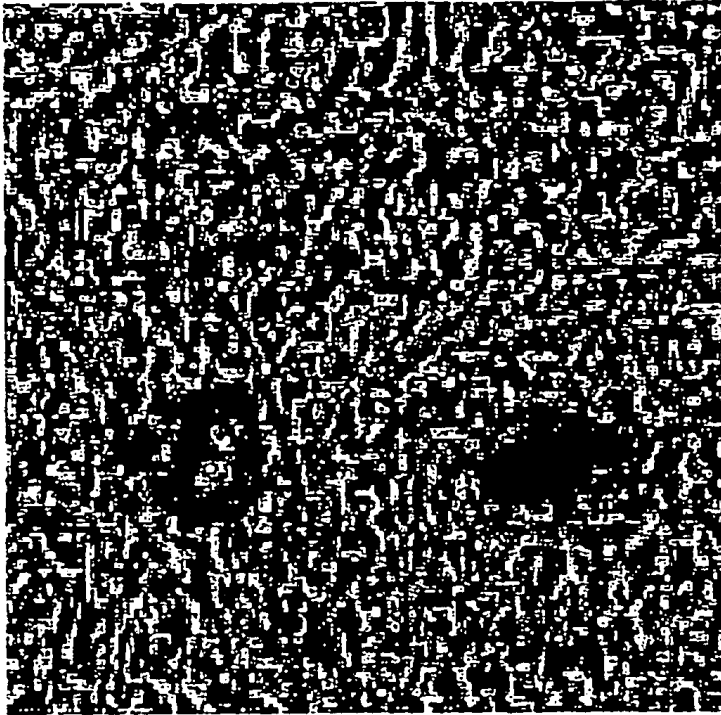


Fig. 36D

Figura 37

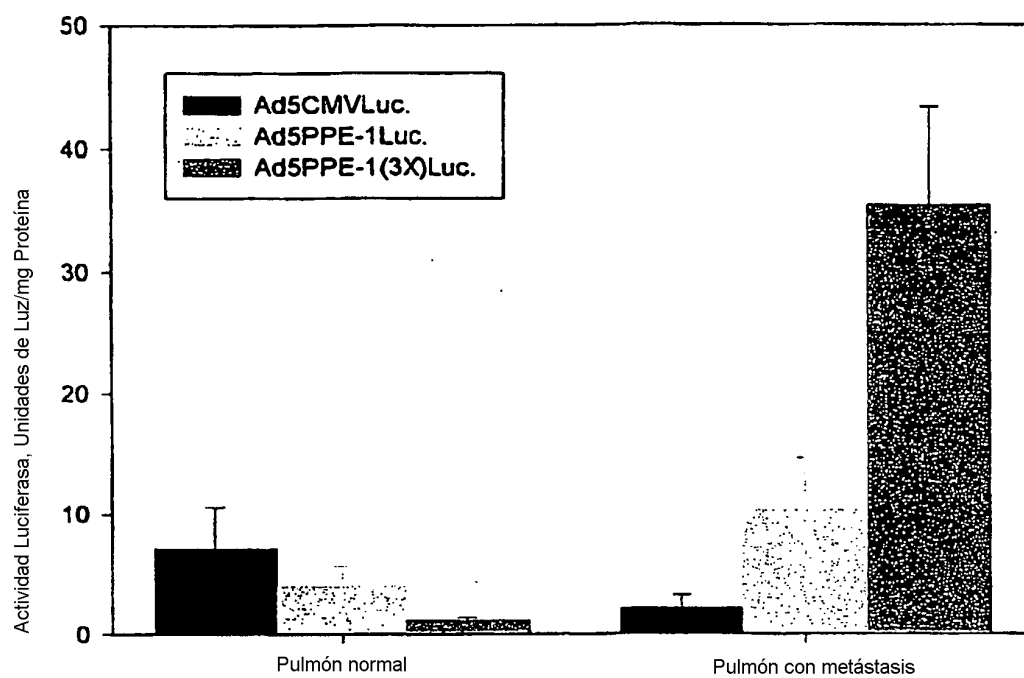


FIGURA 38

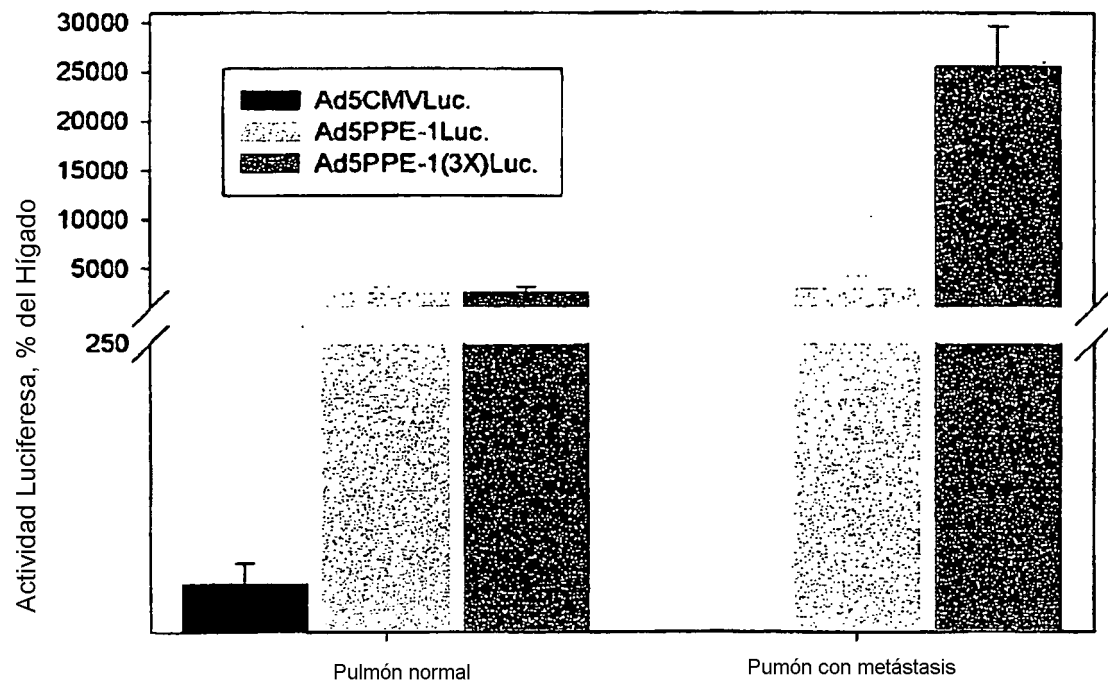


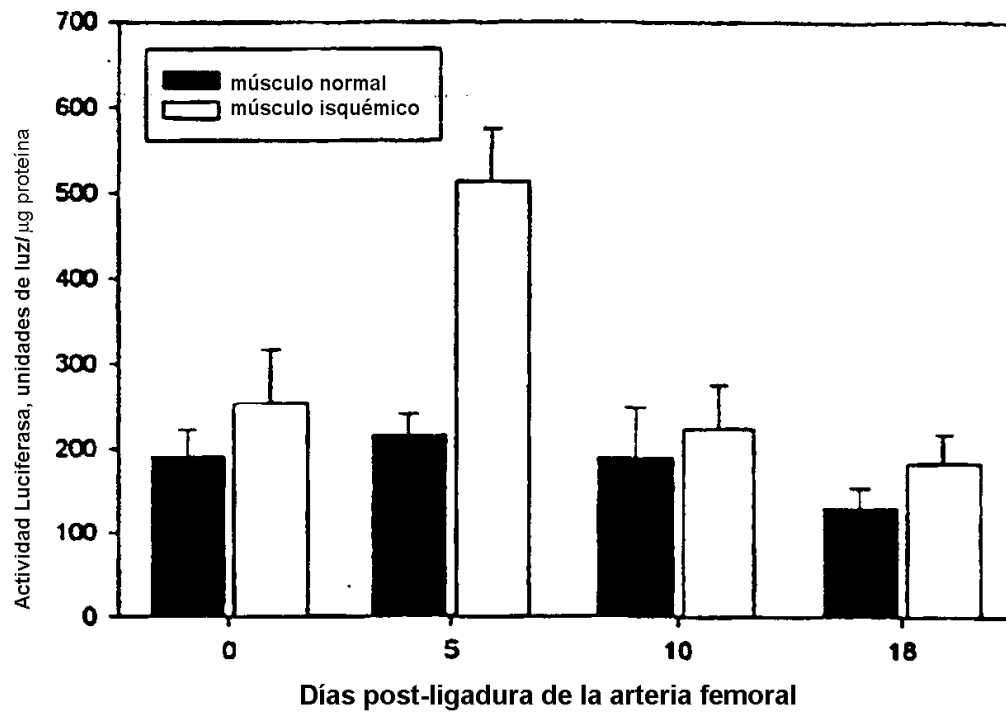
FIGURA 40

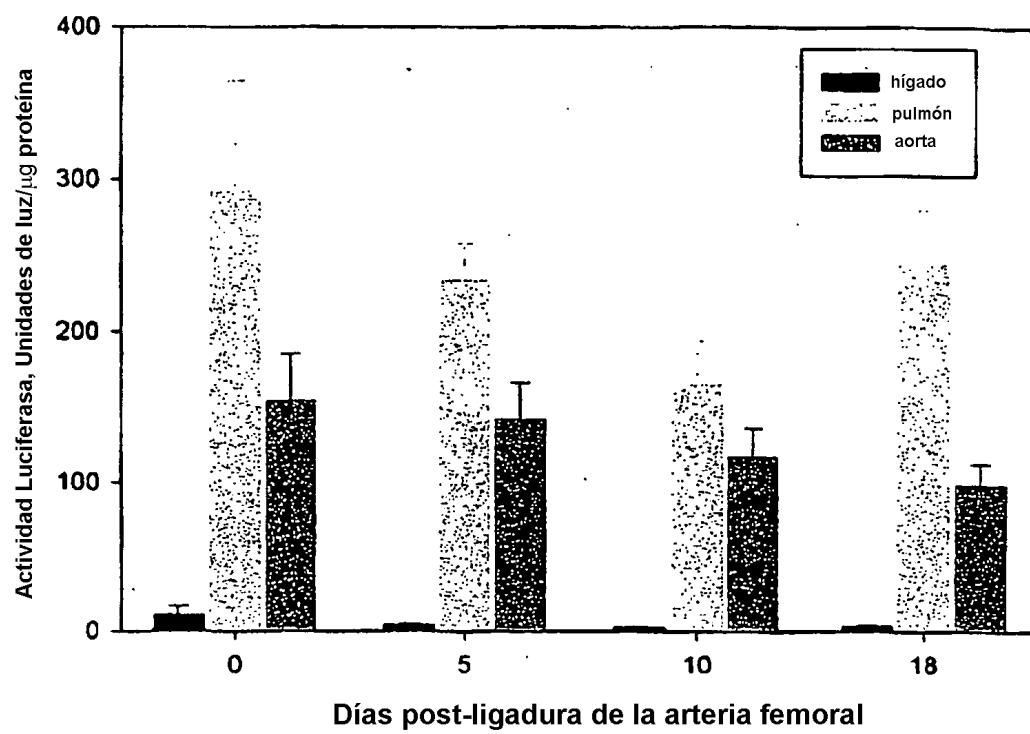
FIGURA 41

Figura 42

