

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 550 250**

51 Int. Cl.:

C07H 21/04 (2006.01)

C12N 15/00 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.04.2008 E 13151932 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.06.2015 EP 2615102**

54 Título: **Promotor inducible por especies reactivas del oxígeno y vector que lo comprende**

30 Prioridad:

27.04.2007 AR P070101837

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.11.2015

73 Titular/es:

**INIS BIOTECH LLC (25.0%)
203 NE Front Street, Suite 101
Milford, Kent County, DE 19963, US;
FUNDACIÓN INSTITUTO LELOIR (25.0%);
COMISIÓN NACIONAL DE ENERGÍA ATÓMICA
(CNEA) (25.0%) y
CONSEJO NACIONAL DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS Y TÉCNICAS (CONICET) (25.0%)**

72 Inventor/es:

**POLICASTRO, LUCIA;
DURAN, HEBE y
PODHAJCER, OSVALDO**

74 Agente/Representante:

ZEA CHECA, Bernabé

ES 2 550 250 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**PROMOTOR INDUCIBLE POR ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO Y VECTOR QUE LO
COMPRENDE****AREA DE LA INVENCION**

5 La presente invención se relaciona con el campo de la terapia génica. En particular la presente invención se refiere a un promotor que comprende una secuencia de ADN, capaz de dirigir la expresión de un gen de interés, particularmente en una célula tumoral. Más particularmente, la presente invención se refiere a promotores inducibles por especies reactivas del oxígeno, que pueden ser utilizados para dirigir la expresión de un gen de interés, tal como un gen terapéutico, o un gen reportero para uso en diagnóstico por imágenes.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Las especies reactivas del oxígeno (EROs, o ROS, Reactive Oxygen Species, de sus siglas en inglés) tales como el anión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (OH^\cdot), son generadas como productos del metabolismo aeróbico normal de las células. En condiciones fisiológicas existe un equilibrio entre la velocidad de generación y la velocidad de disipación de las ROS. Cuando la velocidad de disipación disminuye o la velocidad de generación aumenta, la célula entra en un estado prooxidante o de estrés oxidativo. El aumento de ROS está asociado con numerosas patologías, tales como la arteriosclerosis, enfermedades cardiovasculares, artritis reumatoide, desórdenes neurodegenerativos y cáncer (*Valko M et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. Int J Biochem Cell Biol 39(1):44-84, 2007*).

15

Numerosas evidencias experimentales vinculan a las ROS con la etiología del cáncer, tanto por su capacidad mutagénica, como por su participación en vías de transducción de señales relacionadas con la inducción de proliferación, angiogénesis, migración y metástasis (*Wu W. The signaling mechanism of ROS in tumor progression. Can Met Rev 25:695-705, 2006*). Evidencias bibliográficas demuestran que un estado de estrés oxidativo permanente podría estar relacionado con la aparición del fenotipo maligno (*Halliwell B. Oxidative stress and cancer: have we moved forward? Biochem, 402(1):1-11, 2007*). Se ha demostrado una alta producción de H_2O_2 en diferentes tipos de cáncer, incluyendo melanoma, neuroblastoma, cáncer de mama, colon y páncreas (*Szatrowski, T., Nathan, C. Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. Cancer Res. 51: 794-798, 1991*).

20

Se ha demostrado que existe una asociación entre el aumento de la malignidad celular y el aumento en la producción de radicales libres (*Polícastro L., Molinari B., Larcher F., Blanco P., Podhajcer O.L., Costa C. S., Rojas P., Durán H. Imbalance of antioxidant enzymes in tumor cells and inhibition of proliferation and malignant features by scavenging hydrogen peroxide. Mol Carcinog. 39(2): 103-13, 2004*). A estas evidencias experimentales se agregan estudios que muestran altos niveles de ROS en varios tipos de tejidos cancerosos comparados con sus contrapartes normales (*Toyokuni S. et al. Persistent oxidative stress in cancer. FEBS Lett. 358: 1-3, 1995*).

25

La terapia génica representa una estrategia terapéutica promisoría, que consiste en la introducción de secuencias genéticas en células receptoras, a fin de reemplazar el material genético defectuoso o de conferir una nueva actividad celular. Actualmente es uno de los más importantes desarrollos que están teniendo lugar en medicina. A fin de modificar un tipo de célula o tejido específicos, los genes terapéuticos deben ser administrados eficientemente a la célula, de modo que el gen se exprese en el nivel apropiado y durante un período de tiempo suficiente. Uno de los requisitos de mayor relevancia para el potencial uso de genes

30

40

terapéuticos en cáncer –así como en otras enfermedades también- es la selectividad de expresión del gen terapéutico.

El uso de promotores de genes que estén expresados diferencialmente en el tejido tumoral respecto del tejido normal es una de las formas de otorgar esa especificidad (Sadeghi H and Hitt M. *Transcriptionally targeted adenovirus vectors. Curr Gene Ther* 5(4):411-427, 2005).

Sin embargo, la expresión de genes altamente expresados en el tejido canceroso suele ser heterogénea entre las células de un mismo tumor y aún más entre los distintos tumores. Una forma de abordar esta problemática es utilizar secuencias promotoras que respondan a una característica diferencial del entorno maligno. En relación a esto, algunas propiedades del microambiente tumoral, tales como la hipoxia, el consumo de glucosa, los entornos ácidos y la angiogénesis aumentada, han sido explorados como características distintivas de los tumores. La presencia de motivos de ADN respondedores a estas características se han evaluado como posibles promotores específicos de cáncer para dirigir la expresión de genes terapéuticos (Xu G. et al. *Strategies for enzyme/prodrug cancer therapy. Clin. Cancer Res.* 7: 3314-3324, 2001). Por ejemplo, varios trabajos han demostrado que la hipoxia puede ser usada para la expresión diferencial de genes, utilizando elementos respondedores a bajas tensiones de oxígeno denominados elementos respondedores a hipoxia (HRE, Hypoxia Responsive Elements) (Shibata T, et al. *Development of a hypoxia-responsive vector for tumor specific gene therapy. Gene Ther.* 7: 493-498, 2000). Sin embargo, evidencias más recientes indican que las regiones hipóxicas no están homogéneamente distribuidas en el tumor, limitando el uso de HRE (Ballinger J. *Imaging hypoxia in tumor. Semin Nucl Med.* 31(4):321-9, 2001).

En estudios recientes, se ha descrito la presencia de secuencias promotoras sensibles a las especies reactivas del oxígeno en los promotores de varios genes. Entre los genes que se encuentran altamente expresados en cáncer y que poseen motivos sensibles a ROS en sus promotores podemos mencionar al del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF, del inglés Vascular Endotelial Growth Factor), el del gen de respuesta temprana a la irradiación-1 (EGR-1, Early Growth Response-1 gene) y el promotor de la metaloproteasa de matriz-1 (MMP-1, Matriz Metaloproteinase 1). El promotor del VEGF posee una región rica en residuos GC que es regulable por variaciones en el estado redox celular (Schafer G. et al. *Oxidative stress regulates vascular endothelial growth factorA gene transcription through Sp1 and Sp3 dependent activation of two proximal GC-rich promoter elements. JBC.* 278: 8190-98, 2003). Por otro lado, el promotor de EGR-1 posee motivos ricos en las bases A y T, que forman motivos de 10 pb de bases CC(A/T)₆GG o dominios CArG (Datta R. et al. *Reactive oxygen intermediates target CC(A/T)₆GG sequences to mediate activation of the early growth response 1 transcription factor gene by ionizing radiation. Proc.Natl.Acad.Sci.*90:2419-22, 1993). Finalmente el promotor de la MMP-1, posee una región comprendida entre las bases -2002 y -1546 que mostró respuesta a la presencia de ROS (Nelson K. et al. *Elevated Sod2 activity augments matrix metalloproteinase expression: evidence for involvement of endogenous hydrogen peroxide in regulating metastasis. Clin. Cancer Res.* 9: 424-432, 2003).

El documento de patente US 2003/0082685 de Weichselbaum y colaboradores divulga métodos terapéuticos para diversos tipos de cáncer y enfermedades hiperproliferativas, los cuales comprenden la expresión de un gen terapéutico dirigida por el promotor de EGR-1. Se indica que el método terapéutico comprende exponer la célula a radiación ionizante, induciendo al promotor EGR-1 que por lo tanto dirige la expresión de los genes bajo su control.

La patente US 5.830.880 de Sedlacek y colaboradores divulga un constructo de ADN para la profilaxis o terapia de enfermedades tumorales que comprende una secuencia activadora, un módulo promotor regulado

por el ciclo celular y una secuencia de ADN que codifica para una sustancia antitumoral, tal como un inhibidor de la angiogénesis, un agente citostático o una enzima. Se utiliza el promotor completo de VEGF, evaluándose la respuesta a entornos de hipoxia (baja tensión de oxígeno) de motivos HRE comprendidos en el promotor VEGF. Los motivos HRE no co-localizan con los motivos ROS-RE (del inglés Reactive Oxygen Species-Responsive Elements).

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

Koshikawa y colaboradores (Cancer Res. 60: 2936–2941, 2000) divulgan el uso del promotor completo de VEGF, que comprende el sitio HRE, el cual expuesto a condiciones de hipoxia dirige la expresión de HSV-TK en células de carcinoma pulmonar, donde su uso incrementa la regresión tumoral. Los motivos HRE no co-localizan con los motivos ROS-RE.

La solicitud de patente US 2001/0006954 de Weichselbaum y colaboradores divulga una molécula de ADN que comprende el gen del factor de necrosis tumoral alfa (y otros genes terapéuticos como citoquinas, toxinas, supresores tumorales, etc.) bajo el control transcripcional de los dominios CARG del promotor de EGR-1 que son inducibles por radiación ionizante.

RESUMEN DE LA INVENCION

1: Un promotor inducible por especies reactivas del oxígeno (ROS), consistiendo el promotor en un promotor quimera que contiene un elemento E6 que se encuentra en la región proximal del promotor del gen EGR-1 (SEQ ID NO: 2) distanciado de un elemento VE del promotor de VEGF (SEQ ID NO: 1) por una secuencia espaciadora.

2: El promotor de acuerdo con 1, en donde el promotor quimera contiene el elemento E6 distanciado de un elemento VE por una secuencia espaciadora de entre aproximadamente 6 y aproximadamente 200 pares de bases.

3: El promotor de acuerdo con 2, en donde la secuencia espaciadora está seleccionada a partir de 6 pares de bases, 20 pares de bases y 40 pares de bases.

4: El promotor de acuerdo con 1, en donde el promotor quimera es 5'E6(40)VE3' (SEQ ID NO: 12).

5: Un vector que comprende un promotor inducible por especies reactivas del oxígeno (ROS), consistiendo el vector en un promotor quimera que contiene un elemento E6 que se encuentra en la región proximal del promotor del gen EGR-1 (SEQ ID NO: 2) distanciado de un elemento VE del promotor de VEGF (SEQ ID NO: 1) por una secuencia espaciadora.

- 6: El vector de acuerdo con 5, en donde el promotor quimera contiene un elemento E6 distanciado de un elemento VE por una secuencia espaciadora de entre aproximadamente 6 y aproximadamente 200 pares de bases.
- 7: El vector de acuerdo con 6, en donde la secuencia espaciadora está seleccionada a partir del grupo de 6
5 pares de bases, 20 pares de bases y 40 pares de bases.
- 8: El vector de acuerdo con 5, en donde el promotor quimera es 5'E6(40)VE3' (SEQ ID NO: 12).
- 9: El vector de acuerdo con uno cualquiera de 5 a 8, que además comprende un gen de interés, operativamente ligado a dicha secuencia promotora.
- 10: El vector de acuerdo con 9, en donde el gen de interés es un gen humano terapéutico.
- 10 11: El vector de acuerdo con 8, que comprende el promotor quimera 5'E6(40)VE3' (SEQ ID NO: 12) y un gen humano terapéutico operativamente ligado a dicha secuencia promotora.
- 12: El vector de acuerdo con 10, en donde dicha secuencia promotora dirige la expresión de dicho gen en células tumorales.
- 13: El vector de acuerdo con 10, en donde dicho gen humano terapéutico es un gen suicida.
- 15 14: El vector de acuerdo con 9, en donde el gen expresa proteínas detectables mediante sistemas ópticos para el monitoreo por imágenes de tejido.
- 15: El vector de acuerdo con 5, en donde el vector está seleccionado a partir de un vector viral y un vector no viral.
- 16: Una composición farmacéutica que comprende un vector de acuerdo con cualquiera de 5 a 15, en un
20 vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 17: La composición de acuerdo con 16, que además comprende una droga quimioterapéutica.
- 18: La composición farmacéutica de acuerdo con 16, en donde el vehículo es una célula.
- La presente invención proporciona un promotor inducible por especies reactivas del oxígeno (ROS), capaz de dirigir la expresión de un gen de interés.
- 25 En otro aspecto de la invención, el vector puede ser utilizado en terapia génica, particularmente para el tratamiento de enfermedades humanas con alta actividad de radicales libres, tales como el cáncer y la artritis, entre otras.
- El vector de la presente invención también puede ser utilizado en el diagnóstico, por ejemplo para el monitoreo por imágenes de la expresión de genes en regiones de altos niveles de actividad de ROS. En
30 particular el vector se puede utilizar en monitoreo por bioluminiscencia para detectar la presencia de un tumor. Se encuentra bien documentado que la neovascularización juega un papel preponderante en el crecimiento, invasión y dispersión metastásica de tumores sólidos, y las drogas antiangiogénicas podrían potencialmente ser utilizadas como terapias anticáncer. Utilizando genes que expresan proteínas que generan fluorescencia o bioluminiscencia, cuya actividad se encuentre regulada por los promotores de la
35 presente invención, particularmente el elemento VE o el promotor quimera 5'E6(40)VE3', es posible diagnosticar y hacer un seguimiento de la presencia de tumores en tejidos, mediante sistemas ópticos de imagen *in vivo* que detectan la emisión de luz, generando imágenes bidimensionales. Entre las proteínas que pueden ser utilizadas para generar bioluminiscencia o fluorescencia se pueden mencionar: proteína verde fluorescente (GFP), proteína roja fluorescente (RFP), luciferina (LUC), etc.
- 40 En aún otro aspecto de la invención, dicho vector se puede incluir dentro de una célula, que puede ser utilizada como vehículo.

La invención también comprende el promotor quimera que contiene un elemento E6 distanciado de un elemento VE por una secuencia de entre aproximadamente 6 y aproximadamente 200 pares de bases, solos o asociados con otras secuencias, para dirigir la actividad de cualquier gen humano terapéutico o no terapéutico, así como su uso en terapia génica y en métodos de diagnóstico.

5

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La **Figura 1** muestra las imágenes *in vivo* tomadas con microscopio confocal de líneas celulares tumorales vs sus respectivas contrapartes normales incubadas con DCFH-DA: **(a)** LoVo vs CDD-841 CoN (colon), **(b)** MCF-7 y MCF-12D (mama), **(c)** A375N vs cultivo de melanocitos humanos normales (NHM), **(d)** WI38-VA vs WI38 (fibroblastos) En **(e)** se muestran valores promedios de la fluorescencia en las distintas líneas celulares (unidades arbitrarias).

10

La **Figura 2** muestra: **(a)** un esquema de las distintas construcciones plasmídicas que contienen un único motivo o secuencia promotora; **(b)** la actividad luciferasa de células de transfectadas por las distintas construcciones plasmídicas y tratadas con H₂O₂ generado por el sistema glucosa/glucosa oxidasa (G/GO); Como control de especificidad, las células fueron tratadas con catalasa (500U/ml). Las barras blancas corresponden a células de melanoma A375N y las barras negras corresponden a células de cáncer colorrectal LoVo. (*P < 0,001, las líneas por encima de las barras muestran los grupos que fueron comparados; #P < 0,0001, corresponde a la actividad basal de VE, vs. la actividad basal de E6 o MMP-1; ## P < 0,0001, corresponde a la actividad de VE en presencia de G/GO vs. la actividad de E6 y MMP-1 bajo las mismas condiciones).

15

20

La **Figura 3** muestra: **(a)** un esquema de las distintas construcciones plasmídicas quimeras. Los términos "S20" y "S40" significan que los espaciadores de 20 y de 40 pb, respectivamente, fueron incluidos; **(b)** la actividad luciferasa de células de transfectadas por las distintas construcciones plasmídicas quimeras y tratadas con H₂O₂ generado por el sistema glucosa/glucosa oxidasa (G/GO); como control de especificidad, las células fueron tratadas con catalasa (500U/ml); las barras blancas corresponden a células de melanoma A375N y las barras negras corresponden a células de cáncer colorrectal LoVo. (*P < 0,001 las líneas por encima de las barras muestran los grupos que fueron comparados; #P < 0,0001, corresponde a la actividad basal de E6(40)VE vs. VE; ## P < 0,0001, corresponde a la actividad de E6(40)VE en presencia de G/GO vs. VE bajo las mismas condiciones. Los datos están expresados como valores de medias ± SD de 3-7 experimentos independientes)

25

30

La **Figura 4** muestra: **(a)** la actividad luciferasa en las líneas celulares normales (WI38, CCD-841) y en las malignas o transformadas (LoVo y WI38-VA); **(b)** Niveles de ROS en células F10 y G9 tal como se evalúa mediante DCF seguido de análisis FACS; **(c)** Actividad de luciferasa en células A375N y LoVo cotransfectadas con E6(40)VE-LUC y pcDNA3-CAT o p-Cat. Las células fueron, o no, expuestas a G/GO. La actividad de luciferasa fue expresada como un cambio de inducción respecto de las células control. Los datos muestran valores de media ± SD de 3 experimentos independientes (*P < 0,01).

35

La **Figura 5 (a)** muestra la actividad antitumoral ejercida por VE-TK-pcDNA3 en células LoVo transfectadas en presencia de dos concentraciones de GCV (10 y 50 µM), evaluado mediante el ensayo de MTT y la **Figura 5 (b)** muestra la actividad antitumoral en células LoVo ejercida por VE-TK-pcDNA3 con CMV-TK-pcDNA3 transfectadas de manera transiente en presencia de GCV (10 y 50 µM) evaluado mediante el ensayo de MTT. La **Figura 6** muestra: **(a)** un Ensayo de MTT de células transfectadas de manera transiente con E6(40)VE-TK en las líneas celulares A375N y LoVo en presencia y ausencia de GCV. Como control de la especificidad del

40

transgen se transfectaron células con E6(40)VE-LUC, los datos muestran los valores de media \pm SD de 3 experimentos independientes (*P < 0,0001). **(b)** tinción con violeta cristal de células A375N y LoVo transfectadas con E6(40)VE-TK en las líneas celulares en presencia y ausencia de GCV. Como control de la especificidad del transgen se transfectaron células con E6(40)VE-LUC, **(c)** esferoides de células A375N y LoVo transfectadas de manera transiente con los plásmidos E6(40)VE-LUC o E6(40)VE-TK, en ausencia y presencia de GCV. los datos representan las mediciones de media \pm SD de 3-8 esferoides, correspondientes a uno de dos experimentos independientes. **(d)** Tumorigenicidad *in vivo* de células LoVo y A375N transfectadas de manera transiente con E6(40)VE-TK en ratones desnudos tratados intraperitonealmente con PBS o con GCV (50mg/ml) todos los días durante los primeros 10 días luego de la inoculación; (*P<0,0002 para el modelo de melanoma) fotografías tomadas al día 50.

La **Figura 7** muestra células A375N y LoVo transfectadas de manera transiente con E6(40)VE-TK en presencia o ausencia de GCV tratadas o no con GCV en combinación con **(a)** radiación ionizante o (**P<0,001, **P<0,01) **(b)** drogas quimioterapéuticas Dx (0,5 μ M) o Bleo (20 μ M) y expuestas en presencia o ausencia de 10 μ M o 50 μ M de GCV La inhibición del crecimiento fue medida mediante el ensayo de MTT y la "fracción de crecimiento" se refiere a la inhibición observada en comparación con las células no tratadas (**P<0,001) **(c)** El crecimiento de esferoides fue medido utilizando el ensayo de MTT. Los datos muestran la media \pm SD de 3-5 mediciones dentro de un experimento representativo de dos experimentos. Cada medición incluye un esferoide de células A375N y un agrupamiento de tres esferoides para células LoVo. Recuadro: fotomicrografías (25X) de esferoides tomadas en el día 20. (*P<0,05, y **P<0,01). Los datos muestran los valores de la media \pm SD de 3 experimentos independientes y las líneas por encima de las barras indican los grupos que fueron comparados.

La **Figura 8** muestra curvas de crecimiento de tumores establecidos de LoVo y A375N tratados intratumoralmente con E6(40)VE-TK administrado por electrotransferencia; los animales fueron tratados con **(a)** PBS ip; **(b)** PBS y Dx ip; **(c)** GCV ip; y **(d)** GCV y Dx ip; el plásmido se administró en 6 aplicaciones de 50 μ g ADN / 100 μ l por tumor con 6 pulsos de 20 ms de 400V/cm los días 1, 3, 5, 7, 9 y 11. La doxorubicina (5 mg/kg) se administró intraperitonealmente los días 3, 7 y 11; el GCV (50mg/kg) o PBS i.p. diariamente durante 12 días; **(e)** fotografía de tumores de A375N tratados con E6(40)VE-TK con PBS, DX, GCV y GCV+DX.

30 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

De acuerdo con la presente invención, las construcciones de los vectores conteniendo las distintas secuencias promotoras y la secuencia del gen terapéutico deseado se realizaron mediante técnicas de ligación y restricción estándar. Los cortes de ADN en sitio específico se realizaron mediante tratamiento con enzimas de restricción apropiadas, en las condiciones indicadas por el proveedor, durante aproximadamente 3-16 horas. En general, los resultados de la restricción se verificaron por separación electroforética en geles de agarosa (0,8 - 2%) en solución TAE (40 mM de triacetato, 2mM de Na₂EDTA.2H₂O pH 8,5) utilizando bromuro de etidio y visualizados con luz UV en un trans-iluminador (Ultraviolet Products Inc., Upland, CA). Las ligaciones se realizaron mediante ADN ligasa del bacteriófago T4, siguiendo los protocolos del proveedor (New England Biolab Inc., Beverly, MA). Se utilizaron relaciones inserto:vector desde 1:1 hasta 5:1.

40 Tal como se utiliza en la presente, una "secuencia espaciadora" es una secuencia de ADN no portadora de información, sea esta del tipo estructural o codificante, para ninguna de las funciones génicas conocida en las células eucariotas, tal como por ejemplo, información estructural para el reconocimiento de factores de

transcripción o información para la codificación de aminoácidos. No obstante, una secuencia espaciadora tal como la utilizada en la presente invención, colocada artificialmente dentro del contexto de una secuencia génica funcional, puede mejorar la actividad transcripcional de la misma.

5 La selección de la longitud de la secuencia espaciadora se realiza a partir del conocimiento de que cada torsión del ADN es de aproximadamente 10 pares de bases, siendo preferido utilizar secuencias espaciadoras en múltiplos de 10. La regulación de la expresión génica requiere de la interacción de distintos factores de transcripción en las regiones promotoras. El ensamblado eficiente de los distintos factores de transcripción depende del distanciamiento óptimo entre las proteínas interactuantes. Esta distancia depende de cada caso particular, pudiendo rondar entre 20-200 pb (Eukaryotic transcriptional regulatory complexes: cooperativity from near and afar, Ogata K Curr Opin in Structural Biology 13:4048, 2003). En algunos casos, esta distancia puede ser muy precisa y en otros casos muy flexible (18-50 pb) (Flexible promoter architecture requirements for coactivator recruitment, Chiang D et al BMC Molecular Biology, 7:16 2006).

15 En general, tal como se utiliza en la presente, "un gen terapéutico" significa una secuencia de ADN que codifica una secuencia de aminoácidos o proteína, capaz de ejercer un efecto terapéutico sobre las células hospedantes. Preferiblemente, de acuerdo con una realización de la presente invención, las células hospedantes son células de tejidos tumorales o afectados por otras enfermedades humanas con alta actividad de radicales libres, por ejemplo, en artritis. Las células tumorales son particularmente células de melanoma, células de mama, células de colon, células de cervix, neuroblastomas.

20 La introducción del vector que comprende el promotor de la presente invención en las células hospedantes podrá llevarse a cabo mediante cualquier constructo e incluye plásmidos, virus de ADN como adenovirus, retrovirus, lentivirus, así como moléculas de nucleótidos aisladas. También puede utilizarse transferencia mediada por liposomas.

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

30 Se utilizó un ensayo de Student a dos colas para comparar dos conjuntos de datos. Se utilizó análisis de varianza (ANOVA) de una vía para comparar tres o más conjuntos de datos. Los ensayos de Tukey o Sheffe fueron utilizados como ensayos *post hoc*. El ensayo Welch y Games-Howells como ensayos post-hoc fueron utilizados cuando las varianzas eran heterogéneas. Cuando no fue posible aplicar el ensayo paramétrico se utilizó el ensayo Kruskal-Wallis con el Man Whitney como ensayo post-hoc. Un *P* valor menor a 0,05 fue considerado significativo.

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

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Evaluación de la producción de especies reactivas del oxígeno en líneas normales y tumorales humanas.

40 Se evaluaron los niveles de producción de las especies reactivas del oxígeno de manera comparativa en líneas celulares tumorales y en líneas celulares normales. Se utilizó el ensayo de DCFH-DA (2',7'-dichlorodihidrofluoresceína diacetato, Molecular Probes) que permite evaluar los niveles intracelulares de ROS.

La DCFH-DA difunde a través de la membrana celular, una vez internalizada se vuelve impermeable a la membrana plasmática debido a que es metabolizada por las esterasas intracelulares que remueven el grupo diacetato. En presencia de ROS, la DCFH es oxidada a DCF (diclorofluoresceína), que puede ser detectada mediante la emisión de fluorescencia a 525 nm al ser excitada a 488 nm.

5 Se confirman las evidencias experimentales previas que vinculan el aumento de ROS en el cáncer, mediante la evaluación comparativa de la producción de ROS en líneas celulares tumorales y en líneas celulares normales humanas.

Para ello se evaluaron los siguientes pares comparativos:

- 10 a) La línea celular LoVo (cáncer de colon, ATCC N° CCL-229) y CCD-841 (colon normal, ATCC N° CRL-1790).
- b) La línea celular tumoral MCF-7 (cáncer de mama, ATCC N° HTB-22) y la línea celular MCF-12 A (mama normal, ATCC N° CRL-10782).
- c) La línea celular WI38-VA (fibroblastos fetales pulmonares transformados, ATCC N° CCL-75.1) y la línea celular WI38 (fibroblastos fetales pulmonares normales, ATCC N° CCL-75).
- 15 d) La línea celular tumoral de melanoma A375N y cultivo primarios de melanocitos de prepucio humano (NMH). Ambos provistos por la Dra. Estela Medrano (*Houston, Texas*)

Las células fueron sembradas en portaobjetos en placas de 35 cm de diámetro, a las 24 h se incubaron con 20 µM de DCFH-DA (Sigma-Aldrich) durante 15 min a 37°C y luego fueron lavadas 2 veces con PBS. Los portaobjetos fueron trasladados en un recipiente conteniendo PBS y se tomaron imágenes de por lo menos 20 50 células al azar con microscopio confocal (488 nm excitación y 515-545 nm emisión). El experimento se repitió de manera independiente por lo menos dos veces para cada línea celular.

Las Figuras 1 (a) a (d) muestran la producción de ROS en las líneas celulares mencionadas anteriormente, comparadas de acuerdo a su origen tisular. Se observa una mayor producción de H₂O₂ en las líneas cancerosas en comparación con las líneas normales.

25 La Figura 1 (e) representa los valores promedios de aproximadamente 50 células de cada línea celular, donde se observa que las líneas tumorales poseen niveles de producción de ROS de 2-5 veces mayores que las líneas normales.

30 **Ejemplo 2: Obtención de las secuencias promotoras que responden a especies reactivas del oxígeno (ROS).**

Se eligieron secuencias promotoras que previamente mostraron respuesta a especies reactivas del oxígeno (ROS). Se eligieron 3 secuencias que respondían a ROS y que además pertenecían a promotores de genes altamente expresados en las células cancerosas. Las secuencias elegidas fueron: la región -80 a -50 del VEGF, denominado en la presente como elemento VE (SEQ ID NO. 1); un motivo que se encuentra en la 35 región proximal del promotor del gen EGR-1, designado en la presente como elemento E6 (SEQ ID NO. 2); y la región -2000 a -1546 del promotor de la MMP-1, designado en la presente como elemento MMP-1 (SEQ ID NO. 3).

El elemento VE contiene tres regiones ricas en secuencias GC y previamente mostró respuesta a H₂O₂ exógeno en células de cáncer de estómago (*Schafer G. et al. Oxidative stress regulates vascular endothelial growth factorA gene transcription through Sp1 and Sp3 dependent activation of two proximal GC-rich promoter elements. JBC. 278: 8190-98, 2003*). Este elemento se obtuvo mediante la hibridización de los 40 siguientes oligonucleótidos sintéticos complementarios:

5'CGGGGCGGGCCGGGGGCGGGCGGGGTCCGGCGGGCGGAGA3' (SEQ ID NO. 4) y

5'CGCGTCTCCGCCCCGCCGGGACCCCGCCCCCGCCCCCGGTAC3' (SEQ ID NO. 5).

El elemento E6 corresponde a 6 repeticiones de un motivo rico en las bases A y T (CCATATAAGG) denominado CArG que se encuentra en el promotor del gen EGR-1 y que se obtuvo mediante la hibridización de los siguientes oligonucleótidos sintéticos:

5'CGCGTCCATATAAGGCCATATAAGGCCATATAAGGCCATATAAGGCCATATAAGGCCATATAAGGC3' (SEQ ID NO. 6) y

5'TCGAGCCTTATATGGCCTTATATGGCCTTATATGGCCTTATATGGCCTTATATGGCCTTATATGGA3' (SEQ ID NO. 7).

El elemento E6 no sólo responde a especies reactivas del oxígeno sino que también responde a radiación ionizante del tipo gama (*Datta R. et al. Reactive oxygen intermediates target CC(A/T)6GG sequences to mediate activation of the early growth response 1 transcription factor gene by ionizing radiation. Proc.Natl.Acad.Sci.90:2419-22, 1993*) y haces de neutrones (*Greco O et al. Gene therapy vectors containing CArG elements from the Egr1 gene are activated by neutron irradiation, cisplatin and doxorubicin. Cancer Gene Ther. 12(7):655-62, 2005*). En ambos casos los oligonucleótidos complementarios están flanqueados por sitios de corte para las enzimas de restricción *MluI* y *XhoI* y fueron hibridizados mediante la mezcla de 0,05 nmoles de cada uno en un volumen final de 10 µl, a 55°C durante 5 min, enfriándose gradualmente a temperatura ambiente.

El elemento MMP-1 se obtuvo mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) a partir de ADN genómico obtenido de la línea celular T47-D. Se utilizaron los siguientes cebadores específicos:

5'CGGGGTACCACAGTGTATGAGACTCTTCCAGGG3' (SEQ ID NO. 8)

y

5'CGACGCGTCACTTTCCTCCCCTCCCCTTATGGATTCCTG3' (SEQ ID NO. 9).

En este caso los oligonucleótidos están flanqueados por los sitios de restricción *MluI* y *XhoI*. Este fragmento de amplificación por PCR obtenido fue clonado en primera instancia en el vector TOPO-CR4 (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA).

Ejemplo 3: Clonación de elementos de respuesta a ROS y confirmación de la respuesta a H₂O₂.

Los productos de hibridización de los oligonucleótidos sintéticos complementarios VE y E6 y el producto de PCR MMP-1, previamente clonado en el vector TOPO-CR4, fueron clonados de manera independiente en los sitios *MluI* y *XhoI* del vector pmCMV. Este vector fue obtenido a partir de una modificación del vector pGL3-basic (Promega Corp., Madison, WI, USA) mediante el agregado de una secuencia promotora mínima proveniente del promotor CMV (del citomegalovirus) que contiene un sitio de inicio de la transcripción y una caja TATA en los sitios de restricción *XhoI* y *HindIII*. El plásmido pmCMV contiene el gen reportero de la luciferasa de la luciérnaga Firefly modificado (*Photinus pyralis*, luc+). La presencia del gen reportero luciferasa permitió cuantificar la actividad promotora basal y la respuesta a H₂O₂ exógeno. Los distintos plásmidos obtenidos se transfectaron en forma conjunta con el plásmido pRL-CMV. El plásmido pRL-CMV contiene el gen reportero de la luciferasa del celenterado Renilla (*Renilla reniformes*) bajo el promotor fuerte CMV.

Las construcciones plasmídicas obtenidas, cuyos esquemas se muestran en la Fig. 2 (a), son las siguientes:

a- VE-LUC: contiene una copia de la región promotora del VEGF. (SEQ ID NO.1)

b- E6-LUC: contiene 6 copias de la secuencia CArG (SEQ ID NO. 2)

c- MMP-1-LUC: contiene la región -2002 a -1546 del promotor de MMP-1 (SEQ ID NO.3).

Todas las clonaciones fueron comprobadas por perfiles de restricción y mediante la secuenciación automática de los vectores con cebadores universales P3 (CTAGCAAAATAGGCTGTCCCC) (SEQ ID NO. 24) y P2 (CTTTATGTTTTGGCGTCTTCCA) (SEQ ID NO. 25).

Los ensayos se realizaron en dos líneas celulares, la línea A375N (melanoma) y LoVo (cáncer de colon).

5 Las células fueron sembradas en placas de 24 pocillos con una densidad de 5×10^5 células/pocillo. A las 24 horas, las células fueron transfectadas utilizando Lipofectamine2000 (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) según las condiciones indicadas por el proveedor. Cada pocillo fue transfectado con la mezcla de 0,8 µg de los plásmidos obtenidos (VE-LUC, E6-LUC o MMP1-LUC) con 0,1 µg de plásmido pRL-CMV. Se incubaron simultáneamente la mezcla mencionada y 1 µl de Lipofectamine2000 en 50 µl de medio DMEM sin antibiótico
10 durante 5 min a temperatura ambiente. Se mezclaron estas dos preparaciones y se incubaron durante 20 min a temperatura ambiente. Se removió el medio con suero de las células, se lavó con PBS y se agregaron 200µl de DMEM alta glucosa sin suero y sin antibióticos, posteriormente se agregaron 100 µl de medio conteniendo la mezcla de lipofección y a las 4 horas se agregaron 800 µl de medio de cultivo correspondiente a cada línea celular, suplementado con SFB. Las células transfectadas fueron mantenidas durante 24 horas
15 en estufa a 37°C con 5% CO₂. Se utilizó el kit Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega Corp., Madison, WI) para el ensayo de luciferasa. Este sistema evalúa la actividad de la luciferasa Firefly y Renilla en un solo ensayo secuencial permitiendo así normalizar las medidas de actividad según los distintos niveles de transfección (*Sherf, B.A y col., Dual Luciferase Reporter Assay: An Advanced Co-Reporter Technology Integrating Firefly and Renilla Luciferase Assays. Promega Notes Magazine: 2-9, 1996*). La normalización de
20 los datos se llevó a cabo calculando las Unidades Luciferasa Relativas o RLU, estando definidas como Unidades Luciferasa Firefly/ Unidades Luciferasa Renilla.

Los datos se expresan como cantidad de inducción relativa a la actividad obtenida con el plásmido control pmCMV (conteniendo sólo el promotor mínimo). La actividad luciferasa de células transfectadas por las distintas construcciones plasmídicas y tratadas con H₂O₂ generado por el sistema glucosa/glucosa oxidasa
25 (G/GO) se muestra en la Figura 2 (b). Como control de especificidad, las células fueron tratadas con catalasa (500U/ml). Las barras blancas corresponden a células de melanoma A375N y las barras negras corresponden a células de cáncer colorrectal LoVo.

El elemento VE fue el que mostró mayor actividad transcripcional basal e inducción por H₂O₂. Los elementos MMP-1 y E6 mostraron menor actividad respecto de VE pero similar entre sí. La inducción obtenida mediante
30 el uso del sistema de glucosa/glucosa oxidasa fue específica del H₂O₂ ya que ésta fue bloqueada en presencia de catalasa exógena (Sigma-Aldrich, 500U/pocillo). Además del elemento VE, seleccionamos el elemento E6 con el fin de preparar promotores quimeras con una mejor capacidad de respuesta transcripcional e inducción por H₂O₂. El elemento E6 tiene la ventaja de tener un tamaño 10 veces menor que
35 MMP1 y por otro lado, está demostrado que responde a radiación ionizante.

Ejemplo 4: Obtención de los promotores quimera y evaluación de la respuesta a H₂O₂.

Se construyeron distintos promotores quimera conteniendo los elementos E6 y VE pero en distintas posiciones relativas respecto del punto del inicio de la transcripción. De este modo, se obtuvieron los siguientes vectores E6(6)VE-LUC (SEQ ID NO. 10), VE(6)E6-LUC (SEQ ID NO. 11) y E6(40)VE-LUC (SEQ
40 ID NO. 12).

El vector E6(6)VE-LUC (SEQ ID NO. 10) se obtuvo mediante el clonado del elemento E6 (SEQ ID NO. 2) en el vector VE-LUC (SEQ ID NO. 1) y el vector VE(6)E6-LUC (SEQ ID NO. 11) se obtuvo mediante el clonado

del elemento VE (SEQ ID NO. 1) en el vector E6-LUC (SEQ ID NO. 2). En ambos casos se obtuvieron oligonucleótidos sintéticos complementarios de la secuencia E6 (SEQ ID NO. 13 y 14) y de la VE (SEQ ID NO. 15 y 16), pero en este caso los elementos están flanqueados por los sitios de restricción *KpnI* y *MluI*. En ambos casos, los oligonucleótidos complementarios fueron hibridizados mediante la mezcla de 0,05 nmoles de cada uno en un volumen final de 10 μ l, a 55°C por 5 min y enfriándose gradualmente hasta llegar a temperatura ambiente. Posteriormente los oligonucleótidos hibridizados E6 (SEQ ID NO. 13 y 14) y VE (SEQ ID NO. 15 y 16) fueron aislados y purificados mediante corridas electroforéticas en geles de agarosa al 2% y clonados en los sitios *KpnI* y *MluI* de los plásmidos VE-LUC (SEQ ID NO. 1) y E6-LUC (SEQ ID NO. 2) respectivamente. El plásmido E6(40)VE-LUC (SEQ ID NO. 12) fue obtenido mediante el clonado de una secuencia espaciadora obtenida mediante la hibridización de los oligonucleótidos: S1 de secuencia: 5'CGCGTACCTCTTAGTACATATGAATCGATGCTAGTAGCAA3' (SEQ ID NO. 17) y S2 de secuencia: 5'CGCGTTTGCTAGCATCGATTCATATGTACTAGTA 3' (SEQ ID NO. 18) en el sitio *MluI* del plásmido E6(6)VE-LUC (SEQ ID NO. 10).

Todos los clones fueron comprobados por perfiles de restricción y mediante la secuenciación de los vectores con cebadores universales P3 (CTAGCAAATAGGCTGTCCCC) (SEQ ID NO. 24) y P2 (CTTTATGTTTTGGCGTCTTCCA) (SEQ ID NO. 25).

Se obtuvieron los siguientes plásmidos:

- a) E6(6)VE-LUC: contiene el elemento E6 separado a una distancia de 6 pares de bases respecto de VE (SEQ ID NO. 10)
- b) VE(6)E6-LUC: contiene el elemento VE separado a una distancia de 6 pares de bases respecto de E6 (SEQ ID NO. 11).
- c) E6(40)VE-LUC: contiene el elemento E6 separado a una distancia de 40 pares de bases respecto de VE (SEQ ID NO. 12).

Las construcciones de los plásmidos a, b y c anteriormente mencionados, se muestran en forma esquemática en la Figura 3 (a).

Se realizaron ensayos de evaluación de la actividad de los promotores quimera obtenidos y se comparó la actividad basal y la inducción con H₂O₂ con respecto al vector VE-LUC (SEQ ID NO. 1). Estos experimentos se realizaron de la misma manera que lo detallado en el Ejemplo 3, utilizándose las líneas A375N (melanoma) y LoVo (cáncer de colon). Como control de especificidad, las células fueron tratadas con catalasa (500U/ml). Los resultados se muestran en la Figura 3 (b) en donde las barras blancas corresponden a células de melanoma A375N y las barras negras corresponden a células de cáncer colorrectal LoVo.

Tal como se observa en la Figura 3 (b) los plásmidos E6(6)VE-LUC (SEQ ID NO. 10) y VE(6)E6-LUC (SEQ ID NO. 11) mostraron menor actividad que el vector VE-LUC (SEQ ID NO. 1) lo cual podría deberse a una posible interferencia entre los factores de transcripción que se unen a esos elementos, razón por la cual se seleccionó la construcción en la cual los elementos E6 y VE están distanciados por una región de 40 pb. Este plásmido que se denominó E6(40)VE-LUC (SEQ ID NO. 12) mostró una actividad mayor que VE-LUC (SEQ ID NO. 1), siendo la actividad basal la suma de las actividades de VE y E6. La especificidad de la inducción fue corroborada mediante tratamientos con catalasa exógena, observándose un bloqueo total de la inducción del promotor.

Ejemplo 5: Caracterización de la respuesta del promotor quimera 5'E6(40)VE3' a variaciones endógenas de H₂O₂.

Una vez elegido el promotor quimera 5'E6(40)VE3' por mostrar la mejor actividad basal y por ser inducible por H₂O₂, se evaluó su capacidad de respuesta a variaciones celulares endógenas en los niveles de ROS. Para ello se utilizaron varios modelos experimentales, es decir aumentando o disminuyendo los niveles endógenos de especies reactivas del oxígeno.

5 Se eligieron como modelo algunos de los pares de líneas celulares normales y tumorales comparativos descritos en el Ejemplo 1. En particular, se utilizaron los pares comparativos: para colon, el par CCD-841, LoVo y para fibroblastos, el par WI38, WI38-VA. Estas líneas fueron transfectadas con el plásmido E6(40)VE-LUC y los resultados se expresaron en función de la actividad de pmCMV (actividad de luciferasa). En ambos casos, la actividad de E6(40)VE-LUC (SEQ ID NO. 12) fue mayor en las líneas tumorales respecto de las
10 normales, tal como se muestra en la Figura 4 (a).

Similarmente, se generó un modelo celular con alta producción endógena de radicales libres. Para ello, se transfectó un plásmido conteniendo el ADN complementario de la CuZnSOD humana (SEQ ID NO. 19) de forma estable. Este fue amplificado mediante la técnica de PCR utilizando cebadores o "primers" específicos (SEQ ID NO. 20 y 21). El producto de PCR fue clonado en el vector pcDNA6 que posee resistencia a
15 blastidina. Las células LoVo fueron transfectadas de manera estable con el vector obtenido y se seleccionaron clones mediante tratamientos con blastidina (10 µg/ml) durante 20 días. Se evaluó la producción de radicales libres mediante el ensayo de DCFH-DA mediante análisis de Citometría de flujo con detección de fluorescencia (FACS, *Fluorescence Analyzer Cell Sorter*) de 15 clones aislados. Se analizaron 10000 células por muestra y se realizaron por lo menos dos ensayos por cada clon, seleccionándose el clon
20 F10 que mostró la mayor producción de H₂O₂ (ver Figura 4 (b-1)).

Por otra parte, se prepararon células control por transfección del plásmido pcDNA6 vacío y se seleccionó con blastidina una población de células a la que se denominó células G9. Como puede observarse en la Figura 4 (b-2), la actividad de E6(40)VE-LUC fue 2,5 veces mayor en el clon F10 respecto de los niveles de actividad alcanzado en G9.

25 Finalmente, se disminuyeron los niveles endógenos de H₂O₂ mediante la cotransfección de un plásmido conteniendo el ADNc de la catalasa humana (SEQ ID NO. 22). El ADNc fue clonado en el vector pcDNA3 obteniéndose el vector pcDNA3-CAT. Se realizaron experimentos de cotransfección en las líneas celulares A375N y LoVo, transfectando simultáneamente el plásmido pcDNA3-CAT (1 µg/pocillo) y el vector E6(40)VE-LUC (1 µg/pocillo). Por otra parte, se prepararon células control por transfección con el plásmido pcDNA3
30 (vacío) y con el vector E6(40)VE-LUC. En ambos casos, se transfectó además 0,1 µg/renilla a fin de normalizar los datos a los niveles de transfección en cada caso. Los resultados, mostrados en la Figura 4 (c), se relativizaron a los niveles de actividad de las células transfectadas con pcDNA3 y el vector E6(40)VE-LUC, tomándose este nivel de actividad como 1.

Se transfectaron células LoVo y A375N. En ambos casos la actividad de E6(40)VE-LUC disminuyó un 50%
35 cuando se cotransfectó con el plásmido pcDNA3-CAT (ver Figura 4(c)), demostrándose que parte de la actividad basal de 5'E6(40)VE3' es consecuencia de la presencia endógena de radicales libres.

Ejemplo 6: Construcción del plásmido VE-TK-pcDNA3 conteniendo el gen TK en lugar del gen reportero de la luciferasa y ensayos de la capacidad antitumoral *in vitro*.

40 Se obtuvo el plásmido VE-TK-pcDNA3 mediante el clonado del inserto TK (SEQ ID NO 23) en los sitios HindIII y XbaI del plásmido VE-LUC-pmCMV reemplazándose de este modo el gen de la luciferasa por el gen suicida TK. De este modo, se generó el plásmido VE-TK-pmCMV. A partir de este último se obtuvo el

fragmento Not-VE-TK-XbaI mediante el corte en los sitios NotI y XbaI y se clonó en los mismos sitios del plásmido pcDNA3, obteniéndose el plásmido VE-TK-pcDNA3. El promotor CMV fue previamente eliminado de pcDNA3 mediante el corte en los sitios BglII y BamHI seguido de religación.

5 Las células de cáncer colorrectal LoVo fueron sembradas en placas de 24 pocillos y transfectadas de manera transiente con el plásmido VE-TK-pcDNA3 (1,8 µg/pocillo) o con el plásmido pcDNA3 vacío. A las 24h las células fueron tratadas con tripsina, replaqueadas en una dilución 1/8 y tratadas con GCV (10 y 50 µM de GCV, con un cambio a las 48 hs). La sobrevida fue expresada en relación a las células no expuestas al GCV. Se evaluó la sobrevida mediante el ensayo de MTT, tal como se detalló anteriormente. El motivo o elemento VE en este caso fue capaz de dirigir la expresión del gen terapéutico TK. Los resultados de este ensayo, en presencia de las dos concentraciones de GCV empleadas, se muestran en la Figura 5 (a).

10 Por otra parte, se comparó la actividad de VE-TK-pcDNA3 con la del plásmido pcDNA3 expresando TK. Como puede observarse en la Figura 5 (b), se obtuvo el mismo nivel de actividad antitumoral en presencia de GCV, tanto para VE como para CMV. El efecto del elemento VE solo, *in vitro*, sobre células tumorales muestra que su actividad es tan potente como la del promotor CMV, lo que da la pauta de lo fuerte que es.

15

Ejemplo 7: Construcción de un plásmido conteniendo 5'E6(40)VE3' corriente arriba del gen suicida *hsv-TK* y ensayos de la capacidad antitumoral *in vitro* e *in vivo*.

Estudios *in vitro*

20 Con el fin de evaluar si 5'E6(40)VE3' puede dirigir la expresión de un gen terapéutico, el ADNc de la luciferasa fue reemplazado por el gen de la timidina quinasa (TK) del virus herpes simplex (SEQ ID NO. 23), obteniéndose el vector E6(40)VE-TK. A tal efecto, un fragmento HindIII-TK-SalI fue clonado corriente abajo del promotor 5'E6(40)VE3' del plásmido E6(40)VE-LUC en los sitios *HindIII* y *SalI*; de este modo se reemplazó el ADNc de la luciferasa por el gen *hsv-TK*. Este resultado fue confirmado mediante secuenciación utilizando los cebadores universales T3 (ATTAACCCCTCATAAAGGGA) (SEQ ID NO. 26) y T2 (CTTTATGTTTTGGCGTCTTCCA) (SEQ ID NO. 27).

25

Una vez confirmada la presencia del gen TK, se evaluó su capacidad antitumoral mediante ensayos de MTT. El ensayo de MTT (viabilidad celular) se basa en la conversión de la sal amarilla de tetrazolio en un compuesto de color púrpura (formazan) cuantificable espectrofotométricamente a 570 nm. Esta reacción sólo ocurre en células metabólicamente activas que tienen la enzima succinato-tetrazolio reductasa presente en la cadena respiratoria de las mitocondrias. El efecto antitumoral de E6(40)VE-TK medido en función de la actividad metabólica (ensayo de MTT) se muestra en la Figura 6 (a), para células tumorales de colon (LoVo) y de melanoma (A375N).

30

35 Se sembraron 5×10^4 células LoVo y A375N en placas de 24-pocillos y se transfectaron con 1,8 µg/pocillo del plásmido E6(40)VE-TK utilizando Lipofectamina2000. A las 24 horas las células fueron tratadas con tripsina y diluidas 1/6, y a las 4 horas se les agregó ganciclovir (10 y 50 µM). Este medio fue cambiado cada 48 horas y la proliferación se evaluó mediante el ensayo de MTT. Como controles de transfección y de especificidad, paralelamente se transfectaron estas líneas con E6(40)VE-LUC realizando el mismo procedimiento. Las células transfectadas con E6(40)VE-TK y tratadas con GCV mostraron una significativa inhibición del crecimiento a diferencia de las células transfectadas con E6(40)VE-LUC y expuestas al GCV (ver Figura 6 (a)).

40

Adicionalmente se evaluó la sobrevida mediante la tinción con cristal violeta (solución 0,75% en 40% de metanol). En la Figura 6 (b) se muestran fotografías de las placas con los cultivos de LoVo y A375N tratados con los vectores E6(40)VE-LUC y E6(40)VE-TK, en el ensayo con cristal violeta.

5 Por otro lado, se evaluó el efecto de E6(40)VE-TK/GCV en esferoides formados a partir de la técnica descrita por Dangles-Marie (Dangles-Marie, V., et al., *A three-dimensional tumor cell defect in activating autologous CTLs is associated with inefficient antigen presentation correlated with heat shock protein-70 down-regulation*. Cancer Res, 2003. 63(13): p. 3682-7.). A este fin, se sembraron células LoVo y A375N en placas de 24 pocillos y se transfectaron de manera transiente con 1,8 µg/pocillo de E6(40)VE-TK o E6(40)VE-LUC a modo de control. A las 24 horas las células fueron tratadas con tripsina y sembradas en placas de 96 pocillos (1x10⁴ en 100 µl de medio) que previamente fueron cubiertos con 75 µl de agarosa 1%. El GCV se agregó a las 24 horas renovándose cada 72 horas y evaluándose el diámetro mayor y menor de los mismos dos veces por semana. Se obtuvieron curvas de crecimiento para ambas líneas celulares (datos no mostrados). El volumen de los esferoides formados por células transfectadas de manera transiente con E6(40)VE-TK y tratadas con GCV difiere significativamente del volumen de los esferoides transfectados con E6(40)VE-TK y no expuestos al GCV. En la Figura 6 (c) se muestran las fotografías de los esferoides preparados. Los resultados se observan en la Tabla que se reproduce a continuación:

	LoVo		A375N	
	- GCV	+ GCV	- GCV	+ GCV
E6(40)VE-LUC	62±12	60±2	140±26	101±23
E6(40)VE-TK	41±8	12±3,3	101±10	17,4±5

No se observaron efectos en los esferoides formados con células transfectadas de manera transiente con E6(40)VE-LUC y tratadas con GCV, demostrándose la especificidad de acción de la TK.

20 **Estudios *in vivo***

Posteriormente las células A375N y LoVo previamente transfectadas de manera transiente con E6(40)VE-TK fueron inoculadas en ratones desnudos. Se utilizaron animales machos atímicos N:NIH(S) de 6-8 semanas de edad (obtenidos del bioterio de la Comisión Nacional de Energía Atómica). Los animales fueron inyectados con 2,5x10⁶ células A375N o con 4x10⁶ células LoVo, previamente transfectadas con E6(40)VE-TK. 25 Seguidamente, los animales fueron tratados por vía intraperitoneal (i.p.) con GCV (50mg/kg) durante 10 días. El grupo control recibió solamente vehículo, es decir PBS. La Figura 6 (d) muestra las curvas de crecimiento tumoral en los ratones inyectados con las células A375N y LoVo previamente transfectadas con E6(40)VE-TK. La Figura 6 (d) también muestra fotografías de ratones inyectados con PBS o GCV por vía i.p., a los 50 días post-inyección. Se observa una inhibición total del crecimiento en los animales inoculados con células 30 LoVo previamente transfectadas, y un fuerte retraso en el crecimiento en los animales inoculados con A375N.

Ejemplo 8: Combinación de E6(40)VE-TK con radiación ionizante y con drogas quimioterapéuticas

Estudios *in vitro*

35 Dado que por un lado el promotor contiene un elemento de respuesta a la radiación ionizante y por otro la radiación ionizante genera radicales libres mediante la radiólisis del agua, se evaluó el posible efecto aditivo de E6(40)VE-TK con radiación ionizante.

Estos experimentos se realizaron de la misma manera que los descritos en el Ejemplo 7, con el agregado de radiación gama y drogas quimioterapéuticas. Con respecto a los experimentos combinados con radiación

gama, las células fueron irradiadas con 1, 2 y 5 Gy (gray) 24 horas después del primer agregado de GCV (10 μ M). Los resultados se muestran en la Figura 7 (a), para las células tumorales LoVo (colon) y A375N (melanoma) tratadas.

5 Con respecto a las drogas quimioterapéuticas, se agregó doxorubicina (0,5 μ M) o bleomicina (20 μ M) a las 48 horas del primer agregado de GCV (10 μ M). En ambos casos se observó un efecto aditivo de ambos tratamientos en las dos líneas celulares ensayadas. Los resultados se observan en la Figura 7 (b).

10 La combinación de tratamientos también se llevó a cabo en esferoides. En este caso se agregó doxorubicina (0,5 μ M) a los 4 días de la siembra. El efecto de los tratamientos se cuantificó mediante la técnica de MTT a los 10 días de iniciado el tratamiento. Para esto último, los esferoides fueron incubados con 0,5 mg/ml de MTT durante 2 horas, luego de lo cual los esferoides fueron absorbidos y juntados. Los esferoides fueron centrifugados 2 min a 14000 rpm, se descartó el sobrenadante y se resuspendieron en 50 μ l de DMSO, se evaluó la absorbancia a 590 nm. La sobrevivencia se expresó como % del control (esferoides no tratados con GCV).

15 En este caso también se observó un efecto aditivo de ambos tratamientos. En la Figura 7 (c) se muestran fotografías de los esferoides preparados.

Ejemplo 9: Efecto de E6(40)VE-TK en tumores establecidos y combinación con doxorubicina.

Estudios *in vivo*

20 Se evaluó la capacidad antitumoral de E6(40)VE-TK en tumores establecidos. Dado que la entrada de un plásmido desnudo a una célula *in vivo* es un proceso muy ineficiente, se decidió utilizar técnicas de electrotransferencia. Esta técnica consiste en aplicar un pulso eléctrico, que está demostrado que genera poros transitorios en la membrana de las células permitiendo la entrada del plásmido (*Heller LC, Ugen K, Heller R, Electroporation for targeted gene transfer. Expert Opin Drug Deliv. 2005, 2:255-68*). Esta técnica está siendo utilizada actualmente en pacientes en protocolos clínicos para optimizar la entrada de drogas

25 quimioterapéuticas en el tratamiento de melanoma (*Giardino R, Fini M, Bonazzi V, Cadossi R, Nicolini A, Carpi A. Electrochemotherapy a novel approach to the treatment of metastatic nodules on the skin and subcutaneous tissues. Biomed Pharmacother. 2006 Sep;60(8):458-62*).

30 Se utilizaron animales machos atímicos de 6-8 semanas de edad. Los animales fueron inyectados con 2,5x10⁶ células A375N y con 4x10⁶ células LoVo. Cuando los tumores alcanzaron un tamaño promedio entre 100-200 mm³ (aproximadamente a los 20 días), se inició el tratamiento intratumoral con el plásmido E6(40)VE-TK. Los animales fueron divididos en 4 grupos experimentales conteniendo 5 animales por grupo. Los grupos fueron: E6(40)VE-TK/PBS, mostrado en la Figura 8 (a); E6(40)VE-TK/PBS/Dx, mostrado en la Figura 8 (b); E6(40)VE-TK/GCV, mostrado en la Figura 8 (c); y E6(40)VE-TK/GCV/Dx, mostrado en la Figura 8 (d).

35 Previamente a la administración del plásmido los animales fueron anestesiados con xilacina y ketamina. El plásmido fue inyectado intratumoralmente (50 μ g ADN/ en 100 μ l de PBS) en todos los animales. Aproximadamente dentro del minuto consecutivo a la administración local del plásmido se aplicaron 6 pulsos de 20 ms a un voltaje de 400mV/cm con un electrodo con una separación de 0,5 cm. Se administraron 6 aplicaciones de E6(40)VE-TK los días 1, 3, 5, 7, 9 y 11. A la mitad de los animales se le administró GCV i.p.

40 (50mg/kg), comenzando en el día 1 y durante 15 días consecutivos. Como control los tumores fueron inyectados de la misma manera pero se les administró PBS intraperitoneal (i.p.). Para los experimentos de combinación de E6(40)VE-TK/GCV con doxorubicina, se aplicó una dosis de 5 mg/kg i.p. de doxorubicina

los días 3, 7 y 11 a la mitad de los animales tratados con E6(40)VE-TK/GCV, y también a la mitad de los animales tratados con E6(40)VE-TK/PBS ip.

Como puede verse en las Figuras 8 (a) a (e), los ratones tratados con GCV inhibieron fuertemente su crecimiento. Por otro lado, se observó un efecto aditivo en los ratones tratados con E6(40)VE-TK/GCV/Dx.

5

Las modificaciones y variaciones de los ejemplos descritos en la invención serán evidentes para los expertos en la materia, sin salirse del alcance de la misma. Aunque la invención se ha descrito con respecto a realizaciones específicas, deberá entenderse a la invención de acuerdo con lo que se ha reivindicado, y no limitarse a dichas realizaciones específicas. De hecho, varias modificaciones de los modos descritos para

10

realizar la invención, que son obvias para aquellos expertos en el arte, se conciben dentro del alcance de las reivindicaciones.

Con el propósito de completación, diversos aspectos de la presente divulgación están establecidos en las siguientes cláusulas numeradas:

15

Cláusula 1: Un promotor inducible por especies reactivas del oxígeno (ROS), que comprende al menos un fragmento de una secuencia promotora que responde a dichas especies reactivas del oxígeno, y que corresponde a un gen altamente expresado en células cancerosas.

20

Cláusula 2: El promotor de acuerdo con la cláusula 1, en donde el fragmento de la secuencia promotora que responde a especies reactivas del oxígeno (ROS) está seleccionado a partir del grupo de: el elemento VE que consiste en la región -80 a -50 del promotor de VEGF (SEQ ID NO: 1), el elemento E6 que se encuentra en la región proximal del promotor del gen EGR-1 (SEQ ID NO: 2), el elemento MMP-1 que consiste en la región -2000 a -1546 del promotor de MMP-1 (SEQ ID NO: 3) y un promotor quimera que contiene un elemento E6 distanciado de un elemento VE por una secuencia espaciadora.

25

Cláusula 3: El promotor de acuerdo con la cláusula 2, en donde el promotor quimera contiene un elemento E6 distanciado de un elemento VE por una secuencia espaciadora de entre aproximadamente 6 y aproximadamente 200 pares de bases.

30

Cláusula 4: El promotor de acuerdo con la cláusula 3, en donde la secuencia espaciadora está seleccionada a partir de 6 pares de bases, 20 pares de bases y 40 pares de bases.

Cláusula 5: El promotor de acuerdo con la cláusula 3, en donde el promotor quimera es 5'E6(40)VE3' (SEQ ID NO: 12).

35

Cláusula 6: Un vector que comprende un promotor inducible por especies reactivas del oxígeno (ROS), que comprende al menos un fragmento de una secuencia promotora que responde a dichas especies reactivas del oxígeno y que corresponde a un gen altamente expresado en células cancerosas.

Cláusula 7: El vector de acuerdo con la cláusula 6, en donde el fragmento de la secuencia promotora que responde a especies reactivas del oxígeno está seleccionado a partir del grupo de: el elemento VE que consiste de la región -80 a -50 del promotor de VEGF (SEQ ID NO: 1), el elemento E6 que se encuentra en la región proximal del promotor del gen EGR-1 (SEQ ID NO: 2), el elemento MMP-1 que consiste en la región -2000 a -1546 del promotor de MMP-1 (SEQ ID NO: 3) y un promotor quimera que contiene un elemento E6 distanciado de un elemento VE por una secuencia espaciadora.

40

Cláusula 8: El vector de acuerdo con la cláusula 7, en donde el promotor quimera contiene un elemento E6 distanciado de un elemento VE por una secuencia espaciadora de entre aproximadamente 6 y aproximadamente 200 pares de bases.

ES 2 550 250 T3

- Cláusula 9: El vector de acuerdo con la cláusula 8, en donde la secuencia espaciadora está seleccionada a partir del grupo de 6 pares de bases, 20 pares de bases y 40 pares de bases.
- Cláusula 10: El vector de acuerdo con la cláusula 7, en donde el promotor quimera es 5'E6(40)VE3' (SEQ ID NO: 12).
- 5 Cláusula 11: El vector de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 6 a 10, que además comprende un gen de interés, operativamente ligado a dicha secuencia promotora.
- Cláusula 12: El vector de acuerdo con la cláusula 11, en donde el gen de interés es un gen humano terapéutico.
- Cláusula 13: El vector de acuerdo con la cláusula 7, que comprende el elemento VE (SEQ ID NO: 1) y un gen humano terapéutico operativamente ligado a dicha secuencia promotora.
- 10 Cláusula 14: El vector de acuerdo con la cláusula 10, que comprende el promotor quimera 5'E6(40)VE3' (SEQ ID NO: 12) y un gen humano terapéutico operativamente ligado a dicha secuencia promotora.
- Cláusula 15: El vector de acuerdo con la cláusula 12, en donde dicha secuencia promotora dirige la expresión de dicho gen en células tumorales. Cláusula 16: El vector de acuerdo con la cláusula 12, en donde dicho gen humano terapéutico es un gen suicida.
- 15 Cláusula 17: El vector de acuerdo con la cláusula 11, en donde el gen expresa proteínas detectables mediante sistemas ópticos para el monitoreo por imágenes de tejido.
- Cláusula 18: El vector de acuerdo con las cláusulas 6 o 7, en donde el vector está seleccionado a partir de un vector viral y un vector no viral.
- 20 Cláusula 19: Una composición farmacéutica que comprende un vector de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 6 a 18, en un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- Cláusula 20: La composición de acuerdo con la cláusula 19, que además comprende una droga quimioterapéutica.
- Cláusula 21: La composición farmacéutica de acuerdo con la cláusula 19, en donde el vehículo es una célula.
- 25 Cláusula 22: Un método de tratamiento para enfermedades asociadas con una alta producción de especies reactivas del oxígeno, que comprende la administración de la composición de la cláusula 19 en una cantidad efectiva a un paciente que sufre de dicha enfermedad.
- Cláusula 23: El método de acuerdo con la cláusula 22, que comprende la administración de la composición en una cantidad suficiente para transformar una pro-droga en un agente tóxico para eliminar una célula en proceso de división.
- 30 Cláusula 24: El método de acuerdo con la cláusula 22, en donde la célula es una célula tumoral.
- Cláusula 25: El método de acuerdo con la cláusula 22, que además comprende la aplicación de radiación ionizante.
- Cláusula 26: El método de acuerdo con la cláusula 22, en donde la enfermedad es cáncer.
- 35 Cláusula 27: El método de acuerdo con la cláusula 22, en donde la enfermedad es artritis.
- Cláusula 28: Un método de diagnóstico mediante monitoreo por imágenes que comprende el uso de un promotor de acuerdo con la cláusula 1, operativamente ligado a un gen que expresa proteínas detectables a través de sistemas ópticos para el monitoreo por imágenes *in vivo* de tejido, seguido de la detección de la emisión de luz, y de la generación de imágenes en dos dimensiones.
- 40 Cláusula 29: El método de diagnóstico de acuerdo con la cláusula 28, en donde el promotor es 5'E6(40)VE3' y el gen operativamente ligado a dicho promotor es un gen que codifica para una proteína seleccionado a partir de proteína verde fluorescente (GFP), proteína roja fluorescente (RFP) y luciferina (LUC).

- Cláusula 30: Un método para dirigir la expresión de un gen terapéutico en una célula hospedante que exhibe mayor producción de especies reactivas del oxígeno que una célula normal de la misma línea celular, que comprende introducir en la célula hospedante un vector que comprende una secuencia promotora seleccionada del grupo de: el elemento VE que consiste de la región -80 a -50 del promotor de VEGF (SEQ ID NO. 1), el elemento E6 que se encuentra en la región proximal del promotor del gen EGR-1 (SEQ ID NO. 2), el elemento MMP-1 que consiste de la región -2000 a -1546 del promotor de la MMP-1 (SEQ ID NO. 3) y un promotor quimera que contiene un elemento E6 distanciado de un elemento VE por una secuencia espaciadora, en donde el vector comprende además un gen terapéutico operativamente ligado a dicha secuencia promotora.
- Cláusula 31: El método de acuerdo con la cláusula 30, donde el promotor quimera contiene el elemento E6 distanciado de un elemento VE por una secuencia espaciadora de entre aproximadamente 6 y aproximadamente 200 pares de bases.
- Cláusula 32: El método de acuerdo con la cláusula 30, en donde la secuencia espaciadora está seleccionada a partir del grupo de 6 pares de bases, 20 pares de bases y 40 pares de bases.
- Cláusula 33: El método de acuerdo con la cláusula 30, en donde el promotor quimera es 5'E6(40)VE3' (SEQ ID NO: 12).

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Fundación Instituto Leloir
- <120> Promotor quimera inducible por especies reactivas del oxígeno y vector que lo comprende
- <130> ROS
- <160> 28
- <170> PatentIn version 3.3
- <210> 1
- <211> 36
- <212> DNA
- <213> VE
- <220>
- <221> misc_feature
- <223> Secuencia promotora derivada del promotor de VEGF
- <400> 1
 ggggcccccc gggggcgggg tcccggcggg gcggag
- <210> 2
- <211> 60
- <212> DNA
- <213> E6
- <220>

ES 2 550 250 T3

```

<221> misc_feature
<223> Secuencia promotora derivada del promotor de EGR-1

<400> 2
5 ccatataagg ccatataagg ccatataagg ccatataagg ccatataagg ccatataagg      60

<210> 3
<211> 532
10 <212> DNA
    <213> MMP-1

<220>
15 <221> misc_feature
    <223> Secuencia promotora derivada del promotor de MMP-1

<400> 3
20 agtgtatgag actcttccag ggtgacgtct taggcaatth cctgtccaat cacagatggt      60
    cacatgctgc tttcctgagt taacctatta actcaccctt gtttcccagg cctcagtgga      120
    gctaggcttg tcacgtcttc acagtgacta gattccctca cagtcgagta tatctgccac      180
    tccttgactt ttaaaacata gtctatgttc accctctaata atgaagagcc cctttcacta      240
    ttttctttgt ctgtgctgga gtcacttcag tggcaagtgt tctttggtct ctgccgcacc      300
    ctccctctga tgcctctgag aagaggattt ccttttcgtg agaatgtctt cccattcttc      360
25 ttaccctctt gaactcacat gttatgccac ttagatgagg aaattgtagt taaataatta      420
    gaaagatatg acttatctca aatcaatcca agatatactg aagtattggt tatgagtaag      480
    atatcagtct tgacgcagaa agaaaacagg aatccataag gggaggaaag tg              532

<210> 4
30 <211> 40
    <212> DNA
    <213> oligo 1 VEGF

<220>
35 <221> misc_feature
    <223> Oligonucleótido sintético correspondiente a la secuencia
        promotora derivada del promotor de VEGF

40 <400> 4
    cggggcgggc cgggggcggg cgggggtccgg cgggpcggaga      40

<210> 5
45 <211> 46
    <212> DNA
    <213> oligo 2 VEGF

<220>
50 <221> misc_feature
    <223> Oligonucleótido sintético correspondiente a la secuencia
        promotora derivada del promotor de VEGF

55 <400> 5
    cgcgtctccg ccccgccggg accccgcccc cggcccgcgcc cggtac      46

```

ES 2 550 250 T3

5 <210> 6
 <211> 66
 <212> DNA
 <213> oligo 1 E6

10 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Oligonucleótido sintético correspondiente a la secuencia promotora derivada del promotor de E6

15 <400> 6
 cgcgtccata taaggccata taaggccata taaggccata taaggccata taaggccata 60
 taaggc 66

20 <210> 7
 <211> 66
 <212> DNA
 <213> oligo 2 E6

25 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Oligonucleótido sintético correspondiente a la secuencia promotora derivada del promotor de E6

30 <400> 7
 tcgagcctta tatggcctta tatggcctta tatggcctta tatggcctta tatggcctta 60
 tatgga 66

35 <210> 8
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> oligo 1 MMP-1

40 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Cebador

45 <400> 8
 cggggtagca cagtgtatga gactcttcca ggg 33

50 <210> 9
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> oligo 2 MMP-1

55 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Cebador

ES 2 550 250 T3

<400> 9
 cgacgcgtca ctttctctccc ctccccttat ggattctctg 39

5

<210> 10
 <211> 102
 <212> DNA
 <213> E6/VE

10

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Secuencia promotora derivada del promotor de E6 y VE

15

<400> 10
 ccatataagg ccatataagg ccatataagg ccatataagg ccatataagg ccatataagg 60
 acgcgtgggg cgggccgggg gcgggggtccc ggcggggcg ag 102

20

<210> 11
 <211> 102
 <212> DNA
 <213> VE/E6

25

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Secuencia promotora derivada del promotor de VE y E6

30

<400> 11
 ggggcgggcc gggggcgggg tcccggcggg gcggagacgc gtccatataa ggccatataa 60
 ggccatataa ggccatataa ggccatataa ggccatataa gg 102

35

<210> 12
 <211> 135
 <212> DNA
 <213> E6(40)VE

40

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Secuencia promotora derivada del promotor de E6 y VE con una
 secuencia espaciadora

45

<400> 12
 ccatataagg ccatataagg ccatataagg ccatataagg ccatataagg ccgtataagg 60
 acgcgtttgc tagcatcgat tcatatgtac tagtacgcgt gggccgggcc gggggcgggg 120
 tcccggcggg gcgga 135

50

<210> 13
 <211> 62
 <212> DNA
 <213> oligonucleótido E6 3

55

ES 2 550 250 T3

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Oligonucleótido sintético correspondiente a la secuencia
 5 promotora derivada del promotor de E6

<400> 13
 cccatataag gccatataag gccatataag gccatataag gccatataag gccatataag 60
 ga 62
 10

<210> 14
 <211> 70
 <212> DNA
 15 <213> oligonucleótido E6 4

<220>
 <221> misc_feature
 20 <223> Oligonucleótido sintético correspondiente a la secuencia
 promotora derivada del promotor de E6

<400> 14
 25 cgcgtcctta tatggcctta tatggcctta tatggcctta tatggcctta tatggcctta 60
 tatggggtac 70

<210> 15
 <211> 42
 30 <212> DNA
 <213> oligonucleótido VE 3

<220>
 <221> misc_feature
 35 <223> Oligonucleótido sintético correspondiente a la secuencia
 promotora derivada del promotor de VE

<400> 15
 40 cgcgtggggc gggccggggg cggggtcccg gcggggcgga gc 42

<210> 16
 <211> 42
 45 <212> DNA
 <213> oligonucleótido VE 4

<220>
 <221> misc_feature
 50 <223> Oligonucleótido sintético correspondiente a la secuencia
 promotora derivada del promotor de VE

<400> 16
 55 tcgagctccg ccccgccggg accccgcccc cggccccccc ca 42

ES 2 550 250 T3

	<210> 17		
	<211> 41		
	<212> DNA		
5	<213> oligonucleótido S1		
	<220>		
	<221> misc_feature		
10	<223> Oligonucleótido sintético correspondiente a una secuencia espaciadora		
	<400> 17		
	cgcgtacctc ttagtacata tgaatcgatg ctagtagcaa a		41
15	<210> 18		
	<211> 34		
	<212> DNA		
20	<213> oligonucleótido S2		
	<220>		
	<221> misc_feature		
25	<223> Oligonucleótido sintético correspondiente a una secuencia espaciadora		
	<400> 18		
	cgcgtttgct agcatcgatt catatgtact agta		34
30	<210> 19		
	<211> 465		
	<212> DNA		
35	<213> Homo sapiens - ADNc CuZn SOD		
	<220>		
	<221> misc_feature		
40	<223> Secuencia correspondiente al ADNc de la superóxido dismutasa dependiente de Cu y Zn		
	<400> 19		
	atggcgacga aggccgtgtg cgtgctgaag ggcgacggcc cagtgcaggg catcatcaat		60
	ttcgagcaga aggaaagtaa tggaccagtg aagggtgtggg gaagcattaa aggactgact		120
45	gaaggcctgc atggattcca tgttcatgag tttggagata atacagcagg ctgtaccagt		180
	gcaggtcctc actttaatcc tctatccaga aaacacggtg ggccaaagga tgaagagagg		240
	catgttggag acttgggcaa tgtgactgct gacaaagatg gtgtggccga tgtgtctatt		300
	gaagattctg tgatctcact ctcaggagac cattgcatca ttggccgcac actggtggtc		360
	catgaaaaag cagatgactt gggcaaaggt ggaaatgaag aaagtacaaa gacaggaaac		420
50	gctggaagtc gtttggcttg tgggtgaatt gggatcgccc aataa		465
	<210> 20		
	<211> 21		
55	<212> DNA		
	<213> oligonucleótido 1 SOD1		

ES 2 550 250 T3

	<220>					
	<221>	misc_feature				
	<223>	Cebador				
5	<400>	20	aagcttatgg cgacaaggcc g			21
10	<210>	21				
	<211>	21				
	<212>	DNA				
	<213>	oligonucleótido 2 SOD				
15	<220>					
	<221>	misc_feature				
	<223>	Cebador				
20	<400>	21	tctagattat tgggcgatcc c			21
25	<210>	22				
	<211>	1583				
	<212>	DNA				
	<213>	Homo sapiens - ADNc catalasa humana				
30	<400>	22	atggctgaca gccgggatcc cgccagcgac cagatgcagc actggaagga gcagcggggcc			60
			gcgcagaaaag ctgatgtcct gaccactgga gctggtaacc cagtaggaga caaacttaat			120
			gttattacag tagggccccg tgggcccctt cttgttcagg atgtggtttt cactgatgaa			180
			atggctcatt ttgaccgaga gagaattcct gagagagttg tgcattgctaa aggagcaggg			240
			gcctttggct actttgaggt cacacatgac attaccaaat actccaaggc aaaggatattt			300
35			gagcatattg gaaagaagac tcccatcgca gttcggttct ccaactgttg tggagaatcg			360
			ggttcagctg acacagtctg ggaccctcgt gggtttgagc tgaaatttta cacagaagat			420
			ggtaactggg atctcgttgg aaataacacc cccattttct tcatcagggg tcccatattg			480
			tttccatctt ttatccacag ccaaaagaga aatcctcaga cacatctgaa ggatccggac			540
			atggctctggg acttctggag cctacgtcct gagtctctgc atcaggtttc tttcttgctc			600
40			agtgatcggg ggattccaga tggacatcgc cacatgaatg gatatggatc acatactttc			660
			aagctgggta atgcaaatgg ggaggcagtt attgcaaatt ccattataag actgaccagg			720
			gcatcaaaaa cctttctggt gaagatgcgg cgagactttc ccaggaagat cctgactatg			780
			gcatccggga tctttttaac gccattgcc aaggaaagta cccctcctgg actttttaca			840
			tccaggtcat gacatttaat caggcagaaa cttttccatt taatccattc gatctcacca			900
45			aggtttggcc tcacaaggac taccctctca tcccagttgg taaactggtc ttaaaccgga			960
			atccagttaa ttactttgct gaggttgaac agatagcctt cgacceaaagc aacatgccac			1020
			ctggcattga ggccagtctt gacaaaatgc ttcagggccg cttttttgct tatcctgaca			1080
			ctcaccgcca tcgcttggga cccaattatc ttcataatcc tgtgaactgt ccctaccgtg			1140
			ctcgagtggc caactaccag cgtgacggcc cgatgtgcat gcaggacaat caggggtggtg			1200
50			ctccaaatta ctaccccaac agctttgggtg ctccggaaca acagccttct gccctggagc			1260
			acagcatcca atattctgga gaagtgcgga gattcaacac tgccaatgat gataacgta			1320
			ctcaggtgcg ggcaattctat gtgaacgtgc tgaatgagga acagaggaaa cgtctgtgtg			1380
			agaacattgc cggccacctg aaggatgcac aaatcttcat ccagaagaaa gcggtcaaga			1440
			acttactgga ggtccacct gactacggga gccacatcca ggctcttctg gacaagtaca			1500
55			atgctgagaa gcctaagaat gcgattcaca cttttgtgca gtccggatct cacttggcgg			1560
			caagggagaa ggcaaatctg tga			1583

ES 2 550 250 T3

ctttatgttt ttggcgtctt cca 23

5 <210> 26
<211> 19
<212> DNA
<213> T3

10 <220>
<221> misc_feature
<223> Cebador

15 <400> 26
attaaccctc ataaaggga 19

20 <210> 27
<211> 23
<212> DNA
<213> T2

25 <220>
<221> misc_feature
<223> Cebador

30 <400> 27
ctttatgttt ttggcgtctt cca 23

35 <210> 28
<211> 40
<212> DNA
<213> Secuencia espaciadora

40 <400> 28
acgcgtttgc tagcatcgat tcatatgtac tagtacgcgt 40

45

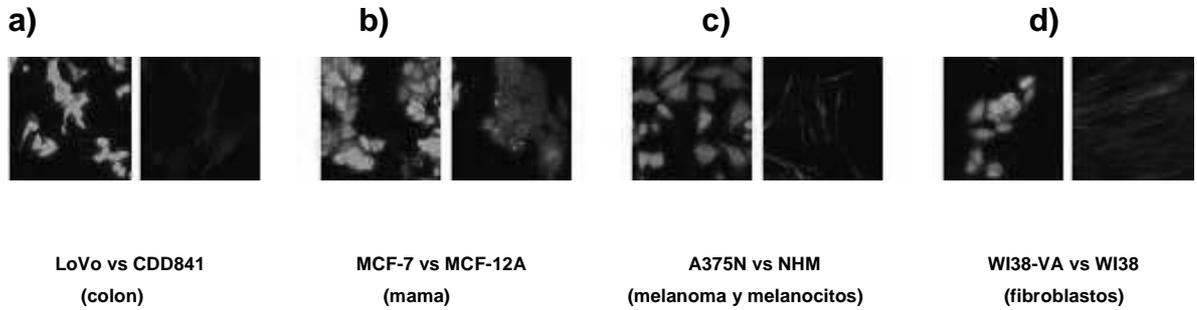
50

55

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un promotor inducible por especies reactivas del oxígeno (ROS), consistiendo el promotor en un promotor quimera que contiene un elemento E6 que se encuentra en la región proximal del promotor del gen EGR-1 (SEQ ID NO: 2) distanciado de un elemento VE del promotor de VEGF (SEQ ID NO: 1) por una secuencia espaciadora.
- 10 2. El promotor de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el promotor quimera contiene el elemento E6 distanciado de un elemento VE por una secuencia espaciadora de entre aproximadamente 6 y aproximadamente 200 pares de bases.
3. El promotor de acuerdo con la reivindicación 2, en donde la secuencia espaciadora está seleccionada a partir de 6 pares de bases, 20 pares de bases y 40 pares de bases.
4. El promotor de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el promotor quimera es 5'E6(40)VE3' (SEQ ID NO: 12).
- 15 5. Un vector que comprende un promotor inducible por especies reactivas del oxígeno (ROS), consistiendo el vector en un promotor quimera que contiene un elemento E6 que se encuentra en la región proximal del promotor del gen EGR-1 (SEQ ID NO: 2) distanciado de un elemento VE del promotor de VEGF (SEQ ID NO: 1) por una secuencia espaciadora.
- 20 6. El vector de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el promotor quimera contiene un elemento E6 distanciado de un elemento VE por una secuencia espaciadora de entre aproximadamente 6 y aproximadamente 200 pares de bases.
7. El vector de acuerdo con la reivindicación 6, en donde la secuencia espaciadora está seleccionada a partir del grupo de 6 pares de bases, 20 pares de bases y 40 pares de bases.
- 25 8. El vector de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el promotor quimera es 5'E6(40)VE3' (SEQ ID NO: 12).
9. El vector de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, que además comprende un gen de interés, operativamente ligado a dicha secuencia promotora.
10. El vector de acuerdo con la reivindicación 9, en donde el gen de interés es un gen humano terapéutico.
- 30 11. El vector de acuerdo con la reivindicación 8, que comprende el promotor quimera 5'E6(40)VE3' (SEQ ID NO: 12) y un gen humano terapéutico operativamente ligado a dicha secuencia promotora.
12. El vector de acuerdo con la reivindicación 10, en donde dicha secuencia promotora dirige la expresión de dicho gen en células tumorales.
13. El vector de acuerdo con la reivindicación 10, en donde dicho gen humano terapéutico es un gen suicida.
- 35 14. El vector de acuerdo con la reivindicación 9, en donde el gen expresa proteínas detectables mediante sistemas ópticos para el monitoreo por imágenes de tejido.
15. El vector de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el vector está seleccionado a partir de un vector viral y un vector no viral.
16. Una composición farmacéutica que comprende un vector de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 15, en un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 40 17. La composición de acuerdo con la reivindicación 16, que además comprende una droga quimioterapéutica.
18. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 16, en donde el vehículo es una célula.

Línea celular tumoral vs línea celular normal



e)

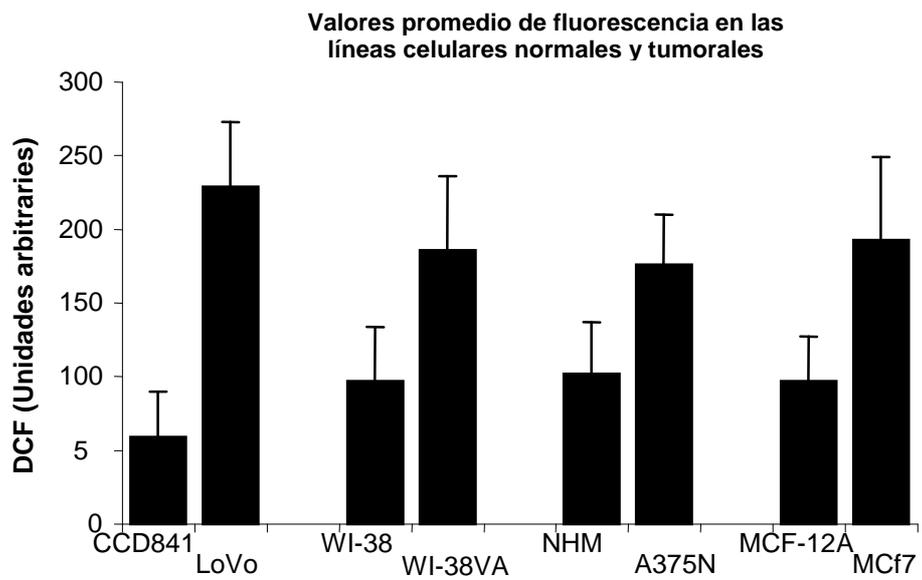


Fig. 1

pmCMV-LUC	pmCMV	LUCIFERASA
E6-LUC	E6	pmCMV
VE-LUC	VE	pmCMV
MMP1-LUC	MMP-1(-2002/-1546)	pmCMV
		LUCIFERASA

Fig. 2 (a)

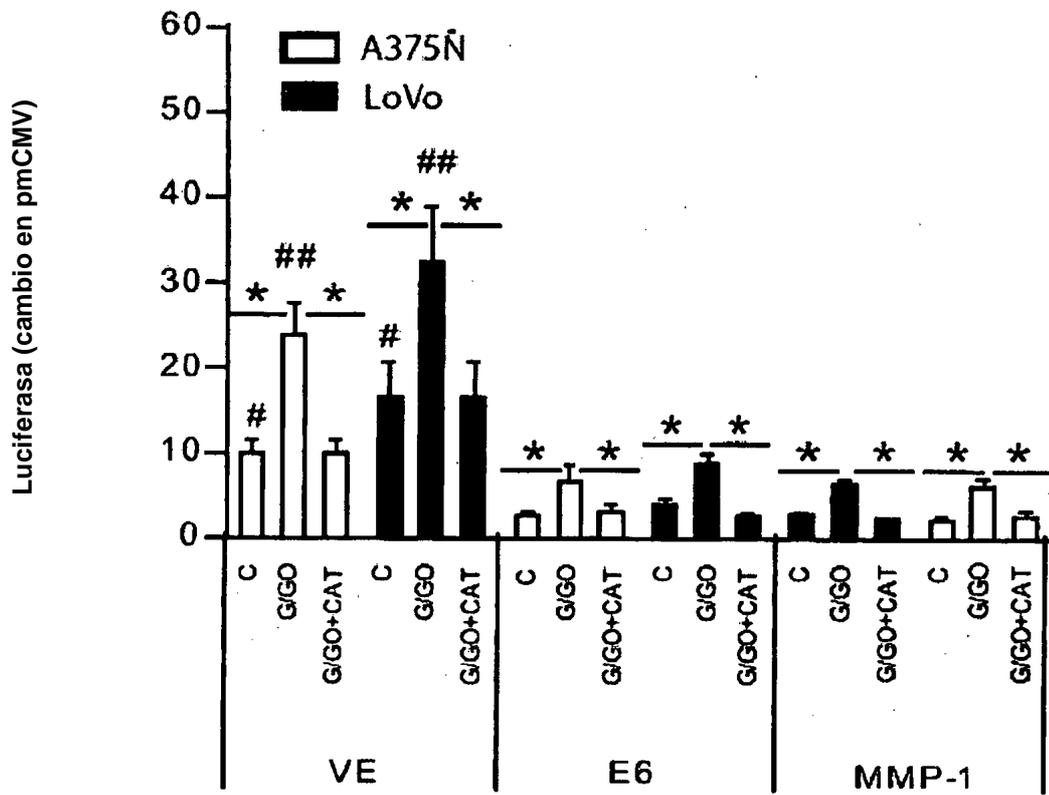


Fig. 2 (b)

VE(6)E6-LUC

VE	E6	pmCMV	LUCIFERASA
----	----	-------	------------

E6(6)VE-LUC

E6	VE	pmCMV	LUCIFERASA
----	----	-------	------------

E6(20)VE-LUC

E6	S20	VE	pmCMV	LUCIFERASA
----	-----	----	-------	------------

E6(40)VE-LUC

E6	S40	VE	pmCMV	LUCIFERASA
----	-----	----	-------	------------

Fig. 3 (a)

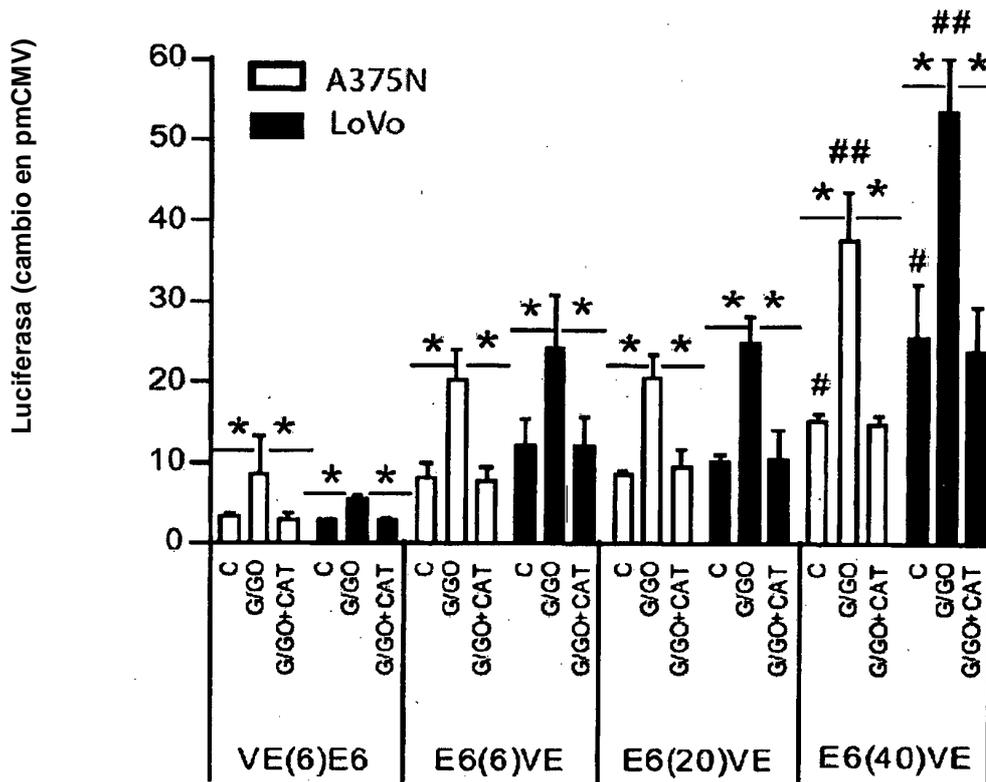


Fig. 3 (b)

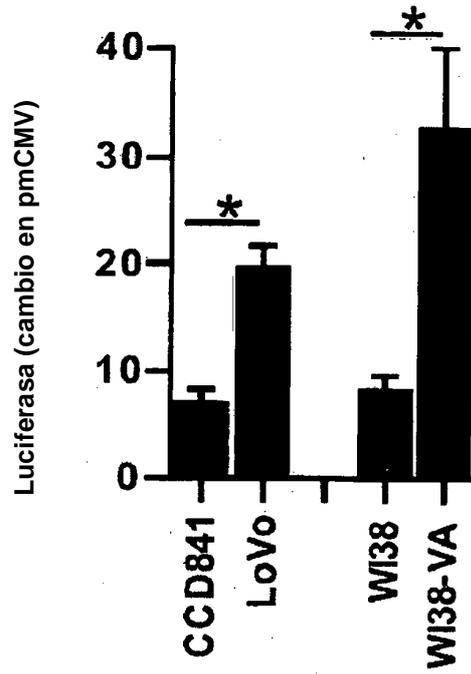


Fig. 4 (a)

Análisis de producción de radicales libres - Ensayo DCFH-DA

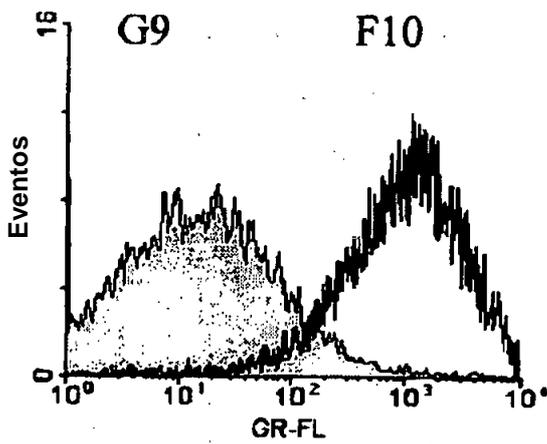


Fig. 4 (b)

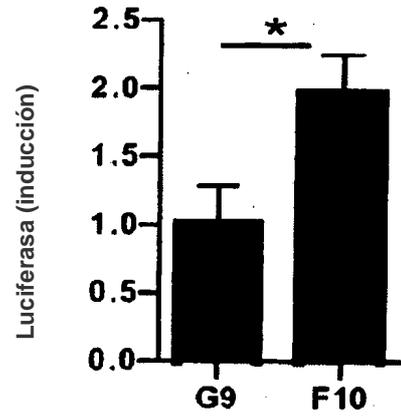


Fig. 4 (c)

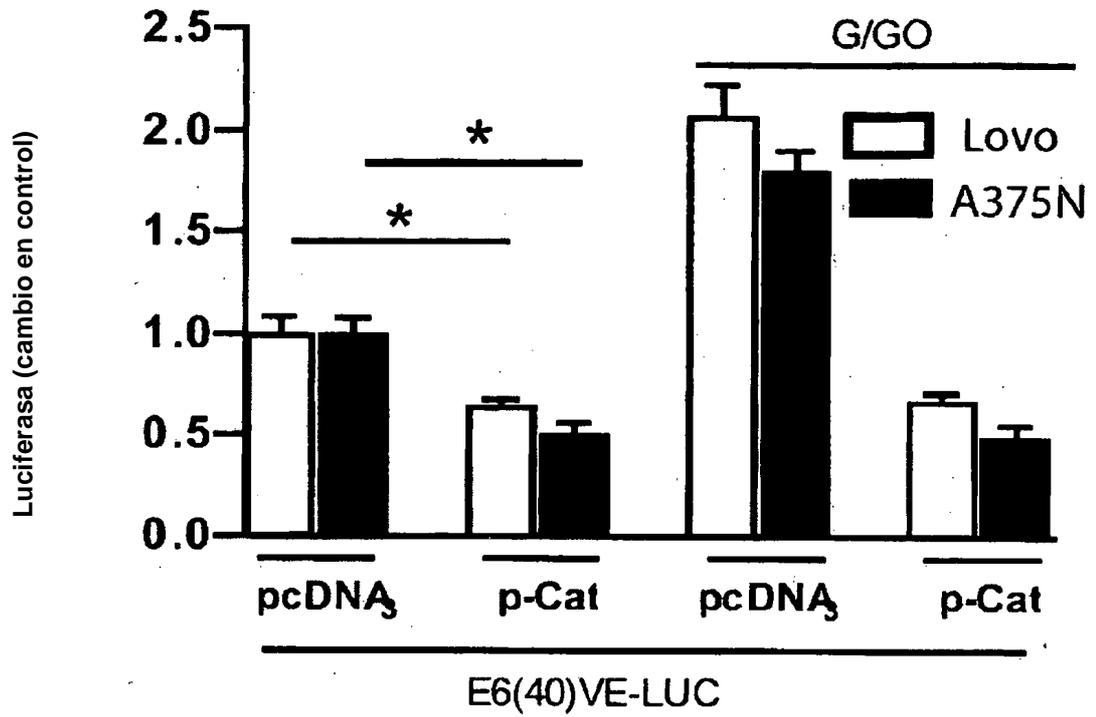


Fig. 4 (d)

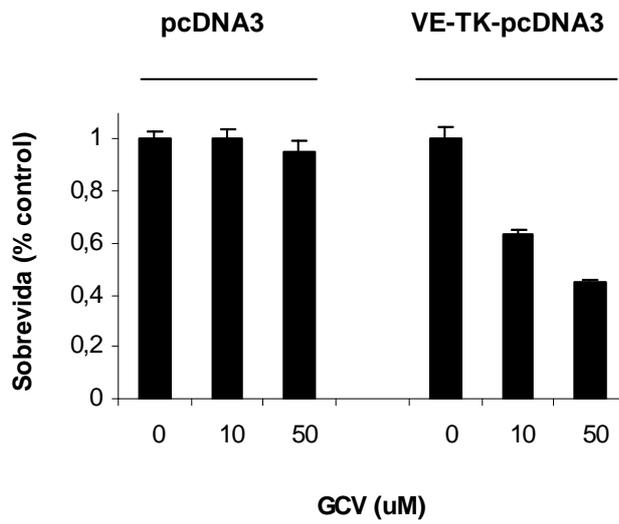


Fig. 5 (a)

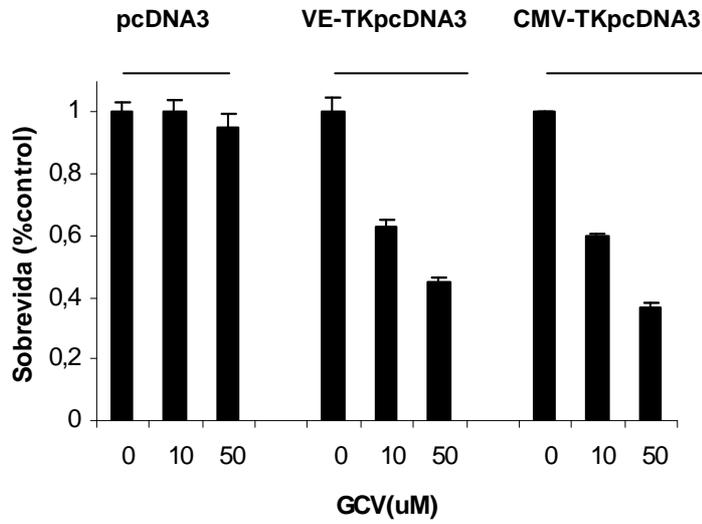


Fig. 5 (b)

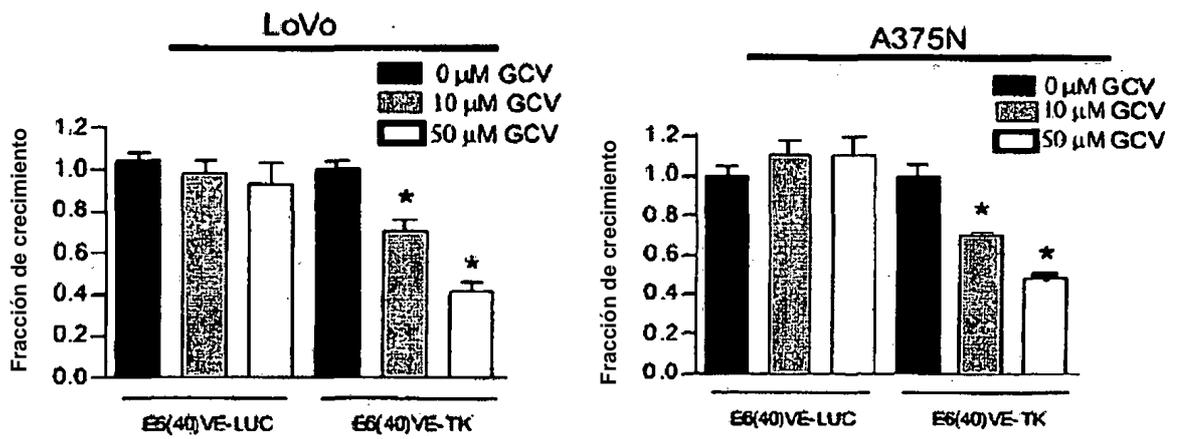


Fig. 6 (a)

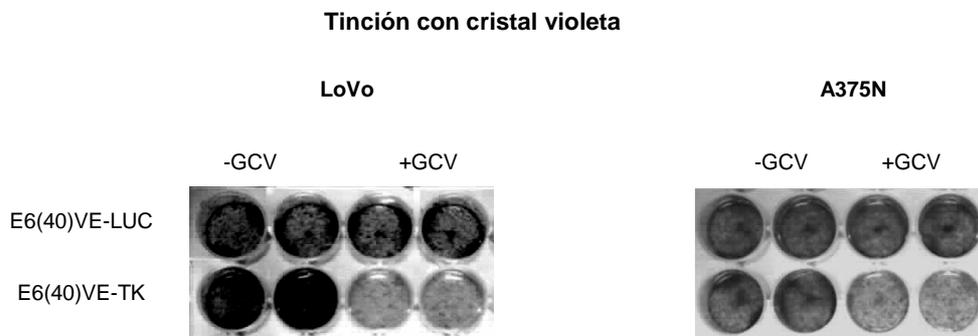


Fig. 6 (b)

Ensayo en esferoides

	LoVo		A375N	
	- GCV	+ GCV	- GCV	+ GCV
E6(40)VE-LUC	62±12	60±2	140±26	101±23
E6(40)VE-TK	41±8	12±3,3	101±10	17,4±5

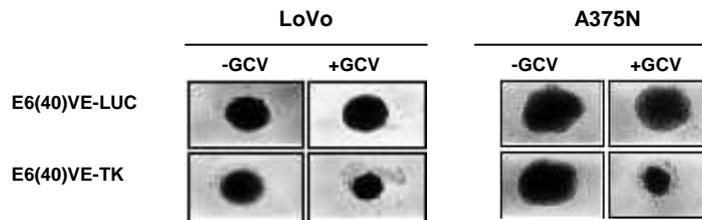


Fig. 6 (c)

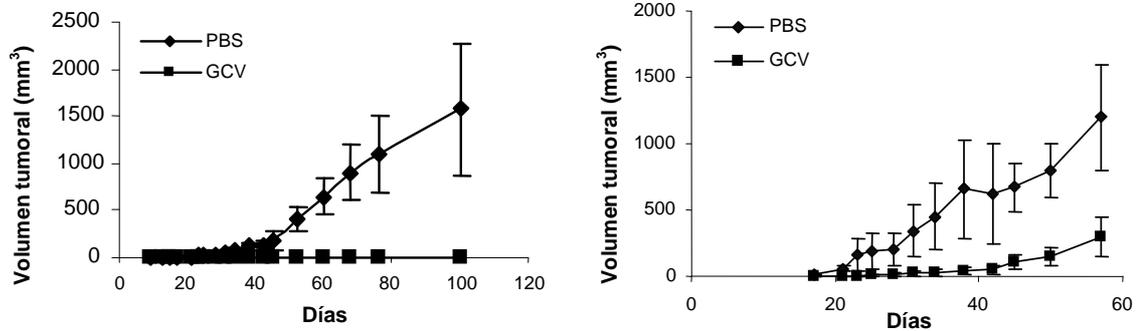


Fig. 6 (d)

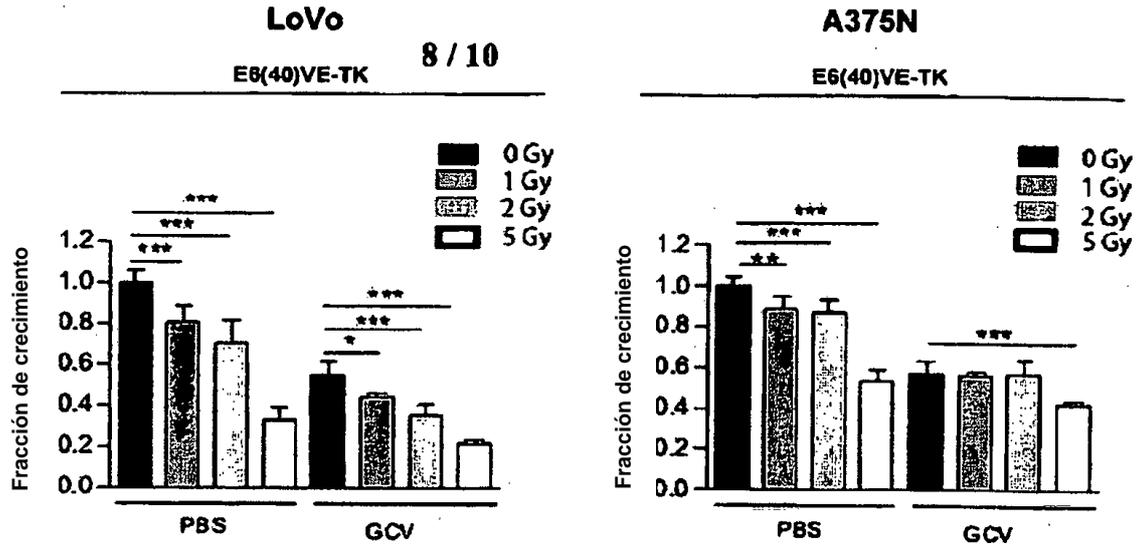


Fig. 7 (a)

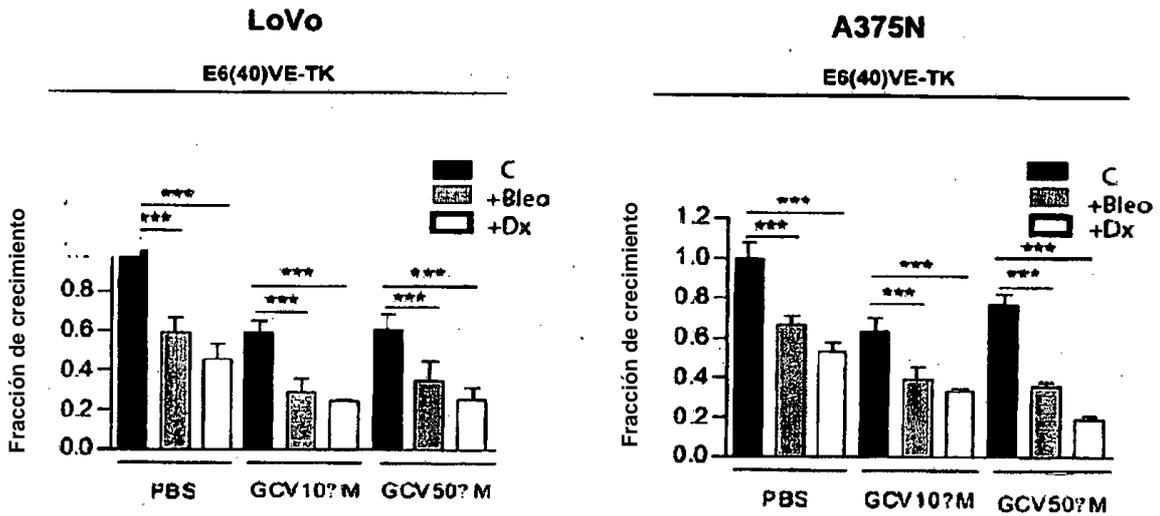


Fig. 7 (b)

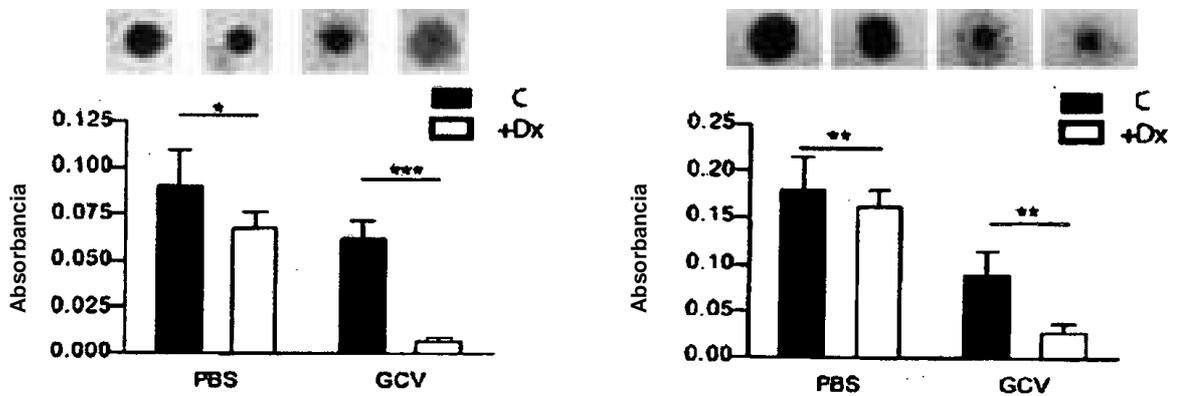


Fig. 7 (c)

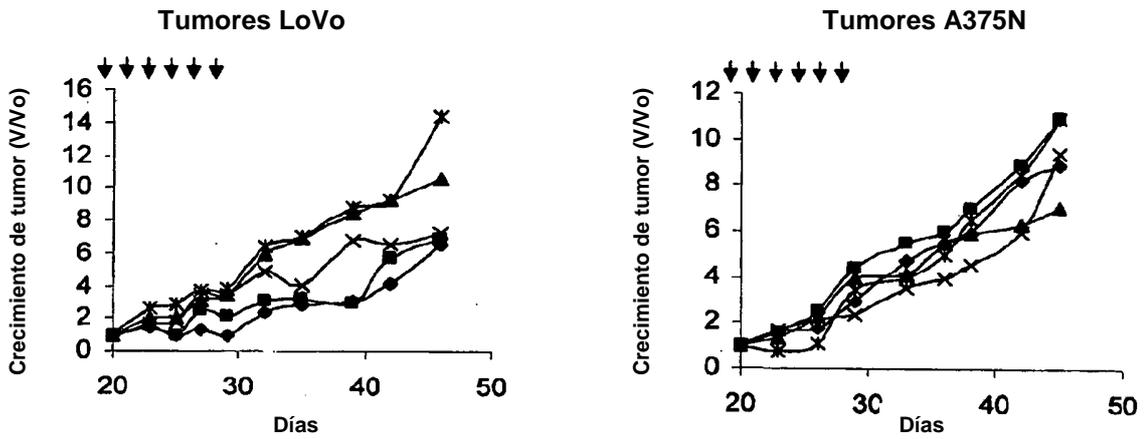


Fig. 8 (a)

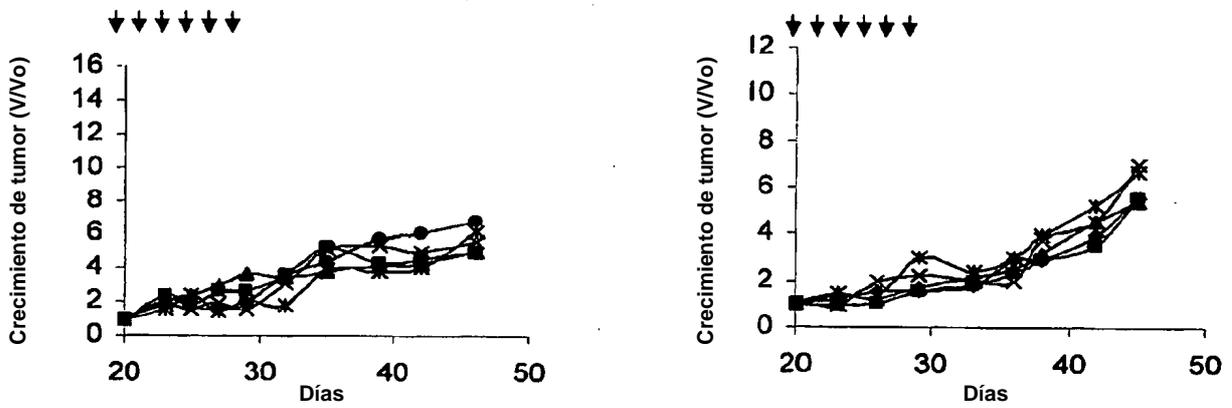


Fig. 8 (b)

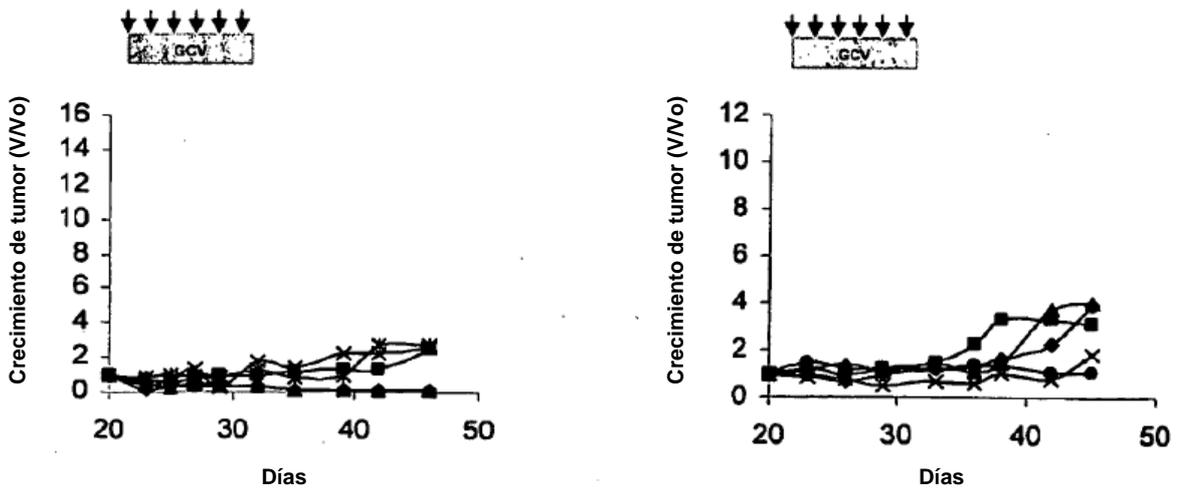


Fig. 8 (c)

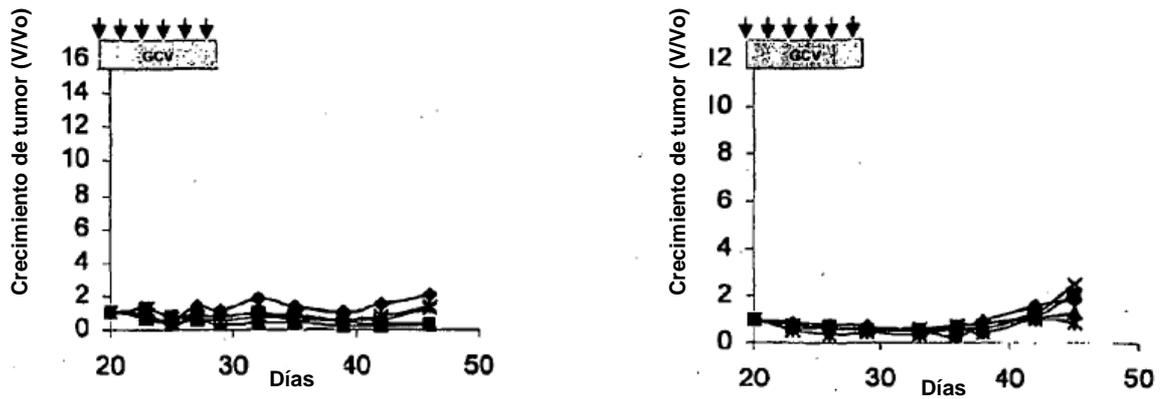


Fig. 8 (d)



Tumores de A375N tratados con E6(40)VE-TK con PBS (control), Dx, GCV y GCV+Dx

Fig. 8 (e)

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es para la conveniencia del lector solamente. No forma parte del documento de patente Europeo. Aun cuando se ha tomado un gran cuidado en compilar las referencias, no pueden ser excluidos errores u omisiones y la OEP se exime de toda responsabilidad a este respecto.

Documentos de patente citados en la descripción

- US 20030082685 A, Weichselbaum [0009]
- US 5830880 A, Sedlacek [0010]
- US 20010006954 A, Weichselbaum [0013]
- US 0805327 W [0079]
- AR P070101837 [0079]

Literatura no patente citada en la descripción

- **VALKO M et al.** Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*, 2007, vol. 39 (1), 44-84 [0002]
- **WU W.** The signaling mechanism of ROS in tumor progression. *Can Met Rev*, 2006, vol. 25, 695-705 [0003]
- **HALLIWELL B.** Oxidative stress and cancer: have we moved forward?. *Biochem*, 2007, vol. 402 (1), 1-11 [0003]
- **SZAFROWSKI, T., ; NATHAN, C.** Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. *Cancer Res.*, 1991, vol. 51, 794-798 [0003]
- **POLICASTRO L. ; MOLINARI B. ; LARCHER F., ; BLANCO P. ; PODHAJECER O.L. ; COSTA C. S. ; ROJAS P. ; DURÁN H.** Imbalance of antioxidant enzymes in tumor cells and inhibition of proliferation and malignant features by scavenging hydrogen peroxide. *Mol Carcinog.*, 2004, vol. 39 (2), 103-13 [0004]
- **TOYOKUNI S. et al.** Persistent oxidative stress in cancer. *FEBS Lett.*, 1995, vol. 358, 1-3 [0004]
- **SADEGHI H ; HITT M.** Transcriptionally targeted adenovirus vectors. *Curr Gene Ther*, 2005, vol. 5 (4), 411-427 [0006]
- **XU G. et al.** Strategies for enzyme/prodrug cancer therapy. *Clin. Cancer Res.*, 2001, vol. 7, 3314-3324 [0007]
- **SHIBATA T et al.** Development of a hypoxia-responsive vector for tumor specific gene therapy. *Gene Ther.*, 2000, vol. 7, 493-498 [0007]
- **BALLINGER J.** Imaging hypoxia in tumor. *Semin Nucl Med.*, 2001, vol. 31 (4), 321-9 [0007]
- **SCHAFER G. et al.** Oxidative stress regulates vascular endothelial growth factorA gene transcription through Sp1 and Sp3 dependent activation of two proximal GC-rich promoter elements. *JBC*, 2003, vol. 278, 8190-98 [0008] [0036]
- **DATTA R. et al.** Reactive oxygen intermediates target CC(A/T)6GG sequences to mediate activation of the early growth response 1 transcription factor gene by ionizing radiation. *Proc.Natl.Acad.Sci.*, 1993, vol. 90, 2419-22 [0008] [0037]
- **NELSON K. et al.** Elevated Sod2 activity augments matrix metalloproteinase expression: evidence for involvement of endogenous hydrogen peroxide in regulating metastasis. *Clin. Cancer Res.*, 2003, vol. 9, 424-432 [0008]
- **MOOLTEN F. L.** Drug sensitivity ("suicide") genes for selective cancer chemotherapy. *Cancer Gene Ther*, 1994, vol. 1, 279-287 [0011]
- **KOSHIKAWA et al.** *Cancer Res.*, 2000, vol. 60, 2936-2941 [0012]
- **OGATA K.** Eukaryotic transcriptional regulatory complexes: cooperativity from near and afar. *Curr Opin in Structural Biology*, 2003, vol. 13, 4048 [0023]
- **CHIANG D et al.** Flexible promoter architecture requirements for coactivator recruitment. *BMC Molecular Biology*, 2006, vol. 7, 16 [0023]
- **GRECO O et al.** Gene therapy vectors containing CArG elements from the Egr1 gene are activated by neutron irradiation, cisplatin and doxorubicin. *Cancer Gene Ther.*, 2005, vol. 12 (7), 655-62 [0037]
- **SHERF, B.A.** Dual Luciferase Reporter Assay: An Advanced Co-Reporter Technology Integrating Firefly and Renilla Luciferase Assays. *Promega Notes Magazine*, 1996, 2-9 [0044]
- **DANGLES-MARIE, V. et al.** A three-dimensional tumor cell defect in activating autologous CTLs is associated with inefficient antigen presentation correlated with heat shock protein-70 down-regulation. *Cancer Res*, 2003, vol. 63 (13), 3682-7 [0065]
- **HELLER LC ; UGEN K ; HELLER R.** Electroporation for targeted gene transfer. *Expert Opin Drug Deliv*, 2005, vol. 2, 255-68 [0073]
- **GIARDINO R ; FINI M ; BONAZZI V ; CADOSI R ; NICOLINI A ; CARPI A.** Electrochemotherapy a novel approach to the treatment of metastatic nodules on the skin and subcutaneous tissues. *Biomed Pharmacother*, September 2006, vol. 60 (8), 458-62 [0073]