

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 637 244**

51 Int. Cl.:

C12N 9/16 (2006.01)

C12N 15/861 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.12.2010 PCT/US2010/059204**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.06.2011 WO11071859**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.12.2010 E 10801023 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.06.2017 EP 2510091**

54 Título: **Método y composición para aumentar los efectos terapéuticos inducidos por radiación en tumores**

30 Prioridad:

08.12.2009 US 283696 P

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

11.10.2017

73 Titular/es:

**MEMORIAL SLOAN-KETTERING CANCER
CENTER (50.0%)
1275 York Avenue
New York, NY 10065, US y
VASCULAR BIOGENICS LTD. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**KOLESNICK, RICHARD, N.;
STANCEVIC, BRANKA;
SADELAIN, MICHEL;
FUKS, ZVI;
VARDA-BLOOM, NIRA y
HARATS, DROR**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 637 244 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

Método y composición para aumentar los efectos terapéuticos inducidos por radiación en tumores

Campo de la invención

La presente invención va dirigida a un método novedoso para la radioterapia de tumores sólidos.

5 Antecedentes de la invención

Las terapias convencionales contra el cáncer (quimioterapia, cirugía, radiación) producen una tasa elevada de regresión de la enfermedad en una fase temprana, y muchos cánceres reaparecen. Además, en etapas avanzadas del cáncer, muchos pacientes mueren en último término. Como modalidad única, hay ciertas limitaciones en cada una de estas terapias que incluyen, por ejemplo, la dosis de fármacos quimioterapéuticos, el grado de resección quirúrgica posible o la dosis de radiación y el volumen que ha de ser irradiado. A menudo se logran mejores resultados cuando estas modalidades son usadas en combinación. Por ejemplo, la resección quirúrgica precedida o seguida por quimioterapia ha demostrado ser eficaz en algunos cánceres. La utilidad de la terapia de radiación puede estar limitada por varias razones, incluyendo la limitación de la dosis para evitar daños al tejido no canceroso en el campo de radiación y el desarrollo de resistencia a la radiación. Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar una terapia que pueda evitar efectos no deseados sobre células sanas a la vez que se logra el efecto deseado sobre células cancerosas y que pueda evitar el desarrollo de mecanismos de resistencia que permitan que las células cancerosas eludan los efectos de la terapia.

Hace tiempo que se viene usando la radiación ionizante como terapia para tumores sólidos. Hasta hace poco, se ha creído que la radiación ionizante actuaba exclusivamente en las células tumorales induciendo daños en el ADN celular y la muerte mitótica de la célula. Sin embargo, estudios genéticos y farmacológicos indican que la respuesta tumoral a la radiación está determinada no solo por la radiosensibilidad inherente de las propias células tumorales, sino también por la radiosensibilidad de la microvasculatura del tumor.

La esfingomielinasa ácida (ASMasa) cataliza la escisión de la esfingomielina generando ceramida, que se ha demostrado que actúa como un "segundo mensajero" en las vías de señalización celular. Diversos estímulos, incluyendo la radiación ionizante, dan como resultado la activación de la ASMasa y su translocación a la cara externa de la membrana celular. La activación de la ASMasa, inducida por estímulos, y su translocación a la cara exterior, rica en esfingomielina, de la membrana celular llevan, a su vez, a la generación de ceramida a partir de la esfingomielina. Las excepcionales propiedades biofísicas de la ceramida arbitran la reorganización de las membranas, el movimiento lateral de los lípidos y la formación de plataformas ricas en ceramidas (CRP). Las CRP, a su vez, concentran receptores y moléculas efectoras, lo que lleva a la amplificación de señales y a la transducción que desencadena la apoptosis.

Las células derivadas de individuos con la enfermedad de Niemann-Pick, una deficiencia hereditaria de la ASMasa, no llegan a generar ceramida en respuesta a estresores celulares y son resistentes a la apoptosis inducida por estrés. Asimismo, ratones deficientes en ASMasa están "protegidos" de la muerte apoptótica celular, incluyendo la arbitrada por la radiación ionizante, por linfocitos T citotóxicos activados y por citocinas.

La comparación del crecimiento y de la respuesta a la radiación ionizante de tumores implantados en ratones comunes y en ratones deficientes en ASMasa demuestra que la ASMasa y la vasculatura tumoral (derivada del anfitrión) desempeñan un papel importante, no solo en el crecimiento del tumor, sino en la respuesta del tumor a la radioterapia. Los fibrosarcomas MCA/129 y los melanomas B16F1 desarrollados en ratones deficientes en ASMasa resistentes a la apoptosis presentan una apoptosis endotelial microvascular de referencia marcadamente reducida y se desarrollan de un 200% a un 400% más rápido que los tumores desarrollados en ratones comunes. Además, los tumores desarrollados en ratones deficientes en ASMasa presentan una apoptosis endotelial reducida en respuesta a la radiación y, a diferencia de los tumores desarrollados en ratones comunes, son resistentes a radioterapia de dosis única en todas las dosis de radiación objeto de ensayo. Así, la apoptosis microvascular arbitrada por ASMasa regula el crecimiento tumoral y regula la respuesta del tumor a la radiación en intervalos de dosificación clínicamente relevantes.

Compendio de la invención

La presente divulgación se refiere a métodos y composiciones para tratar el cáncer. En algunas realizaciones, puede proporcionarse al menos un fragmento de un gen para alterar los niveles de una proteína. El gen puede ser administrado a la célula o a las células de interés usando un vector (viral o no viral), y la expresión de la proteína puede dar como resultado un efecto terapéutico. El vector (o también múltiples vectores, cada uno de los cuales codifica al menos una porción de un gen) también puede administrar fragmentos de uno o más genes. En una realización, los métodos usados para alterar la expresión génica pueden ser usados para tratar el cáncer u otras enfermedades proliferativas. En otras realizaciones, se incluyen características que dirigen el vector a su diana. En realizaciones adicionales, la composición y el método emplean un promotor/potenciador específico al endotelio angiogénico para aumentar los niveles de ASMasa en la neovasculatura del tumor. Pueden añadirse características adicionales al vector para la potenciación de su eficacia terapéutica o para mejorar la seguridad. La administración

se puede lograr mediante cualquier método conocido por un experto, incluyendo, sin limitación, inyección o perfusión intravenosa, administración oral, tratamiento *ex vivo*, inyección local o transfección o transducción. Tal administración puede incluir la administración solo o en combinación con otros vehículos, adyuvantes, diluyentes o ingredientes farmacéuticamente activos.

- 5 Aunque las células endoteliales sintetizan 20 veces la cantidad de ASMasa de cualquier otro tipo de célula investigada del cuerpo, fundamentalmente en una forma secretora no lisosomal, los niveles mayores de ASMasa sensibilizan las células endoteliales a la apoptosis inducida por radiación y, por ello, mejoran la respuesta del tumor a la radioterapia. Al aumentar la eficacia de la radioterapia sin correr el riesgo de lesiones en el tejido normal, los métodos y las composiciones dados a conocer expanden el beneficio de la radioterapia a tumores sólidos
10 resistentes a la radioterapia convencional de dosis fraccionadas y vuelven viables los planteamientos de una radioterapia de dosis única con dosis de radiación más bajas.

En la presente memoria se da a conocer un vector de expresión reivindicado en la reivindicación 1. En otra realización, las secuencias reguladoras transcripcionales específicas al endotelio angiogénico son seleccionadas del grupo constituido por promotores y potenciadores.

- 15 En otra realización, el promotor es promotor preendotelina-1 o modificaciones del mismo. En otra realización, el promotor es PPE-1(x3). En otra realización, el potenciador es potenciador HIF2a-Ets-1.

- En una realización dada a conocer en la presente memoria, se proporciona el vector de expresión de la invención, que es usado en un método para tratar el cáncer aumentando los daños inducidos por la radiación a un tumor sin aumentar los efectos secundarios inducidos por la radiación, que comprende aumentar los niveles de ASMasa secretora específicamente en el endotelio tumoral e inducir la apoptosis de las células endoteliales tumorales
20 tratando el tumor con radiación.

- En otra realización, el cáncer es un tumor sólido. En otra realización, el aumento en las lesiones inducidas por la radiación causadas al cáncer sin un aumento en los efectos secundarios inducidos por la radiación se logra sensibilizando el tumor a la radiación. En otra realización, el aumento en las lesiones inducidas por la radiación
25 causadas al cáncer sin un aumento en los efectos secundarios inducidos por la radiación se logra sensibilizando el epitelio angiogénico del tumor a la radiación.

- En otra realización adicional, los niveles de ASMasa secretora son incrementados específicamente en el endotelio tumoral mediante la administración de un constructo de terapia génica. En una realización, el constructo de terapia génica es el constructo que comprende una región que codifica una ASMasa secretora funcional ligada a secuencias reguladoras transcripcionales que confieren la expresión específica al tejido de la ASMasa secretora
30

En otra realización, los niveles de ceramida son incrementados específicamente en el endotelio tumoral mediante la administración del constructo de terapia génica.

Descripción de las figuras

- 35 El presente fichero de patente o solicitud contiene al menos un dibujo realizado en color. La Oficina proporcionará ejemplares de esta patente o publicación de solicitud de patente con uno o varios dibujos en color, previa solicitud y pago de la cantidad necesaria.

- La FIG. 1 representa un diagrama esquemático de los vectores adenovirales específicos al endotelio dados a conocer. Los constructos fueron diseñados para dirigir la expresión génica como diana específicamente al endotelio y para potenciar más la expresión génica diana en condiciones hipóxicas como las características de los tumores.
40 Cada casete contiene un potenciador inducible por hipoxia, HIF2α-Ets-1 (132 pb), y un promotor modificado de preendotelina murina, PPE-1(3x) (1,5 kb), que controlan la expresión de la proteína fluorescente verde (GFP) (2,25 kb) (FIG. 1A) o de la ASMasa (3,55 kb) (FIG. 1B). Los casetes que contienen el potenciador, el promotor y el gen seleccionado como diana fueron insertados dentro de un genoma de serotipo 5 de adenovirus de duplicación defectuosa para generar Ad5HEPPE-3x(GFP) o Ad5HEPPE-3x(ASM).

- 45 La FIG. 2 representa la inducción de la expresión de GFP en células endoteliales después de la infección con Ad5HEPPE-3x(GFP). Se infectaron células endoteliales (BAEC, HUVEC y HCAEC) y células no endoteliales (HeLa) con Ad5HEPPE-3x(GFP). Se midió mediante citometría de flujo la expresión de GFP en células vivas siguiendo el desprendimiento 72 horas después de la infección (multiplicidad de infección [MOI] = 5). Los datos son representativos de tres experimentos independientes.

- 50 La FIG. 3 muestra que la infección con Ad5HEPPE-3x(GFP) produce una expresión de GFP máxima durante al menos 7 días y no induce toxicidad. Se infectaron BAEC con Ad5HEPPE-3x(GFP) con un MOI de 1 (FIGURAS 3A y 3B), 5 (FIG. 3B) y 10 (FIG. 3B). La expresión de GFP fue medida mediante citometría de flujo en células vivas en diversos puntos de tiempo con posterioridad a la infección (FIG. 3A). Se reunieron datos (media ± SE) de tres experimentos independientes. Se midió mediante citometría de flujo la viabilidad en células no permeabilizadas por medio de la incorporación de 7 AAD (FIG. 3B). Las células inviables fueron identificadas como positivas a la 7 AAD
55

(cuadrantes derechos superior e inferior) mediante análisis por FlowJo. Los datos son representativos de tres experimentos independientes.

5 La FIG. 4 muestra que la sobreexpresión de ASMas^a lleva a un aumento en la actividad de la ASMas^a tanto lisosomal, independiente de Zn²⁺, como secretora, dependiente de Zn²⁺. Se recogieron homogenatos celulares y medios acondicionados libres de suero procedentes de BAEC infectadas con Ad5Empty o Ad5HEPPE-3x(ASM) y sometidas a ensayo en busca de actividad de la ASMas^a. La actividad de la ASMas^a fue determinada a un pH de 5,0 usando [¹⁴C]esfingomielina como sustrato en presencia de 1 mM de EDTA (homogenatos celulares) o 0,1 mM de Zn²⁺ (medios acondicionados) (FIG. 4A). La dependencia de la actividad de la ASMas^a con respecto a la adición extracelular de Zn²⁺ fue determinada evaluando la actividad en homogenatos celulares y medios acondicionados en presencia de 1 mM de EDTA (barras blancas) o 1 mM de Zn²⁺ (barras negras) (FIG. 4B). Se reunieron datos (media ± SE) de tres experimentos independientes llevados a cabo por triplicado.

10 La FIG. 5 muestra que la sobreexpresión de ASMas^a lleva a un aumento inducido por la irradiación (IR) de referencia e ionizante en la generación de ceramidas y la formación de plataformas. Se estimularon BAEC, no tratada ni infectadas con Ad5Empty o Ad5HEPPE-3x(ASM), con una irradiación de 10 Gy y fueron incubadas a 37°C durante los tiempos indicados. El contenido en ceramidas fue medido usando el ensayo de diacilglicerol (DG) quinasa (FIG. 5A). Se reunieron datos (media ± SE) de dos experimentos independientes llevados a cabo por triplicado. Las células que contenían CRP, definidas como células que contenían una concentración de fluorescencia en menos del 25% de la superficie celular, fueron identificadas mediante microscopía fluorescente estándar tras tinción con anticuerpo anticeramida marcado con Texas Red (FIG. 5B). Se reunieron datos (media ± 95% CI) de tres experimentos en los que se analizaron 200 células por punto.

15 La FIG. 6 muestra que el aumento en la actividad de la ASMas^a y la generación de ceramidas radiosensibiliza las BAEC de una manera dependiente del tiempo y de la dosis. Las BAEC infectadas con Ad5Empty o Ad5HEPPE-3x(ASM) quedaron sin tratar ni estimular con una irradiación de 10 Gy en los momentos indicados después de la infección (FIG. 6A) o tres días después de la infección (FIG. 6B). La apoptosis fue evaluada mediante tinción con bisbenzimid^a 8 horas después de la estimulación (FIG. 6A) o en diversos puntos temporales después de la estimulación (FIG. 6B). Las BAEC infectadas con Ad5Empty o Ad5HEPPE-3x(ASM) fueron estimuladas con diversas dosis de irradiación, y la apoptosis fue evaluada mediante tinción con bisbenzimid^a 8 horas después de la estimulación (FIG. 6C). Se reunieron datos (media ± SE) de tres experimentos llevados a cabo por triplicado en los que se analizaron 400 núcleos por punto.

20 La FIG. 7 representa la optimización de la administración de adenovirus. Se administraron 1x10¹⁰ PFU de Ad5HEPPE-3x(GFP) a ratones portadores de melanoma B16F1 (FIG. 7A y FIG. 7B) o fibrosarcoma MCA/129 (FIG. 7C y FIG. 7D) mediante inyección intravenosa (FIGURAS 7 A-D) o intratumoral (FIG. 7A). Los tumores fueron extirpados 2-5 (FIG. 7D) o 5 (FIGURAS 7 A-D) días después de la administración del virus, y la expresión del gen indicador fue evaluada tras la inmunotinción de secciones de los tumores con GFP y MECA-32. Los datos (media ± SE) representan células endoteliales positivas a la GFP reunidas de 20 campos de uno o dos experimentos similares que emplearon al menos dos animales por grupo.

25 La FIG. 8 muestra que la administración intravenosa de Ad5HEPPE-3x(GFP) da como resultado la expresión selectiva de la GFP en el endotelio tumoral. Se administraron intravenosamente 1x10¹⁰ PFU de Ad5Empty, Ad5HEPPE-3x(GFP) o Ad5CMV(GFP) a ratones portadores de fibrosarcomas MCA/129. Cinco días después de la administración del virus, se extirparon tejidos normales (FIG. 8A) y tumorales (FIG. 8B) y se visualizó mediante microscopía fluorescente estándar la expresión de GFP tras la tinción de secciones tisulares con anticuerpos anti GFP (verdes) y anti MECA-32 (rojos). Se analizaron veinte campos por muestra. Se muestran imágenes representativas con un aumento de 20x.

30 La FIG. 9 muestra que la expresión de ASMas^a en el endotelio tumoral de ratones *asmasa*^{-/-} restaura la sensibilidad del fibrosarcoma MCA/129 a la radiación. Se administraron por vía intravenosa 1x10¹⁰ PFU de Ad5Empty o Ad5HEPPE-3x(ASM) a ratones *asmasa*^{-/-} portadores de fibrosarcoma MCA/129. Cinco días después de la administración del virus, los tumores fueron localmente irradiados con 15 Gy (FIGURAS 9A y C) o dejados sin tratar (FIGURAS 9A y B). La respuesta del fibrosarcoma MCA/129 a Ad5HEPPE-3x(ASM) y a la radioterapia de dosis única es presentada como un volumen tumoral (FIG. 9A). Se reunieron datos (media ± SE) de 5 (0 Gy) y 15 (15 Gy) animales por grupo. La respuesta del fibrosarcoma MCA/129 a Ad5HEPPE-3x(ASM) (FIGURAS 9B y C) y a la radioterapia de dosis única (FIG. 9C) es presentada como un volumen tumoral. Los tumores fueron medidos diariamente durante 40 días y dos veces por semana posteriormente.

35 La FIG. 10 muestra que la expresión de ASMas^a en el endotelio tumoral de ratones *asmasa*^{-/-} lleva a la apoptosis endotelial inducida por la radiación. Se administraron por vía intravenosa 1x10¹⁰ PFU de Ad5Empty o Ad5HEPPE-3x(ASM) a ratones *asmasa*^{-/-} portadores de fibrosarcoma MCA/129. Cinco días después de la administración del virus, los tumores fueron localmente irradiados con 15 Gy o dejados sin tratar. Se obtuvieron muestras de los tumores antes de la irradiación o 4, 6, 8 u 10 horas después de la misma, fueron fijadas en paraformaldehído, y embebidas en bloques de parafina. Las secciones tisulares fueron tincionadas con un anticuerpo endotelial específico (anti MECA-32, azul) y anticuerpos TUNEL (marrones). Secciones transversales representativas de fibrosarcoma MCA/129 de animales tratados con Ad5Empty o Ad5HEPPE-3x(ASM) y 15 Gy fueron extirpadas 6

horas después de la radiación (FIG. 10A). Los datos (media \pm SE) de cuantificación del efecto de la administración del virus sobre la apoptosis de células endoteliales inducida por la radiación 4, 6, 8 y 10 horas después de la irradiación (FIG. 10B) representan células endoteliales positivas a TUNEL cuantificadas de veinte campos con 400x aumentos de un experimento que empleó dos animales por grupo.

5 La FIG. 11 muestra que la regulación de la respuesta tumoral, arbitrada por Ad5HEPPE-3x(ASM), a la radiación no depende de la respuesta inmunológica del anfitrión. Se administraron por vía intravenosa 1×10^{10} PFU de Ad5Empty o Ad5HEPPE-3x(ASM) a ratones SCID^{-/-}asmasa^{-/-} portadores de fibrosarcoma MCA/129. Los ratones SCID^{-/-}asmasa^{+/+} portadores de fibrosarcoma MCA/129 fueron dejados sin tratar. Cuatro días después de la administración del virus, (es decir, 11 días después de la implantación de los tumores en ratones SCID^{-/-}asmasa^{+/+}), los tumores fueron localmente irradiados con 17 Gy. La respuesta del fibrosarcoma MCA/129 en los ratones SCID^{-/-}asmasa^{-/-} a la radioterapia de dosis única más Ad5HEPPE-3x(ASM) o Ad5Empty y de los ratones SCID^{-/-}asmasa^{+/+} a la radioterapia de dosis única es presentada como un volumen tumoral (FIG. 11A). Se reunieron datos (media \pm SE) de cinco animales por grupo. La respuesta del fibrosarcoma MCA/129 a Ad5Empty o Ad5HEPPE-3x(ASM) (FIG. 11B) y a la radioterapia de dosis única (FIGURAS 11B y C) es presentada como un volumen tumoral. Los tumores fueron medidos diariamente.

La FIG. 12 muestra que la sobreexpresión de ASMasa en el endotelio tumoral radiosensibiliza el fibrosarcoma MCA/129 a 14,5 Gy. Se administraron por vía intravenosa 1×10^{10} PFU de Ad5Empty o Ad5HEPPE-3x(ASM) a ratones SV129/C57^{asm+/+JAX} portadores de fibrosarcoma MCA/129. Cinco días después de la administración del virus, los tumores fueron localmente irradiados con 14,5 Gy (FIGURAS 12A y C) o dejados sin tratar (FIGURAS 12A y B). La respuesta del fibrosarcoma MCA/129 a Ad5HEPPE-3x(ASM) y a la radioterapia de dosis única es presentada como un volumen tumoral (FIG. 12A). Se reunieron datos (media \pm SE) de cinco (0 Gy) y diez (14,5 Gy) animales por grupo. La respuesta del fibrosarcoma MCA/129 a Ad5HEPPE-3x(ASM) (FIGURAS 12B y C) y a la radioterapia de dosis única (FIG. 12C) es presentada como un volumen tumoral. Los tumores fueron medidos diariamente durante 40 días y dos veces por semana posteriormente.

La FIG. 13 muestra que la sobreexpresión de ASMasa en el endotelio tumoral radiosensibiliza el fibrosarcoma MCA/129 a 17 Gy. Se administraron por vía intravenosa 1×10^{10} PFU de Ad5Empty o Ad5HEPPE-3x(ASM) a ratones SV129/C57^{asm+/+JAX} portadores de fibrosarcoma MCA/129. Cinco días después de la administración del virus, los tumores fueron localmente irradiados con 17 Gy (FIGURAS 13A y C) o dejados sin tratar (FIGURAS 13A y B). La respuesta del fibrosarcoma MCA/129 a Ad5HEPPE-3x(ASM) y a la radioterapia de dosis única es presentada como un volumen tumoral (FIG. 13A). Se reunieron datos (media \pm SE) de cinco animales por grupo. La respuesta del fibrosarcoma MCA/129 a Ad5HEPPE-3x(ASM) (FIGURAS 13B y C) y a la radioterapia de dosis única (FIG. 13C) es presentada como un volumen tumoral. Los tumores fueron medidos diariamente durante 40 días y dos veces por semana posteriormente.

La FIG. 14 muestra que la sobreexpresión de ASMasa en el endotelio tumoral radiosensibiliza el fibrosarcoma MCA/129 a 20 Gy. Se administraron por vía intravenosa 1×10^{10} PFU de Ad5Empty o Ad5HEPPE-3x(ASM) a ratones SV129/C57^{asm+/+JAX} portadores de fibrosarcoma MCA/129. Cinco días después de la administración del virus, los tumores fueron localmente irradiados con 20 Gy (FIGURAS 14A y C) o dejados sin tratar (FIGURAS 14A y B). La respuesta del fibrosarcoma MCA/129 a Ad5HEPPE-3x(ASM) y a la radioterapia de dosis única es presentada como un volumen tumoral (FIG. 14A). Se reunieron datos (media \pm SE) de cuatro (0 Gy) y cinco (20 Gy) animales por grupo. La respuesta del fibrosarcoma MCA/129 a Ad5HEPPE-3x(ASM) (FIGURAS 14B y C) y a la radioterapia de dosis única (FIG. 14C) es presentada como un volumen tumoral. Los tumores fueron medidos diariamente durante 40 días y dos veces por semana posteriormente.

La FIG. 15 muestra que la sobreexpresión de ASMasa en el endotelio angiogénico no radiosensibiliza el tracto gastrointestinal (GI). Se administraron por vía intravenosa 1×10^{10} PFU de Ad5Empty o Ad5HEPPE-3x(ASM) a ratones SV129/C57^{asm+/+JAX}. Cinco días después de la administración del virus, a los ratones se les administró una irradiación en todo el cuerpo a dosis de 8, 10, 12 y 15 Gy, o fueron dejados sin tratar. Se obtuvieron secciones transversales completas del yeyuno proximal 3,5 días después de la irradiación y la supervivencia de las criptas fue evaluada mediante el ensayo de microcolonias en criptas. Los datos derivados del cálculo de las fracciones supervivientes en cada nivel de dosis fueron recopilados de dos animales irradiados de forma concomitante, con 10-20 circunferencias puntuadas por ratón. La fracción superviviente por dosis fue calculada con el programa de soporte lógico FIT. Los datos se representan como media \pm SE.

La FIG. 16 muestra que la sobreexpresión de ASMasa a través de Ad5HEPPE-3x(ASM) lleva a la radiosensibilización de BAEC y atenúa el efecto protector del bFGF contra la apoptosis inducida por IR. Las BAEC transducidas con Ad5Empty o Ad5HEPPE-3x(ASM) fueron tratadas con diversas dosis de IR (FIG. 16A) o pretratadas con 1 ng/ml de bFGF 15 minutos antes de la estimulación con 10 Gy de IR (FIG. 16B). La apoptosis fue evaluada, mediante análisis morfológico posterior a una tinción con bisbenzimidida, a las 8 horas (FIG. 16A) o en diversos puntos temporales después de la IR (FIG. 16B). Se reunieron datos (media \pm SE) de 3 experimentos llevados a cabo por triplicado en los que se analizaron 400 núcleos por muestra.

La FIG. 17 muestra que la sobreexpresión de ASMasa en microvasculatura de los tumores lleva a un aumento en la apoptosis endotelial en tumores de fibrosarcoma MCA/129 y melanoma B16F1. Se administraron por vía intravenosa

1x10¹⁰ PFU de Ad5Empty o Ad5HEPPE-3x(ASM) a ratones SV129/C57^{asm+/+JAX} portadores de fibrosarcomas MCA/129 (FIG. 17A) y melanomas B16F1 (FIG. 17B). Cinco (FIG. 17A) o cuatro (FIG. 17B) días después de la administración del virus, los tumores fueron localmente irradiados con 14,5, 17 Gy y 20 Gy (FIG. 17A) o 34 y 41 Gy (FIG. 17B), y la apoptosis fue cuantificada tras una inmunotinción TUNEL/Meca-32. Los datos (media ± SE) representan células endoteliales positivas a TUNEL de 20 campos con 400x aumentos de un experimento que empleó 2 animales por grupo.

La FIG. 18 muestra que la sobreexpresión de ASMasa en el endotelio tumoral radiosensibiliza el melanoma B16F1. Se administraron por vía intravenosa 1x10¹⁰ PFU de Ad5Empty o Ad5HEPPE-3x(ASM) a ratones SV129/C57^{asm+/+JAX} portadores de melanomas B16F1. Cuatro días después de la administración del virus, los tumores fueron localmente irradiados con 34 (FIG. 18A) y 41 Gy (FIG. 18B). La respuesta del melanoma B16F1 al tratamiento con Ad5Empty (líneas negras) o Ad5HEPPE-3x(ASM) (líneas grises) y a la IR es presentada como un volumen tumoral. Los tumores fueron medidos diariamente hasta los 40 días y dos veces por semana posteriormente. La regresión de los tumores fue confirmada mediante biopsia local.

Descripción detallada de la invención

La ceramida es una N-acilesfosfingosina consistente en un ácido graso ligado a un grupo amino de la base esfingolípida, la esfingosina. En la naturaleza, se encuentran ceramidas con ácidos grasos de longitudes diversas, que contienen de 2 a 28 átomos de carbono. Dependiendo del tipo de célula y del estímulo, se puede generar ceramida ya sea a través del catabolismo de la esfingomielina, dependiente de la esfingomielinasa (SMasa), a través de una vía *de novo* sintética o a través de una vía sintética de ahorro. Las SMasas son formas especializadas de la fosfolipasa C que escinden el enlace fosfodiéster de la esfingomielina para generar ceramida. Han sido identificadas tres SMasas, distinguibles por sus valores óptimos de pH, dependencia iónica y localización subcelular diferentes.

Biológicamente, la ceramida actúa como un segundo mensajero en vías omnipresentes de señalización, conservadas evolutivamente, que incluyen la apoptosis, la detención de crecimiento, la senescencia y la diferenciación. La mayor parte de la atención se ha centrado en el papel de la ceramida en la apoptosis inducida por estrés, ya que se observan niveles mayores de ceramidas antes de las manifestaciones bioquímicas y morfológicas de la apoptosis en varios sistemas celulares. La adición de ceramida o esfingomielinasa exógena, así como de agentes farmacológicos que interfieren en las enzimas que catalizan la descomposición de la ceramida, imita los efectos de los estímulos de estrés y la apoptosis. Además, las células extraídas de sujetos con la enfermedad de Niemann-Pick, una deficiencia hereditaria de la actividad de la ASMasa, presentan anomalías en la apoptosis inducida por estrés que soportan el papel de generación de ceramida y ASMasa en la apoptosis. Por último, en el *Saccharomyces cerevisiae* se ha demostrado el papel de la ceramida, conservado evolutivamente, en la señalización de respuesta al estrés. Tras someterse a calentamiento, los mutantes de *S. cerevisiae* incapaces de una generación rápida de ceramida no se adaptan a temperaturas elevadas ni se desarrollan en ellas, al contrario que sus homólogos de la cepa de referencia. La adición exógena de ceramida da marcha atrás a este fenotipo, lo que sugiere que la señalización de ceramida puede constituir una respuesta programada al estrés que es evolutivamente anterior a la apoptosis.

La ASMasa es la SMasa mejor caracterizada, que resulta estar vitalmente implicada en muchas formas de activación celular y de reorganización de las membranas arbitrada por ceramidas. Aunque en origen se consideraba que la ASMasa era estrictamente lisosomal por su óptimo de pH a 4,5 - 5,0, ahora se sabe que la ASMasa también se localiza en las vesículas secretoras en la membrana plasmática. Dado que el pH solo regula la tasa de activación y desactivación del sustrato, no la actividad catalítica de la enzima, la ASMasa también puede hidrolizar esfingomielina en el pH neutro encontrado en la superficie celular, aunque con menor eficacia. Además, la enzima existe en dos formas, denominadas SMasa lisosomal (L-ASMasa) y SMasa secretora (S-ASMasa), que difieren en su patrón de glicosilación y en su procesamiento NH₂-terminal, y, por ende, en su localización subcelular. Sin embargo, la L-ASMasa y la S-ASMasa están derivadas del mismo gen y de un mismo precursor proteínico común de 629 aminoácidos.

Los estudios han aportado pruebas de que, además de producir lesiones en el ADN, la radiación ionizante puede actuar sobre las membranas celulares para iniciar la muerte apoptótica en algunas células. Datos genéticos, bioquímicos y biológicos celulares han establecido un papel vital para la generación de ceramidas arbitrada por ASMasa en la apoptosis inducida por radiación, en particular en células endoteliales *in vitro* e *in vivo*. Los presentes inventores han desarrollado un sistema de administración adenoviral para sobreexpresar la ASMasa humana específicamente en el endotelio *in vitro* e *in vivo*. Se logró la especificidad tisular usando un promotor modificado de la preproendotelina-1, PPE-1(3x), que conduce a una expresión preferencial en células endoteliales angiogénicas. Estos constructos aumentan la expresión del gen diana en células endoteliales *in vitro* con mínima expresión en células de origen no endotelial. Los estudios de cultivos celulares demuestran que la sobreexpresión de la ASMasa arbitrada por PPE-1(3x) da como resultado una mayor actividad de la ASMasa secretora y lisosomal, con un aumento concomitante en la generación de ceramida y formación de CRP, y esa sobreexpresión de la ASMasa lleva a un aumento en la apoptosis endotelial inducida por radiación en una forma dependiente del tiempo y de la dosis, lo que proporciona una constatación preliminar de que ASMasa radiosensibiliza el endotelio. La ASMasa, y presumiblemente las CRP, arbitran la apoptosis microvascular en respuesta a la irradiación y, a su vez, en la respuesta tumoral a la radioterapia de dosis única. La lesión apoptótica endotelial microvascular en fase temprana

arbitrada por la ASMas es imprescindible para la regresión tumoral. Por lo tanto, restaurar o amplificar la actividad de la ASMas y la formación de CRP en el endotelio radiosensibilizaría los tumores. La sobreexpresión de la ASMas más allá de los niveles fisiológicos en el endotelio tumoral de la forma natural de SV129/C57BL/6 dio como resultado una mayor respuesta tumoral a la radiación, lo cual llevó a un aumento en la regresión tumoral de una forma dependiente de la dosis. Por lo tanto, modular la señalización de ceramidas por regulación genética al alza de la ASMas dentro de la vasculatura de tumores puede radiosensibilizar estos tumores, mejorando la respuesta tumoral.

Por lo tanto, en la presente memoria se dan a conocer agentes reguladores de la ASMas al alza, tales como el constructo dado a conocer de regulación de la ASMas al alza.

En una realización adicional, el constructo de regulación de la ASMas al alza puede ser dirigido contra el tumor, tal como contra la vasculatura tumoral, por la asociación del constructo de regulación de la ASMas al alza con una molécula de direccionamiento, tal como un anticuerpo monoclonal específico para un marcador tumoral.

En una realización, la administración del agente de regulación de la ASMas al alza dado a conocer en la presente memoria reducirá la cantidad de radiación necesaria para tratar el tumor en comparación con la cantidad de radiación necesaria en ausencia del constructo.

En otra realización, la administración del agente de regulación de la ASMas al alza dado a conocer en la presente memoria, junto con al menos una dosis de radiación, causará la regresión de al menos un tumor o este disminuirá en su carga tumoral.

El agente de regulación de la ASMas al alza dado a conocer en la presente memoria es administrado de forma que entre en las células del paciente y dé como resultado que la ASMas sea regulada al alza en las células endoteliales tumorales (endotelio/vasculatura tumoral). El agente de regulación de la ASMas al alza puede ser administrado a pacientes o a animales experimentales con un diluyente, vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable en forma posológica unitaria. Puede emplearse la práctica farmacéutica convencional para proporcionar formulaciones o composiciones adecuadas para administrar tales composiciones a pacientes o animales experimentales. Aunque se prefiere la administración intravenosa, puede emplearse cualquier vía apropiada de administración; por ejemplo, la administración parenteral, subcutánea, intramuscular, intracraneal, intraorbital, oftálmica, intraventricular, intracapsular, intraespinal, intracisternal, intraperitoneal, intranasal, en aerosol o tópica (por ejemplo, aplicando un parche adhesivo que contenga una formulación capaz de atravesar la dermis y de entrar en el torrente sanguíneo). Las formulaciones terapéuticas pueden estar en forma de soluciones o suspensiones líquidas; y las formulaciones intranasales, en forma de polvos, gotas nasales o aerosoles. Cualquiera de las anteriores formulaciones puede ser una formulación liberación sostenida.

En otra realización, el agente de regulación de la ASMas al alza es administrado por una bomba. Tales bombas están disponibles comercialmente, por ejemplo, en Alzet (Cupertino, California) o Medtronic (Mineápolis, Minnesota). La bomba puede ser implantable. Otra manera conveniente de administrar el agente de regulación de la ASMas al alza es usar una cánula o un catéter.

En los métodos dados a conocer, la radiación es administrada en una o más dosis individuales en la cantidad de 0,1-30 Gy, alternativamente de 0,2-24 Gy o 0,3-16 Gy, pero no siempre limitado a esas cantidades, y puede ser regulada por un médico con experiencia en consideración de la edad, la altura y el peso de un paciente, de la gravedad de la enfermedad, del área diana y de la excreción.

Un método de radiosensibilización descrito en la presente memoria puede incluir la radiación producida por un haz de rayos X o un haz de electrones producidos por un acelerador lineal. La radioterapia prevista en los presentes métodos puede llevarse a cabo a través de un protocolo que generalmente se emplea en este campo técnico y que es conocido para los expertos en la técnica. Por ejemplo, la radioterapia incluye la radiación de cesio, iridio o cobalto. La radioterapia puede ser radiación sistémica (para la leucemia aguda, el linfoma maligno y ciertos tipos de cáncer sólido), pero, preferentemente, está localmente enfocada en el o los sitios; es decir, los sitios con tumores y los tejidos con cánceres sólidos (abdomen, pulmón, hígado, nódulos linfáticos, cabeza, etc.). La radioterapia del presente método es administrada después de la radiosensibilización (administración del agente de regulación de la ASMas al alza), con al menos una dosis de radiación por dosis de radiosensibilizador. En realizaciones alternativas, el agente de regulación de la ASMas al alza puede ser administrado múltiples veces en el curso de la terapia de un paciente.

En otra realización, el método puede comprender, además, la administración de un agente antitumoral, incluyendo, sin limitación, fármacos que contienen platino, fármacos de taxano, fármacos alcaloides de la vinca, inhibidores de la topoisomerasa, antimetabolitos y agentes alquilantes. Ejemplos más específicos incluyen una o más especies de cisplatino, carboplatino, oxaliplatino, paclitaxel, docetaxel, vincristina, vinblastina, vinorelbina, vindesina, clorhidrato de irinotecán, topotecán, etopósido, tenipósido, doxorubicina, fluorouracilo, tegafur, doxifluridina, capecitabina, gemcitabina, citarabina, metotrexato, pemetrexed, ciclofosfamida, adriamicina y mitomicina. Cuando dichos agentes antitumorales adicionales son empleados en combinación, se toman en consideración la edad, el sexo, el grado del síntoma y los efectos adversos de los pacientes, la contraindicación tras la mezcla, etc.

EJEMPLOS**Materiales y métodos**

Cultivo y estimulación celulares. Se cultivaron células endoteliales de venas umbilicales humanas (HUVEC) y células endoteliales de arterias coronarias humanas (HCAEC), obtenidas en Cambrex, en un medio de EBM-2 complementado con suplemento SingleQuot EGM-2 o EGM-2 MV, respectivamente (Cambrex) a 37°C en una cámara humectada de CO₂ al 5%. Se cultivaron células HeLa, obtenidas de la Colección de Cultivos de Tipo Estadounidense (ATCC), en DMEM complementado con un 10% de suero fetal bovino (FBS), 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina y 2 mM de L-glutamina a 37°C en una cámara humectada de CO₂ al 5%. Se cultivaron poblaciones clonadas de células endoteliales aórticas bovinas (BAEC) en DMEM complementado con un 5% de suero bovino normal (NCS), 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina y 2mM de L-glutamina a 37°C en una cámara humectada de CO₂ al 10%. Tras alcanzar la confluencia, las células fueron cultivadas en DMEM complementado con un 2% de NCS durante una semana como mínimo. Antes de los experimentos con irradiación, las BAEC fueron preincubadas durante 18 horas en un DMEM que contenía un 0,2% de albúmina humana. La irradiación de células cultivadas se llevó a cabo en un irradiador Shepherd Mark I que contenía una fuente de ¹³⁷Cs a una tasa de 2,08 Gy/minuto. Para experimentos que implicaban el examen de eventos producidas en menos de 10 minutos, la irradiación se llevó a cabo más cerca de la fuente de ¹³⁷Cs a una tasa de 13,1 Gy/minuto.

Cuando se indica, las células fueron preincubadas 15 minutos antes de la irradiación con anticuerpo MID15B4 (Alexis Biochemicals) anticeramida monoclonal murino a razón de 1 µg/ml. En cada estudio, se tincionó una parte alícuota de células con azul de tripano para evaluar la viabilidad.

Cuantificación de la apoptosis. La apoptosis fue evaluada *in vitro* examinando cambios morfológicos en la cromatina nuclear. Las células estimuladas fueron fijadas con paraformaldehído al 2%, lavadas con solución salina con tampón de fosfato (PBS), y tincionadas con 100 µl de una solución de 24 µg/ml de triclorhidrato de bisbenzimidá (Hoechst nº 33258) durante 10 minutos. Los cambios morfológicos de la apoptosis nuclear, incluyendo la condensación, la segmentación y la compactación de la cromatina, a lo largo de la periferia del núcleo o la aparición de cuerpos apoptóticos, fueron cuantificados usando un microscopio de fluorescencia Axiovert S-100 Zeiss. Se examinaron, como mínimo, 400 células por punto.

La apoptosis fue cuantificada *in vivo* en el endotelio de muestras tumorales tras la tinción de marcado del extremo libre con trifosfato de desoxiuridina arbitrado por desoxitransferasa terminal (TUNEL). Fueron evaluados varios marcadores endoteliales diferentes para su uso en secciones embebidas en parafina de 5 µm en combinación con TUNEL; la mejor relación señal-ruido se logró con un anticuerpo monoclonal contra el marcador de superficie de células endoteliales MECA-32 (Developmental Studies Hybridoma Bank, The University of Iowa, Iowa).

Detección de plataformas ricas en ceramida. Las plataformas fueron detectadas según se ha descrito con anterioridad (Rotolo, J.A., *et al.*, Caspase-dependent and -independent activation of acid sphingomyelinase signaling. *J Biol Chem*, 2005. 280:26425-34). Sucintamente, se desprendieron BAEC confluentes por incubación con PBS complementado con un 0,1% de colagenasa, un 0,02% de EDTA y un 0,5% BSA a 37°C durante 5 minutos. Las células desprendidas fueron dispersadas mecánicamente con delicadeza para obtener una única suspensión celular y resuspendidas a razón de 0,5x10⁶/ml en DMEM complementado con un 0,2% de albúmina humana. Las células endoteliales tumorales, tras su elución de la columna de separación MACS, fueron lavadas con PBS y resuspendidas a razón de 0,3x10⁶/ml en DMEM complementado con un 0,2% de albúmina humana. Tras su estimulación con irradiación, las células fueron incubadas a 37°C los periodos de tiempo indicados y fijadas con paraformaldehído al 2% durante 15 minutos a 4°C. Antes de la tinción, los sitios no específicos fueron bloqueados mediante incubación en PBS que contenía un 2% FBS durante 20 minutos. Tras un lavado con PBS, las células fueron tincionadas, en busca de ceramida superficial o ASMasa superficial, usando un anticuerpo MID 15B4 IgM anticeramida monoclonal murino (disolución 1:50, Alexis Biochemicals) o un anticuerpo 1598 anti ASMasa policlonal de conejo (disolución 1:100), respectivamente, durante 1 hora a 4°C. Como controles isotópicos se usaron IgM de ratón o IgG de conejo irrelevantes. Tras tres lavados con PBS que contenía un 0,05% de Tritón X-100, las células fueron tincionadas para la detección de CRP con IgM antiratón conjugada con Texas Red o IgG anticonejo conjugada con Cy3 (disolución 1:300, Roche Molecular Biochemicals), respectivamente, durante 1 hora a 4°C. Por último, las células fueron lavadas tres veces en PBS que contenía un 0,1% de Tritón X-100 y montadas en un medio de montaje fluorescente (Dako). La fluorescencia fue detectada usando un microscopio de fluorescencia Axiovert S-100 Zeiss equipado con una cámara digital SPOT. El porcentaje de células que contenían plataformas —es decir, aquellas en las que la fluorescencia se condensaba en menos del 25% de la superficie celular— se determinó contando 150-250 células por punto.

El anticuerpo 1598 anti ASMasa policlonal de conejo fue generado contra la proteína de la ASMasa humana marcada con FLAG de longitud entera. El antisuero fue purificado en una columna BIO-RAD T-Gel para obtener una fracción de IgG que presenta inmunorreactividad específica en la prueba de inmunotransferencia a una concentración de 100 ng/µl hacia 100 ng de ASMasa humana recombinante purificada o ASMasa procedente de 25 µg de lisatos de células Jurkat. A una concentración de 200 µg/µl, el anticuerpo 1598 inmunoprecipita cuantitativamente la actividad de la ASMasa derivada de 100 ng de ASMasa purificada, y a una concentración de

200 ng/μl detecta por citometría de flujo o microscopía de inmunofluorescencia confocal la expresión en la superficie celular de la ASMas.

Cuantificación de la ceramida. Se incubaron BAEC, estimuladas con radiación ionizante (IR), durante los tiempos indicados, a 37°C. La estimulación terminó poniendo las células en hielo. Subsiguientemente, las células fueron lavadas dos veces con PBS frío, y se extrajeron los lípidos por adición de células raspadas en metanol en un volumen igual de cloroformo y un volumen de 0,6 de solución salina tamponada/solución de EDTA (135 mM de NaCl, 4,5 mM de KCl, 1,5 mM de CaCl₂, 0,5 mM de MgCl₂, 5,6 mM de glucosa, 10 mM de HEPES de pH 7,2, 10 mM de EDTA). La ceramida fue cuantificada usando el ensayo de diacilglicerol (DG) quinasa.

Medición de la actividad de la ASMas. La actividad de la ASMas fue cuantificada en BAEC mediante un ensayo radioenzimático que usa [¹⁴C-metilcolina]esfingomielina (Amersham Biosciences) como sustrato, según se ha descrito con modificaciones de poca importancia (Schissel, S.L., *et al.*, Zn²⁺-stimulated sphingomyelinase is secreted by many cell types and is a product of the acid sphingomyelinase gene. *J Biol Chem*, 1996. 271:18431-6). Sucintamente, tras la estimulación, las células fueron puestas en hielo en los puntos temporales indicados. El medio acondicionado que contenía proteínas segregadas durante un periodo de 18 horas fue recogido, filtrado en una malla de filtro de 40 μm (BD Falcon) y concentrado 10 veces usando un concentrador Amicon Ultracel-30 (Millipore) (corte de peso molecular, 30.000). Las células fueron lavadas con PBS helado y subsiguientemente lisadas en PBS que contiene un 0,2% de Tritón X-100. Para evaluar la actividad, se incubaron sobrenadantes posnucleares o medios acondicionados con el sustrato en 250 mM de acetato sódico, con un pH de 5,0, complementado con un 0,1% de Tritón X-100 y 1 mM de EDTA (homogenatos celulares) o 0,1 mM de ZnCl (medios acondicionados). Subsiguientemente, según se indica en las claves de las figuras, se usaron diferentes combinaciones de EDTA y ZnCl para determinar la dependencia de la actividad de la ASMas celular o segregada en el Zn²⁺ extracelular. Las reacciones se terminaron después de 1 hora con CHCl₃:MeOH:1N HCl (100:100:1, v:v:v), y el producto fue cuantificado con un contador de centelleo Beckman Packard 2200 CA Tricarb.

Expresión superficial de la ASMas. Se desprendieron BAEC de placas de cultivo tisular según se ha descrito para la detección de CRP, y la actividad de la ASMas fue evaluada mediante análisis citométrico de flujo. Tras el desprendimiento y un lavado con PBS helado, los sitios no específicos fueron bloqueados por medio de una incubación de 15 minutos con bloque CD16/CD32 FcR (BD Biosciences). Las células fueron relavadas, incubadas durante 45 minutos con 1 μg/ml de IgG de conejo de control isotípico o anticuerpo 1598 anti ASMas policlonal en PBS complementado con un 0,5% de FBS, seguido por lavado e incubación con IgG anticonejo conjugada con Cy3 en PBS complementado con un 0,5% de FBS. Fueron analizadas 20.000 células en un citómetro de flujo FACScan (BD Biosciences) con soporte lógico CellQuest (Becton Dickinson).

Preparación de adenovirus recombinantes de réplica deficiente HEPPE-3x(GFP) y HEPPE-3x(ASM). El promotor de preproendotelina-1 murina 3x (PPE-3x) fue ligado al sitio de restricción BamHI/NotI del vector lanzadera. Subsiguientemente, el potenciador de HIF2α-Ets-1 fue ligado al sitio de restricción HindIII del vector lanzadera corriente arriba del promotor PPE-1(3x). El gen de la ASM humana (número de acceso M59916), partiendo de PCMV1 (ASM) (Genzyme) y el gen de la GFP (número de acceso U55761), partiendo de pEGFP-1 (Clontech), fueron ligados corriente abajo del casete del potenciador de HIF2α-Ets-1 o del promotor PPE-1(3x) dentro del vector lanzadera. Por último, el casete de HIF2-Ets-2α/PPE-1(3x)/hASM o de HIF2-Ets-2α/PPE-1(3x)/GFP fue subclonado en el sitio de restricción Mlu-1 generado dentro del MCS del vector pVQAs-NpA (Viraquest, Inc). Los adenovirus recombinantes (serotipo 5) de réplica deficiente denominados Ad5HEPPE-3x(GFP) o Ad5HEPPE-3x(ASM) fueron preparados usando el sistema RAPAd.I. El material viral se almacenó a -80°C con una concentración de 10⁹-10¹¹ unidades formadoras de placas/ml (PFU/ml).

Los adenovirus usados como control vectorial vacío, Ad5Empty, o como control no específico a tejidos, Ad5CMV(GFP), se compararon en Viraquest Inc.

Infecciones de adenovirus *in vitro*. Fueron contadas con cuidado células BAEC (100.000 células/pocillo), HUVEC, HCAEC y HeLa (70.000 células/pocillo) y colocadas en placas tratadas de cultivo tisular de 12 pocillos 24 horas antes de la infección. Antes de su colocación en placas, las células fueron resuspendidas en sus respectivos medios de cultivo, según se ha indicado anteriormente, complementados con un 10% de NCS (BAEC) o un 10% de FBS (HUVEC, HCAEC y HeLa). Las infecciones se llevaron a cabo por incubación con 1, 5 y 10 MOI de Ad5Empty o Ad5HEPPE-3x(GFP) en un volumen total de 400 μl de medios de cultivo complementados con un 2% de NCS (BAEC) o un 2% de FBS (HUVEC, HCAEC y HeLa). Después de 12 horas, se retiraron los medios que contenían virus y las células fueron incubadas con medios de cultivo complementados con un 5% de NCS (BAEC) o un 10% de FBS (HUVEC, HCAEC y HeLa) en un volumen total de 1 ml. En los momentos indicados, las células se desprendieron mediante una incubación de 2 minutos en tripsina (Cambrex) al 0,05% y resuspendidas en PBS complementado con un 0,5% de FBS, y la expresión de GFP fue evaluada mediante análisis citométrico de flujo. Se usó tinción de viabilidad 7-AAD (BD Biosciences) para cuantificar las células muertas. Se analizaron 20.000 células en un citómetro de flujo FACScan con soporte lógico CellQuest.

Experimentos *in vivo* y en ratones. Fueron reproducidos endogámicamente ratones SV129/C57BL/6^{asm-/-} en la colonia de los inventores y fueron genotipificados usando un cebador PA2 revisado (5'-GGCTACCCGTGATATTGC-3', ID SEC N° 1), y 35 ciclos de amplificación de la PCR, cada uno a 94°C durante 15 segundos, 64°C durante 30

segundos y 68°C durante 90 segundos. Se compraron ratones machos SV129/C57BL/6^{asm+/+JAX} comunes, de 6-8 semanas de edad, en Jackson Laboratories. Los ratones fueron alojados en la instalación central para animales del Memorial Sloan-Kettering Cancer Center. Esta instalación está autorizada por la Asociación Estadounidense para la Homologación del Cuidado de Animales de Laboratorio y es mantenida según las normas y los estándares del Departamento Estadounidense de Agricultura y el Departamento de Salud y Servicios Humanos, Instituto Nacional de Salud.

Los experimentos con ratones asmata^{+/+} utilizaron como anfitriona a la cepa disponible comercialmente de ratones SV129/BL6 de Jackson Laboratories, que se denomina SV129/BL6^{JAX}. Por razones desconocidas, la cepa presenta una resistencia significativamente mayor a la apoptosis de las células endoteliales que la cepa SV129/BL6^{Ski} de crianza propia de los inventores y respuestas tumorales con corrimientos a la derecha (no mostradas). Por ende, la dosis de control tumoral del 50% (TCD50) para fibrosarcomas aumenta de ~15 Gy en anfitriones SV129/BL6^{Ski} a >30 Gy en anfitriones SV129/BL6^{JAX}, aunque no se induzca una regresión completa del melanoma en ninguno de los dos entornos. Sin embargo, la cepa SV129/BL6^{JAX} tiene la virtud de una estabilidad estricta entre lotes, ya que estos ratones comerciales son producto de cópulas heterocigóticas de cepas murinas puras SV129 y C57BL6, mientras que la colonia propagada en las instalaciones de los inventores se reproduce cruzándose como una cepa SV129/BL6 y, así, está sujeta a la deriva genética.

Las células de fibrosarcoma MCA129 y melanoma B16F1 fueron mantenidas en DMEM rico en glucosa complementado con un 10% de FBS, 100 U de penicilina/ml y 100 mg de estreptomina/ml en un 10% de CO₂ a 37°C. Las (10⁶) células fueron resuspendidas en PBS e inyectadas subcutáneamente en el costado derecho. Para experimentos de optimización de la administración de adenovirus, una vez que los tumores alcanzaron un tamaño indicado, se administraron 5x10⁹ o 1x10¹⁰ PFU de Ad5Empty, Ad5HEPPE-3x(GFP) o Ad5CMV(GFP) mediante métodos diversos. Para la administración intravenosa, se administraron 200 µl de adenovirus mediante una sola inyección en la vena de la cola. Para la administración intratumoral, los ratones fueron ligeramente sedados con ketamina (0,1 mg/g) y xilacina (0,02 mg/g), y el adenovirus fue inyectado intratumoralmente usando una microjeringa Hamilton con una aguja de calibre 26. Se usaron cuatro inyecciones, de 10 µl de virus por trayecto, para mejorar la distribución de los virus dentro de los tumores. Para su administración mediante bomba osmótica, los ratones fueron ligeramente sedados, se colocó quirúrgicamente una bomba osmótica Alzet que contenía 200 µl del adenovirus apropiado adyacente al tumor, y los tumores fueron perfundidos de forma continua con el adenovirus durante un periodo de 24 horas.

En los experimentos de radiación, se administraron por vía intravenosa 1x10¹⁰ PFU de Ad5Empty o Ad5HEPPE-3x(ASM) a ratones portadores de tumores de un tamaño de 80-100 mm³. Cinco días después de la administración del virus, se administró una dosis indicada de radiación usando una unidad de rayos X Philips MG-324 a at 105,5 cGy/minuto (distancia de 50 cm entre la fuente y la piel). Los ratones fueron ligeramente sedados con ketamina (0,1 mg/g) y xilacina (0,02 mg/g). Y únicamente fueron expuestos el tumor, la piel y los tejidos subcutáneos circundantes; el resto del ratón quedó protegido usando una estructura especializada de plomo. El volumen del tumor fue calculado diariamente en función de mediciones de calibre.

Aislamiento de células endoteliales. Las células endoteliales tumorales fueron aisladas siguiendo una modificación de una técnica publicada por García-Barros *et al.* (García-Barros, M., *et al.*, Tumor response to radiotherapy regulated by endothelial cell apoptosis. *Science*, 2003. 300:1155-9). Los tumores MCA 129/fibrosarcoma fueron diseccionados de las extremidades traseras, lavados dos veces en PBS, cortados en trocitos e incubados en un cóctel que contenía 2 mg/ml de colagenasa A (Roche), 250 µg/ml de elastasa (Roche) y 25 µg/ml de DNase I (Roche) en DMEM complementado con un 1% de FCS, 20 mM de HEPES (pH 7,4), 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina a 37°C con agitación suave. Después de 45 minutos, la digestión tumoral fue filtrada secuencialmente a través de una malla filtro de nailon (BD Falcon) de 100, 70 y 40 µm. Las muestras filtradas fueron lavadas dos veces con un 0,5% de BSA en PBS y centrifugadas a 800xg durante 5 minutos tres veces a 4°C. Las células fueron separadas en función de su densidad a través de un gradiente preformado de Percoll (Amersham Pharmacia Biotech) del 30% a 800xg durante 30 minutos a 4°C. Esta etapa elimina plaquetas y hematíes, que pueden causar la aglutinación de las perlas magnéticas. Las células en la parte superior del gradiente fueron retiradas con cuidado y lavadas dos veces con un 0,5% de BSA en PBS. Para la selección negativa, para eliminar las células hematopoyéticas, se incubaron microperlas MACS (Miltenyi Biotec Inc.), conjugadas a un anticuerpo dirigido contra el marcador CD45 de la superficie de células hematopoyéticas con la fracción obtenida del gradiente Percoll durante 15 minutos a 4°C con una disolución de 1:10, según indica el fabricante. A las columnas de separación MACS LS (Miltenyi Biotec Inc.) se les aplicó la incubación de la fracción total del gradiente Percoll, el anticuerpo y las microperlas MACS conjugadas, y la columna fue lavada con 9 ml de un 0,5% de BSA en PBS. Este procedimiento se repitió usando la perfusión para aumentar la unión específica. El análisis citométrico de flujo demostró que el 90% de las células retenidas en la columna eran positivas para el CD45. Posteriormente, la fracción efluente fue incubada con microperlas MACS conjugadas con el anticuerpo CD146 antirratón (microperlas LSEC; Miltenyi Biotec) para la selección positiva de células endoteliales tumorales (disolución de 1:10). Tras una incubación de 15 minutos a 4°C, las células fueron lavadas y aplicadas a las columnas de separación MACS LS, según se ha descrito anteriormente. Las células tumorales atraviesan la columna, mientras que las células endoteliales permanecen unidas a las perlas. Posteriormente, la columna fue desacoplada del imán, y las células endoteliales unidas a las microperlas fueron eluidas en un 0,5% de BSA en PBS y, subsiguientemente, atravesaron la columna, aumentando la unión específica. El análisis por citometría de flujo demostró que el eluido

final procedente de la columna magnética contenía un 80-90% de células endoteliales puras, basándose en la unión de los marcadores endoteliales específicos VEGFR2, CD31 (BD Biosciences) y cadherina-VE (clon Bv13, ImClone).

Cuantificación de la expresión de la GFP en los tejidos. Para comprobar la distribución celular de la GFP administrada *in vivo*, los tejidos fueron diseccionados en los momentos indicados después de una infección *in vivo*, lavados con PBS y fijados en paraformaldehído al 4% recién preparado en PBS a 4°C durante la noche. Tras ser embebidos en parafina, se obtuvieron por microtomía secciones de 5 µm de grosor, que fueron adheridas a portaobjetos tratados con polilisina y desparafinizadas por calentamiento a 90°C durante 10 minutos y a 60°C durante 5 minutos, seguido por dos lavados con xileno durante 5 minutos. Se llevó a cabo una inmunotinción automatizada (máquinas automatizadas Discovery XT) de las secciones de tejido usando 10 µg/ml de un anticuerpo anti GFP policlonal de conejo (Molecular Probes). Para cuantificar la expresión de GFP en el endotelio, los tejidos tincionados con GFP fueron tincionados subsiguientemente con 3 µg/ml de anticuerpo monoclonal contra el marcador MECA-32 de la superficie de células endoteliales (Developmental Studies Hybridoma Bank, The University of Iowa). La fluorescencia fue detectada usando un microscopio de fluorescencia Axiocvert S-100 Zeiss equipado con una cámara digital SPOT. Para cuantificar las células endoteliales positivas a la GFP, los portaobjetos inmunotincionados fueron escaneados usando el escáner Mirax y las imágenes generadas fueron analizadas usando el soporte lógico Mirax de visualización (Carl Zeiss, Inc.).

Ensayo de supervivencia de microcolonias en las criptas. El ensayo de supervivencia de microcolonias se llevó a cabo según se ha descrito previamente (Rotolo J.A., 2005). Sucintamente, se obtuvieron muestras del intestino delgado 3,5 días después de la irradiación, y se obtuvieron segmentos de 2,5 cm del yeyuno proximal a 2 cm del ligamento de Trietz y fueron fijados en paraformaldehído al 4% recién preparado en PBS a 4°C durante la noche. Tras ser embebidos en parafina, se obtuvieron por microtomía secciones transversales de tejido de toda la circunferencia yeyunal (5 µm de grosor) a partir de los bloques de parafina, adherencia a los portaobjetos tratados con polilisina y desparafinación por calentamiento a 90°C durante 10 minutos y a 60°C durante 5 minutos, seguido por dos lavados con xileno durante 5 minutos y tinción con hematoxilina y eosina según un protocolo estándar. Las criptas fueron identificadas histológicamente según los criterios establecidos por Withers y Elkind (Microcolony survival assay for cells of mouse intestinal mucosa exposed to radiation. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med*, 1970. 17:261-7). Se definió que las criptas supervivientes contenían 10 o más células no de Paneth cromofílicas adyacentes, al menos una célula de Paneth y una luz. Se usó como unidad la circunferencia de una sección transversal de los intestinos. En cada circunferencia se contó el número de criptas supervivientes. Se puntuaron de diez a veinte circunferencias por ratón, y se usaron 2-4 ratones para generar cada punto de datos.

Estadística. Los valores se expresan como media ± desviación típica, a no ser que se haga notar otra cosa. Las pruebas t de Student pareadas de dos colas fueron calculadas usando Prism v4. Se consideró que los valores P menores que 0,05 eran significativos.

Ejemplo 1

Vectores adenovirales específicos al endotelio que contienen un gen indicador, GFP, o un gen terapéutico, ASMasa

Para administrar eficazmente al endotelio genes que lo tienen como diana, se desarrollaron dos agentes adenovirales para expresar GFP [Ad5HEPPE-3x(GFP)] y ASMasa [Ad5HEPPE-3x(ASM)] en modelos tanto de cultivo celular como *in vivo*. El constructo Ad5HEPPE-3x(ASM) también es denominado Ad5H2E-PPE1-3x(ASMasa) y Ad5H2E-PPE1 (3x)-ASMasa. Ad5HEPPE-3x(ASM), Ad5H2E-PPE1-3x(ASMasa) y Ad5H2E-PPE1(3x)-ASMasa se refieren todos al mismo constructo. Se eligió el adenovirus como vehículo a causa de su afinidad con los receptores de adenovirus de Coxsackie (CAR), receptores expresados de forma omnipresente en casi todos los tipos celulares, y porque es internalizado a través de las integrinas $\alpha_v\beta_5$ y $\alpha_v\beta_3$, que presentan una alta expresión en células endoteliales angiogénicas. Además, los adenovirus son estables, tienen alta eficacia de infección y son relativamente fáciles de manipular y son producidos con titulación elevada. Se utilizó Ad5HEPPE-3x(GFP) como sistema indicador para confirmar la especificidad del agente adenoviral a células endoteliales y optimizar su administración *in vitro* y, subsiguientemente, *in vivo*. Se insertó ASMasa en el constructo viral como un gen terapéutico, generando Ad5HEPPE-3x(ASM), para estudiar si la sobreexpresión de la ASMasa daría como resultado un aumento en la sensibilidad del endotelio tumoral a la radioterapia de dosis única.

La FIG. 1 muestra una representación esquemática de los vectores adenovirales específicos al endotelio. Según se muestra en el esquema, en un serotipo 5 de adenovirus de réplica deficiente se insertó un casete que contenía un potenciador inducible de la hipoxia (HIF-2 α -Ets-1), un promotor específico al endotelio [un promotor modificado de preproendotelina-1 murina (PPE-1), PPE-1(3x)] y un gen indicador (GFP, FIG. 1A) o un gen terapéutico (ASMasa humana, FIG. 1B). Los vectores fueron diseñados para dirigir la expresión de los genes específicamente al endotelio y, más específicamente, para potenciar la expresión en las condiciones hipóxicas características de los tumores. Al principio, la PPE-1(3x), un promotor de 1,5 kb, se generaba a partir del promotor de PPE-1 de tipo natural. La expresión de genes diana controlada por el promotor PPE-1 fue 15-30 veces mayor en las células endoteliales *in vitro* que la expresión de genes diana controlada por el promotor de citomegalovirus (CMV) constitutivo. Además, la expresión de genes controlada por el promotor PPE-1 fue 60 veces mayor en líneas celulares endoteliales que en líneas celulares no endoteliales, confirmando su actividad preferencial en el endotelio. La modificación del promotor

para incorporar tres copias del elemento cis regulador positivo en células endoteliales ETC/D/E [PPE-1 (3x)] llevó a un aumento en la especificidad y a la eficacia de la expresión de genes diana realizada por el promotor. Específicamente, en comparación con la PPE-1, la PPE-1 (3x) llevó a un aumento adicional de 2,5-25-veces en la expresión de genes diana en líneas celulares endoteliales *in vitro* y un aumento de 3,5-4 veces en la expresión en el endotelio tumoral *in vivo*. Además, únicamente se observó una actividad mínima del promotor PPE-1 (3x) en el endotelio de tejidos normales, convirtiéndolo en un candidato ideal para dirigir la expresión del gen terapéutico de interés, la ASMasa, específicamente al endotelio tumoral.

El promotor PPE-1 contiene un elemento sensible a la hipoxia, empezando a los 118 pares base corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción que aumenta la expresión a partir del promotor en condiciones hipóxicas. Para fomentar adicionalmente la expresión de genes diana específicamente en entornos hipóxicos, tales como los característicos de los tumores, se insertó un doble elemento de unión de 132 pares base, HIF-2 α -Ets-1, corriente arriba del promotor. Este potenciador se encontraba en origen en la región promotora VEGFR-2 y mejora la transcripción de la VEGFR-2 durante la vasculogénesis.

Ejemplo 2

15 Caracterización de especificidad, eficacia y curso temporal de la infección con Ad5HEPPE-3x(GFP)

Para caracterizar los adenovirus generados, los estudios iniciales se centraron en el virus Ad5HEPPE-3x(GFP) que utilizaba la GFP como un gen indicador. Las BAEC fueron infectadas con una gama de dosis del adenovirus (MOI = 1-10), y se usó el análisis citométrico de flujo para determinar la eficacia máxima de la infección. Se logró la eficacia máxima tras la infección con MOI=5, que corresponde a cinco unidades de formación de placas virales (PFU) por célula. Con esta concentración, el 90,2 \pm 4,8% de las BAEC expresaban GFP 72 horas después de la infección (datos no mostrados), demostrando una traducción viral eficaz y expresión de los genes diana. Para verificar la eficacia y la especificidad del Ad5HEPPE-3x(GFP), varias líneas celulares endoteliales y no endoteliales fueron infectadas con dosis crecientes del virus. Aunque la infección con Ad5HEPPE-3x(GFP) llevó a la expresión de GFP en el 90,6%, el 77,6% y el 88,9% de las BAEC, las HUVEC y las HCAEC, respectivamente, solo indujo la expresión de GFP en el 2,6% de las células HeLa (FIG. 2) y en el 1,6% de las células Jurkat (datos no mostrados). Estos datos confirman que la infección con el constructo Ad5HEPPE-3x da como resultado una expresión del gen indicador de gran eficacia y alta especificidad en células endoteliales *in vitro*.

Subsiguientemente se analizó mediante citometría de flujo el curso temporal de la infección en BAEC infectadas con MOI=5 de Ad5HEPPE-3x(GFP). Según se muestra en la FIG. 3A, se logró la máxima expresión de GFP 72 horas después de la infección y se mantuvo durante al menos cuatro días más. Además, no se observó ninguna toxicidad significativa inducida por adenovirus en las células infectadas hasta 7 días después de la infección (FIG. 3B), según el análisis por inclusión de tinción de viabilidad 7 AAD. Estos datos fueron importantes para establecer los parámetros para el conjunto subsiguiente de estudios en los que una proteína terapéutica, la ASMasa, fue expresada mediante un sistema de administración análogo, denominado Ad5HEPPE-3x(ASM).

35 Ejemplo 3

Sobreexpresión de la ASMasa mediante Ad5HEPPE-3x(ASM) lleva a un aumento en la actividad de la ASMasa, a la generación de ceramida y a la formación de CRP en células endoteliales

Tras la optimización de la infección viral de las BAEC mediante Ad5HEPPE-3x(GFP), se examinaron los efectos del Ad5HEPPE-3x(ASM). Para determinar si la sobreexpresión de ASMasa arbitrada por adenovirus lleva a la generación de una enzima fisiológicamente activa, se evaluó la actividad de la ASMasa en BAEC infectadas con Ad5HEPPE-3x(ASM). El gen de la ASMasa da origen a dos formas de la enzima: la ASMasa lisosomal (L-ASMasa) y la ASMasa secretora (S-ASMasa). Estas isoformas enzimáticas difieren en su patrón de glicosilación y en su procesamiento NH₂-terminal, que dan como resultado una selección de dianas subcelulares diferentes. Las células endoteliales son una fuente de S-ASMasa particularmente rica, segregando 20 veces más enzima activa que cualquier otro tipo de célula investigado hasta ahora. Por esta razón, la actividad de la ASMasa tanto en homogenatos celulares como en medios acondicionados fue evaluada, después de que las células fueran infectadas con Ad5HEPPE-3x(ASM), y comparada con los niveles de referencia hallados en células infectadas con Ad5Empty. Según se muestra en la FIG. 4A, la expresión de ASMasa bajo el control de un promotor PPE-1(3x) lleva a un aumento en 8,3 veces en actividad enzimática en los homogenatos celulares con respecto a la referencia (aumento de 5,7 \pm 1,1 a 47,3 \pm 5,0 nmoles/hora; p<0,005) y un aumento de 46,1 veces en la actividad de la S-ASMasa con respecto a la referencia en los medios acondicionados a partir de células infectadas con el Ad5HEPPE-3x(ASM) (aumento de 4,9 \pm 0,3 a 226,4 \pm 23,3 nmoles/hora; p<0,005). Por lo tanto, de modo similar al Ad5HEPPE-3x(GFP), el Ad5HEPPE-3x(ASM) infecta las BAEC con eficacia. Además, estos estudios demuestran que el Ad5HEPPE-3x(ASM) administra el gen de la ASMasa humana y que el gen está debidamente expresado y procesado por la maquinaria celular para generar enzimáticamente proteína activa.

Las formas de la ASMasa tanto lisosomal como secretora son metaloenzimas que contienen varios motivos de unión Zn²⁺ muy conservados y que requieren Zn²⁺ para su actividad. Sin embargo, aunque la L-ASMasa está expuesta al Zn²⁺ durante la circulación hacia los lisosomas o en los lisosomas (y/o durante la homogenización celular) y está

estrechamente ligada a este cofactor, la S-ASMasa requiere la adición de Zn^{2+} exógeno para su actividad *in vitro*. Para confirmar la dependencia con respecto al Zn^{2+} de la forma secretora que surge de la administración adenoviral de la ASMasa humana, la actividad de la ASMasa fue evaluada en homogenatos y en medios acondicionados en presencia y ausencia de Zn^{2+} . Igual que anteriormente se mostró que únicamente un quelante potente, tal como la 1,10 fenantrolina, puede desprender el Zn^{2+} de la enzima lisosomal, se usó EDTA en los casos en que no se añadía Zn^{2+} extracelular para garantizar que el único metal presente en la reacción es el ya ligado a la enzima. Según se muestra en la FIG. 4B, la actividad de la enzima endógena y sobreexpresada segregada depende de la adición de Zn^{2+} extracelular. Aunque la actividad total segregada de referencia en los medios fue de $4,1 \pm 0,4$ nmoles/hora en presencia de Zn^{2+} extracelular, la actividad total en ausencia de Zn^{2+} fue indetectable. Además, un aumento de 48,5 veces en la actividad total tras la expresión de la ASMasa dependió casi por completo del Zn^{2+} , ya que solo se detectó una pequeña fracción de esa actividad en ausencia del cofactor ($189,7 \pm 4,5$ en comparación con $9,7 \pm 4,6$ nmoles/hora en presencia y ausencia, respectivamente, de Zn^{2+} ; $p < 0,005$). Por el contrario, el estudio simultáneo de control que evaluaba la actividad total en los homogenatos celulares mostró una actividad comparable de la ASMasa en presencia y ausencia de Zn^{2+} extracelular, tanto en los valores de referencia ($7,9 \pm 0,4$ y $7,7 \pm 0,3$ nmoles/hora, respectivamente; $p > 0,1$) como tras la infección con Ad5HEPPE-3x(ASM) ($31,0 \pm 1,8$ y $37,0 \pm 4,5$ nmoles/hora respectivamente; $p > 0,1$). Estos datos indican que, como en el caso de la ASMasa endógena, la expresión de la ASMasa adicional provocada por el constructo Ad5HEPPE-3x(ASM) no surge a través de la exocitosis de lisosomas o vesículas en tránsito hacia los lisosomas, sino más bien a través de una vía secretora normal.

Tras la determinación de que la sobreexpresión de ASMasa por infección con Ad5HEPPE-3x(ASM) lleva a aumentos significativos de la actividad de la ASMasa lisosomal y segregada *in vitro*, se determinó si estos mayores niveles de la enzima podrían tener un impacto en la generación de ceramida y en la transducción de señales. Inicialmente, se midió el contenido total de ceramida celular en las BAEC tras la sobreexpresión de ASMasa. Según se muestra en la FIG. 5A, la sobreexpresión de ASMasa a través del Ad5HEPPE-3x(ASM) llevó a un aumento del 36% ($p < 0,05$) en el contenido de ceramida en células no irradiadas en comparación con el control de Ad5Empty, determinado por el ensayo de DG quinasa. Acto seguido se examinó el impacto de la radiación en la generación de ceramida en células infectadas con Ad5HEPPE-3x(ASM). Tras su exposición a 10 Gy, la elevación de ceramida inducida por la radiación en BAEC infectadas con Ad5HEPPE-3x(ASM) fue detectada en menos de 1 minuto desde la estimulación, y persistió más de 2 minutos antes de disminuir hasta los valores de referencia. Según se muestra en la FIG. 4A, las células infectadas con Ad5HEPPE-3x(ASM) y que, por lo tanto, sobreexpresan ASMasa, generaron 28,5%, 20,7% y 22,6% más ceramida que las células infectadas con Ad5Empty 1, 2 y 5 minutos después de la radiación, respectivamente ($p < 0,05$). La infección con Ad5Empty fue usada como control negativo, y no tenía efecto alguno sobre los niveles de ceramida celular en comparación con el de las células no infectadas (FIG. 5A; $p > 0,1$).

Por último, se determinó si los aumentos en ceramida celular inducidos por la sobreexpresión de ASMasa resultaban en un aumento concomitante en la formación de CRP, determinado por microscopía fluorescente estándar. Como en el estudio anterior, se utilizaron como control BAEC infectadas por Ad5Empty y se determinó que la infección con un adenovirus no tiene por sí misma efecto en la formación de CRP (FIG. 5B; $p > 0,1$). Sin embargo, la sobreexpresión de la ASMasa, llevó a un aumento en la población de células formadoras de CRP, tanto antes como después de la exposición a la irradiación. Específicamente, en los valores de referencia, se detectaron CRP en el 16,4 \pm 1,8% de la población total de células de control; sin embargo, la sobreexpresión de ASMasa aumentó la incidencia de CRP en los valores de referencia al 30,1 \pm 2,3% de la población total ($p < 0,05$). Tras la irradiación, se observó un aumento dependiente del tiempo en la formación de CRP. Un porcentaje sistemáticamente mayor de la población total de las células infectadas con Ad5HEPPE-3x(ASM) formó CRP en comparación con las células infectadas con Ad5Empty (48,6 \pm 2,7 en contraposición con 31,3 \pm 2,4 a 1 minuto; 48,0 \pm 2,4 en contraposición con 35,6 \pm 2,4 a 2 minutos; 40,4 \pm 2,4 en contraposición con 24,4 \pm 2,1 a 5 minutos, respectivamente; $p < 0,05$).

En conjunto, estos datos muestran que la administración del gen de la ASMasa humana por medio del vector adenoviral Ad5HEPPE-3x(ASM) da como resultado un aumento significativo en la actividad de la ASMasa lisosomal y segregada en las BAEC. Además, el aumento en la actividad enzimática de la ASMasa se traduce en un aumento concomitante en la generación de ceramida celular total y en la formación de CRP, tanto en los valores de referencia como tras la exposición a la radiación.

Ejemplo 4

La sobreexpresión de ASMasa radiosensibiliza las células endoteliales

Para determinar la significación fisiológica de los aumentos en la actividad de la ASMasa y la concomitante generación de ceramida y formación de CRP inducidos por el Ad5HEPPE-3x(ASM), se evaluó la respuesta apoptótica de las BAEC tras la infección y la irradiación. Según se muestra en la FIG. 6A, las células expuestas a 10 Gy 3 días después de la infección con Ad5HEPPE-3x(ASM) llevaron a la radiosensibilización de las BAEC, documentada como un aumento del 37,8% en la apoptosis a las 8 horas (del 28,0 \pm 2,7% al 38,6 \pm 3,0% de la población total de células en BAEC infectadas con Ad5Empty y Ad5HEPPE-3x(ASM), respectivamente; $p < 0,05$).

Según se determinó en estudios de caracterización de adenovirus en los que se utilizó Ad5HEPPE-3x(GFP), se logró una expresión máxima de genes de tres a siete días después de la infección de las células. La apoptosis

inducida por radiación de las BAEC fue determinada diariamente 8 horas después de 10 Gy hasta 7 días después de la infección con adenovirus. Estos estudios demostraron que se logró un aumento en la apoptosis inducida por radiación de BAEC (53,4%, 30%, 39,4% y 36,2% a 4, 5, 6 y 7 días después de la infección, respectivamente; $p < 0,05$ cada uno con respecto al control) en toda la duración de la expresión máxima de la ASMas (FIG. 6A).

- 5 Además, la respuesta apoptótica de las BAEC infectadas con Ad5HEPPE-3x(ASM) fue estudiada en función del tiempo posterior a la irradiación con 10 Gy. Se determinó que el efecto máximo de radiosensibilización se logró 8 horas después de la radiación, cuando la apoptosis aumentó un 33,3% (de $31,5 \pm 2,0\%$ a $42,1 \pm 1,5\%$ de la población total de células en BAEC infectadas con Ad5Empty y Ad5HEPPE-3x(ASM), respectivamente; $p < 0,05$). Por último, se evaluó la dependencia de la radiosensibilización con respecto a la dosis. Según se muestra en la FIG. 6C, la sobreexpresión de ASMas indujo radiosensibilización a dosis entre 5 y 15 Gy ($p < 0,05$), produciendo un factor de modificación de la dosis del 1,35. En general, estos estudios demostraron que la sobreexpresión de la ASMas a través de un agente adenoviral confiere radiosensibilidad a las BAEC de una manera dependiente del tiempo y de la dosis.

Ejemplo 5

15 La infección con Ad5HEPPE-3x(GFP) induce la expresión de GFP en el endotelio angiogénico

Para comprobar, *in vivo*, la viabilidad de la administración, la eficacia de la infección y la especificidad de los adenovirus generados hacia las células endoteliales angiogénicas, se administró Ad5HEPPE-3x(GFP) a ratones C57BL/6 portadores de melanomas B16F1 y a ratones SV129/C57BL/6 portadores de fibrosarcomas MCA/129. El modelo murino C57BL/6 portador de melanomas B16F1 fue utilizado previamente en estudios con vectores adenovirales para administrar genes expresados bajo el control de PPE-1(3x); por ende, este modelo fue usado inicialmente para los estudios de optimización. Inicialmente, se verificaron varias vías diferentes de administración oral para determinar cuál llevaba a la mayor eficacia y especificidad de expresión del gen indicador. Para evaluar la vía de administración óptima, se administraron 1×10^{10} PFU (la concentración se determinó empíricamente; datos no mostrados) de Ad5HEPPE-3x(GFP) a ratones portadores de tumores una vez que los tumores de los costados alcanzaron un tamaño de aproximadamente 180 mm^3 . El virus fue administrado por vía intravenosa, de forma intratumoral o mediante bomba osmótica. Cinco días después de la infección, los tumores fueron extirpados, fijados en paraformaldehído y embebidos en bloques de parafina. Se llevó a cabo la posterior inmunotinción de secciones transversales del tumor con anti MECA-32, anticuerpo específico al endotelio que se une con un antígeno celular panendotelial, MECA-32, y anticuerpo anti GFP, y las células endoteliales positivas a la GFP fueron contadas en veinte campos de $400\times$ aumentos. Estos estudios determinaron niveles similares de eficacia de la infección para la administración intravenosa e intratumoral ($5,24\% \pm 0,9$ y $4,6\% \pm 0,7$ de la población endotelial total dentro del tumor, respectivamente; FIG. 14A; $p > 0,05$). Sin embargo, la infección intravenosa no condujo a ninguna expresión detectable de GFP en células tumorales no endoteliales, mientras que la infección intratumoral resultó en la expresión de GFP en células tumorales a lo largo del trayecto de la aguja, así como en la hemorragia de los tejidos inducida por la administración con la aguja (datos no mostrados). Además, aunque la administración intravenosa condujo a una expresión de GFP difundida homogéneamente por todo el tumor, las inyecciones intratumorales no lograron a esparcir el virus más que unos milímetros desde los sitios de inyección, resultando en la detección de la expresión de GFP solo a lo largo de los cuatro trayectos de la aguja empleados (datos no mostrados). La combinación de inyecciones intravenosas e intratumorales no llevó a un aumento significativo en la expresión de GFP individualmente en ningún trayecto ($5,0\% \pm 0,3$, $p > 0,1$; FIG. 14A). Por último, la administración del virus arbitrada por una bomba osmótica no condujo a ninguna expresión detectable de GFP determinada examinando secciones transversales del tumor inmunotincionadas con anticuerpos anti MECA32 y anti GFP cinco días después de las secciones de administración viral (datos no mostrados). Estos resultados demuestran que la administración de Ad5HEPPE-3x(GFP) por vía intravenosa lleva a la eficacia y a la especificidad mayores de la infección, así como a la mejor distribución de los virus en todo el tumor, y, por ende, fue utilizada en todos los estudios posteriores.

Para determinar si el tamaño del tumor en el momento de la infección *in vivo* desempeña un papel en la eficacia de la infección, se inyectó Ad5HEPPE-3x(GFP) por vía intravenosa en ratones C57BL/6 portadores de tumores de melanoma B16F1 que oscilaban entre 64 y 203 mm^3 . La cuantificación de células endoteliales positivas a la GFP cinco días después de la administración viral, como en el estudio anterior, reveló que el tamaño del tumor no desempeña un papel en la eficacia de la infección. Se observó que las células endoteliales positivas a la GFP estaban en el intervalo de $4,0\% \pm 0,6$ a $5,8\% \pm 1,1$ del endotelio tumoral total (FIG. 7B; $p > 0,05$), con independencia del tamaño del tumor. En general, no se halló correlación alguna entre el tamaño del tumor y la eficacia de la infección.

El melanoma B16F1 y el fibrosarcoma MCA/129 han sido muy estudiados. El componente vascular en ambos modelos tumorales arbitra la respuesta tumoral a una única dosis de radiación elevada. Sin embargo, el fibrosarcoma MCA/129 es más sensible a la radiación, lo que demuestra una tasa de regresión del 50% tras una exposición a la radiación de 15 Gy cuando se implanta en ratones SV129/C57BL/6^{asm+/+}. El melanoma B16F1 desarrollado en el mismo entorno no presenta una completa regresión tras una exposición a la radiación local. Además de la respuesta a la radiación, los dos modelos tumorales difieren en sus patrones de desarrollo y en su aspecto. Aunque el melanoma B16F1 es un tumor que crece deprisa que desarrolla necrosis y ulceraciones de la piel con tamaños relativamente pequeños, el fibrosarcoma MCA/129 crece a velocidades más previsibles y está muy perfundido hasta que alcanza tamaños por encima de aproximadamente 300 mm^3 .

Para verificar su eficacia y su especificidad en los tumores de fibrosarcoma MCA/129 tumores, se administraron 1×10^{10} PFU de Ad5HEPPE-3x(GFP) por vía intravenosa a ratones SV129/C57BL/6 portadores de tumores (los ratones de la cepa C57BL/6 no soportan el desarrollo de fibrosarcoma MCA/129). Según se muestra en la FIG. 7C, se observaron niveles comparables de expresión de GFP en los modelos tumorales de fibrosarcoma MCA/129 y melanoma B16F1 ($5,4\% \pm 0,9$ y $5,9\% \pm 0,5$, respectivamente; $p > 0,05$).

Para determinar el curso temporal de la expresión de genes diana en ratones SV129/C57BL/6 portadores de fibrosarcomas MCA/129, se examinó la expresión de GFP en secciones de los tumores durante 14 días que siguieron a la administración intravenosa de 1×10^{10} PFU de Ad5HEPPE-3x(GFP). Según se ha mostrado anteriormente, la expresión de genes diana bajo el control de PPE-1(3x) alcanza un pico en la vasculatura 5 días después de la administración adenoviral intravenosa y persiste 14 días. Aunque ya se detectaron células endoteliales positivas a la GFP solo 2 días después de la administración del virus, la expresión máxima del gen indicador fue detectada 5 días después de la administración en el $4,8\% \pm 0,5$ del endotelio tumoral (FIG. 7D), permaneciendo a un nivel similar 9 días más (datos no mostrados).

Por último, se evaluó la especificidad del virus Ad5HEPPE-3x determinando si la infección *in vivo* con Ad5HEPPE-3x(GFP) restringe la expresión de genes diana al lecho endotelial angiogénico. Según se ha mostrado anteriormente, el promotor PPE-1(3x) indujo específicamente la expresión en el lecho vascular angiogénico del tumor con una expresión 35 veces mayor en comparación con el lecho vascular normal del pulmón. En los presentes estudios, ratones portadores de fibrosarcomas MCA/129 fueron infectados con virus Ad5Empty, Ad5CMV(GFP) o Ad5HEPPE-3x(GFP), y se recogieron tejidos diversos para la detección por inmunofluorescencia de la expresión de GFP 5 días después de la administración viral.

Se utilizó Ad5CMV(GFP) como control no específico a tejidos, así como control positivo para la expresión de GFP en el hígado, porque los hepatocitos presentan niveles de expresión mayores del receptor CAR y, por ende, alta afinidad hacia los constructos de adenovirus utilizados. Estas características también limitan la utilidad clínica de vectores adenovirales promiscuos tales como el Ad5CMV e ilustran el requisito de la generación de vectores de expresión específica al tejido, tales como los dados a conocer en la presente memoria. Según se muestra en el panel superior de la FIG. 8A, la administración de Ad5CMV(GFP) conduce a una alta expresión de GFP en los hepatocitos. En cambio, no se observó ninguna expresión detectable de GFP tras la administración de Ad5Empty o Ad5HEPPE-3x(GFP). De modo similar, no se observó ninguna expresión detectable de GFP en el endotelio del GI, el corazón, el riñón, el pulmón, el cerebro (FIG. 8A), el bazo, la piel o el páncreas (datos no mostrados) tras la administración intravenosa de Ad5HEPPE-3x(GFP). Aunque tejidos tales como el riñón y el GI presentan niveles elevados de autofluorescencia, no hubo ningún aumento observable en la expresión de fluorescencia verde en estos órganos en animales infectados con ninguno de los tres virus. Alternativamente, en el endotelio de tumores de ratones infectados con Ad5HEPPE-3x(GFP) se observó la expresión de GFP similar a los niveles observados anteriormente (FIG. 8B). Sin embargo, no se observó ninguna expresión detectable de GFP en tumores de ratones infectados con Ad5Empty o Ad5CMV(GFP) (FIG. 8B, y datos no mostrados). Estos datos corroboran resultados anteriores obtenidos usando estrategias de administración de genes a base de vectores adenovirales bajo el control del promotor PPE-1(3x). En resumidas cuentas, estos estudios demuestran que los constructos de adenovirus Ad5HEPPE-3x administran de manera eficaz genes de interés al endotelio *in vivo*, resultando en una expresión génica localizada específica debida a la alta especificidad del promotor PPE-1(3x).

Ejemplo 6

Sobreexpresión de la ASMas en el endotelio del fibrosarcoma MCA/129 y el melanoma B16F1 aumentó la apoptosis microvascular tumoral inducida por la radiación

Según se representa en la FIG. 17, la sobreexpresión de ASMas en la microvasculatura de los tumores lleva a un aumento en la apoptosis endotelial en los tumores fibrosarcoma MCA/129 y melanoma B16F1. Se administraron 1×10^{10} PFU of Ad5Empty o Ad5HEPPE-3x(ASM) por vía intravenosa a ratones SV129/C57^{asm^{+/+}JAX} portadores de fibrosarcomas MCA/129 (FIG. 17A) y melanomas B16F1 (FIG. 17B). Cinco (FIG. 17A) o cuatro (FIG. 17B) días después de la administración del virus, los tumores fueron localmente irradiados con 14,5, 17 Gy y 20 Gy (FIG. 17A) o 34 y 41 Gy (FIG. 17B) y la apoptosis fue cuantificada tras la inmunotinción TUNEL/Meca-32.

Colectivamente, estos datos demuestran que la regulación genética de la ASMas al alza no solo sensibiliza las células endoteliales *in vitro* (FIG. 6), sino también *in vivo* (FIG 17). Específicamente, un aumento en la expresión de la ASMas en la microvasculatura de dos modelos tumorales sensibiliza el endotelio tumoral a la apoptosis inducida por radiación.

Ejemplo 7

La expresión de la ASMas en el endotelio tumoral de ratones *asm^{-/-}* restaura la sensibilidad de los fibrosarcomas MCA/129 a la radiación

Tras acabar la caracterización viral usando el constructo Ad5HEPPE-3x(GFP), incluyendo la optimización de la dosificación y el momento de la infección y la confirmación de la expresión génica específicamente en el endotelio angiogénico, se examinó el impacto del Ad5HEPPE-3x(ASM) en el endotelio tumoral. Se esperaba que el

Ad5HEPPE-3x(ASM), como el constructo Ad5HEPPE-3x(GFP), indujera la expresión específicamente dentro del endotelio tumoral, administrando la expresión de la ASMasa al compartimento angiogénico. Dado que se requiere la actividad de la ASMasa para emplear el componente vascular de la respuesta tumoral a la radiación, el fibrosarcoma MCA/129 implantado en ratones *asmasa*^{-/-} (colonia Sloan-Kettering) era relativamente resistente a las dosis de radiación de hasta 18 Gy. Además, los tumores de fibrosarcoma MCA/129 en ratones *asmasa*^{-/-} se desarrollaron un 200-400% más rápidamente que sus homólogos de tipo natural. A continuación, se estudió si la restauración de la expresión de ASMasa en la vasculatura tumoral de *asmasa*^{-/-} restauraría el patrón de crecimiento y la sensibilidad a la radiación observados previamente en hermanos de camada de tipo natural. Los experimentos iniciales evaluaron el impacto de la restauración de la ASMasa endotelial en la respuesta del fibrosarcoma MCA/129 implantado en ratones *asmasa*^{-/-} a la radiación. Según se muestra en las FIGURAS 9A y 9B, la administración intravenosa de Ad5HEPPE-3x(ASM) y la restauración de la expresión de ASMasa en el endotelio tumoral de ratones *asmasa*^{-/-} llevaron a una demora en el crecimiento del tumor de 10,5±2,9 días en comparación con hermanos de camada de *asmasa*^{-/-} infectados con un constructo Ad5Empty ($p < 0,05$). Además, la restauración de la expresión de ASMasa en ratones *asmasa*^{-/-} sensibilizó significativamente la respuesta tumoral a la radiación. Para estos estudios, a ratones *asmasa*^{-/-} implantados con fibrosarcoma MCA/129 e infectados con Ad5HEPPE-3x(ASM) o Ad5Empty se les administró irradiación local a los tumores 5 días después de la infección viral (FIG. 9C). Una única dosis de radiación de 15 Gy de un fibrosarcoma MCA/129 tras una infección con Ad5Empty indujo una regresión completa del tumor en solo 1 de 15 ratones (6,6%), y causó una demora media en el desarrollo del tumor de 15,6±2,9 días en 14 ratones restantes ($p < 0,05$ en contraposición con los controles no irradiados; FIG. 9). Sin embargo, la exposición localizada de los tumores a 15 Gy junto con la restauración de la expresión de ASMasa a través de una infección con Ad5HEPPE-3x(ASM), dio como resultado una completa regresión del tumor en 10 de 15 ratones (66%) y una demora en el desarrollo del tumor en los 5 ratones restantes, con una media de 22+6,6 días ($p < 0,05$ con respecto a los controles no irradiados; FIG. 9). Estos datos demuestran que la expresión selectiva de ASMasa en la vasculatura tumoral de ratones *asmasa*^{-/-} es capaz de restaurar la respuesta tumoral a la radiación a los niveles anteriormente observados en hermanos de camada de tipo natural (regresión local completa en el 50% de los tumores lograda con una sola dosis de 15 Gy).

Para confirmar que la restauración de la sensibilidad a la radiación inducida por el Ad5HEPPE-3x(ASM) es arbitrada por la vasculatura tumoral, se evaluó la apoptosis endotelial de la vasculatura tumoral dentro de tumores de fibrosarcoma MCA/129 implantados en ratones *asmasa*^{-/-} 4, 6, 8 y 10 horas después de la radiación. Sucintamente, los tumores de los costados fueron expuestos a una sola dosis de radiación de 15 Gy y los tumores fueron extirpados a las 6 horas (FIG. 10A) o en los puntos temporales indicados (FIG. 10B) después de la radiación. Tras su fijación en paraformaldehído y ser embebidas en bloques de parafina, se tincionaron conjuntamente secciones transversales tumorales de 5 μ m con un anticuerpo del marcador MECA-32 de la superficie celular selectivo del endotelio (azul en la FIG. 10A) y mediante marcado del extremo libre con trifosfato de desoxiuridina arbitrado por desoxittransferasa terminal (TUNEL) para la apoptosis (marrón en la FIG. 10A). Además, las secciones transversales fueron marcadas con hematoxilina para visualizar los núcleos de las células tumorales. La cuantificación de las células endoteliales positivas a TUNEL reveló que la restauración de la expresión de ASMasa condujo a un aumento en la apoptosis endotelial dependiente del tiempo, del 3,8±0,6% al 27±2% 8 horas después de 15 Gy (FIG. 10B; $p < 0,05$). Por el contrario, la radiación local de tumores de fibrosarcoma MCA/129 implantados en ratones *asmasa*^{-/-} infectados con virus Ad5Empty no resultó en un aumento significativo en la apoptosis endotelial dentro del mismo marco temporal (5,3±1% en contraposición con 1,2±0,4% en el control no irradiado; FIG 10B; $p > 0,05$). Además, la cuantificación de células tumorales positivas a TUNEL en las mismas áreas de las secciones transversales del tumor reveló bajos niveles de apoptosis de las células del tumor tras la administración de adenovirus y de irradiación local del tumor (Tabla 1).

La Tabla 1 muestra que la expresión de ASMasa en el endotelio tumoral de ratones *asmasa*^{-/-} no lleva a una apoptosis de las células del tumor inducida por la radiación. Se administraron 1×10^{10} PFU de Ad5Empty o Ad5HEPPE-3x(ASM) por vía intravenosa a ratones *asmasa*^{-/-} portadores de fibrosarcoma MCA/129. Cinco días después de la administración del virus, los tumores fueron localmente irradiados con 15 Gy o dejados sin tratar. Muestras tumorales fueron obtenidas antes o 4, 6, 8 y 10 horas tras la irradiación, fijadas en paraformaldehído y embebidas en bloques de parafina. Las secciones tisulares fueron tincionadas con anticuerpo TUNEL para visualizar núcleos apoptóticos y con hematoxilina y eosina para visualizar las células tumorales. Los datos (media \pm SE) representan células tumorales positivas a TUNEL cuantificadas de cinco campos de 400x aumentos de un experimento que empleó dos animales por grupo.

Tabla 1. La expresión de la ASMasa en el endotelio tumoral de ratones *asmasa*^{-/-} no conduce a la apoptosis de las células tumorales inducida por la radiación

Vector	Dosis de IR	Tiempo después de la IR	% de apoptosis epitelial por campo de 400x
Ad5Empty	0 Gy	N/D	1,2 \pm 0,1%
Ad5HEPPE-3x(ASM)			1,9 \pm 0,3%

Vector	Dosis de IR	Tiempo después de la IR	% de apoptosis epitelial por campo de 400x
Ad5Empty	15 Gy	4 horas	1,7 ± 0,2%
Ad5HEPPE-3x(ASM)			1,7 ± 0,2%
Ad5Empty	15 Gy	6 horas	2,2 ± 0,3%
Ad5HEPPE-3x(ASM)			2,8 ± 0,3%
Ad5Empty	15 Gy	8 horas	3,1 ± 0,2%
Ad5HEPPE-3x(ASM)			2,9 ± 0,4%
Ad5Empty	15 Gy	10 horas	3,5 ± 0,4%
Ad5HEPPE-3x(ASM)			3,2 ± 0,2%

Tras la regulación genética de la ASMas a alza, se observó apoptosis en un $1,9\% \pm 0,3\%$ de las células tumorales, y la radiación no tuvo efecto alguno en estos niveles, ya que en la población total se observaron un $1,7 \pm 0,2\%$, un $2,8 \pm 0,3\%$, un $2,9 \pm 0,4\%$ y un $3,2 \pm 0,2\%$ de las células apoptóticas tumorales 4, 6, 8 y 10 horas después, respectivamente, de 15 Gy. De modo similar, no se observó ninguna diferencia significativa en la apoptosis de células tumorales en tumores tratados con Ad5HEPPE-3x(ASM) y Ad5Empty (Tabla 1), lo que demuestra que la regulación genética de la ASMas a alza no arbitra sus efectos curativos a través de la apoptosis de las células tumorales. Colectivamente, estos datos muestran que la restitución de la expresión de ASMas a en un endotelio tumoral deficiente en ASMas a restaura la sensibilidad endotelial a la apoptosis inducida por radiación, lo que vuelve a emplear el componente vascular de respuesta tumoral a la radiación, llevando a una regresión completa del tumor.

5 Igual que el Ad5HEPPE-3x(ASM) condujo a la expresión de la ASMas humana en tumores murinos, se estudió el hecho de que la respuesta tumoral a la radiación fuera, ciertamente, arbitrada por la restauración de la ASMas y no por una reacción inmunológica inesperada. Para abordar esta posible inquietud, se investigó la respuesta a la radiación del fibrosarcoma MCA/129 implantado en animales asm^{-/-} que albergaban la mutación SCID. Estos ratones, que presentan un fenotipo carente de linfocitos anfitriones B y T maduros, permiten el estudio del impacto de la irradiación en un contexto con poco potencial de interferencia de la función inmunológica. A ratones SCID-asm^{-/-} inmunocomprometidos se les implantó fibrosarcoma MCA/129 y, posteriormente, fueron infectados con Ad5HEPPE-3x(ASM), y la respuesta tumoral a la radiación fue estudiada. Se hipotetizó que, si el efecto radiosensibilizador observado en los estudios previos fue arbitrado, de hecho, por una reacción inmunológica, en vez de por una restauración de la ASMas, no sería posible observar la cura del tumor o el retardo de su crecimiento en animales inmunocomprometidos. Según se muestra en la FIG. 11, la administración intravenosa de Ad5HEPPE-3x(ASM) y la restauración de la expresión de ASMas en el endotelio de ratones SCID-asm^{-/-} a los que se había implantado fibrosarcoma MCA/129 llevaron a una radiosensibilización similar a la observada en ratones no SCID-asm^{-/-} infectados con Ad5HEPPE-3x(ASM). Además, la respuesta a la radiación del fibrosarcoma MCA/129 en ratones SCID-asm^{-/-} fue restaurada a niveles similares a la de los ratones SCID-asm^{+/+}. Aunque ningún tumor en los ratones SCID-asm^{-/-} tratados con Ad5Empty presentó una respuesta a 17 Gy, todos los tumores en los ratones SCID-asm^{-/-} tratados con Ad5HEPPE-3x(ASM) presentaron un retardo en el desarrollo del tumor análogo al observado en ratones SCID-asm^{+/+} no tratados con virus (FIG. 11). Sin embargo, el crecimiento del tumor en estos ratones solamente pudo ser seguido durante 6 días después de la radiación, debido a la radiosensibilidad inherente de los ratones SCID. En menos de 6 días de una irradiación de 17 Gy, todos los animales presentaban una grave pérdida de peso y pérdida de motilidad, indicativos de una toxicidad GI inducida por la radiación, confirmada posteriormente por análisis de necropsias (datos no mostrados). No obstante, la capacidad del Ad5HEPPE-3x(ASM) de restaurar la radiosensibilidad de tumores implantados en ratones SCID-asm^{-/-} inmunocomprometidos en comparación con la observada en tumores implantados en hermanos de camada de tipo natural confirma que el efecto del Ad5HEPPE-3x(ASM) es arbitrado por la expresión de la ASMas y no por una respuesta inmunológica sistémica al gen de la ASMas.

Ejemplo 8

La sobreexpresión de ASMas en tumoral de tipo natural radiosensibiliza el fibrosarcoma MCA/129

Estudios anteriores *in vitro* demostraron que la sobreexpresión de ASMas en las BAEC conduce a la radiosensibilización de las células con un factor modificador de dosis de 1,35. Para determinar si también se puede lograr la radiosensibilización en neovasculatura de tipo natural *in vivo*, se administró Ad5HEPPE-3x(ASM) a ratones portadores de fibrosarcomas MCA/129, y se estudió el impacto de la regulación genética de la ASMas a alza en la respuesta tumoral a la radioterapia de dosis única.

La FIG. 12 muestra que la exposición de ratones SV129/C57^{asm+/+JAX} portadores de fibrosarcomas MCA/129 a una sola dosis de 14,5 Gy tras su infección con Ad5Empty no tuvo ningún efecto significativo para el crecimiento del tumor ($p > 0,1$). Por el contrario, la regulación genética de la ASMas a alza en la vasculatura tumoral a través de la administración intravenosa de Ad5HEPPE-3x(ASM) a ratones SV129/C57^{asm+/+JAX} portadores de fibrosarcomas

MCA/129 aumentó significativamente la respuesta tumoral a la radiación. La exposición a 14,5 Gy dio como resultado una regresión local completa en 3 de 10 tumores (30%), mantenida durante al menos 90 días. Los 7 ratones restantes experimentaron un retardo medio en el crecimiento de los tumores de $9,7 \pm 5,0$ días (FIG. 12C; $p < 0,005$ con respecto a Ad5Empty y controles de radiación). El aumento escalonado de la dosis de radiación hasta 17 Gy mejoró el efecto del Ad5HEPPE-3x(ASM) sobre la respuesta tumoral del fibrosarcoma 129/MCA a la radiación. De forma similar a los resultados observados con una radiación de una única dosis de 14,5 Gy, la de 17 Gy en ratones SV129/C57^{asm+/+JAX} portadores de fibrosarcomas MCA/129 infectados con Ad5Empty no tuvo ningún efecto en el crecimiento del tumor ($p > 0,1$) (Tabla 2).

Tabla 2. La sobreexpresión de ASMas por medio de Ad5HEPPE-3x(ASM) radiosensibiliza los tumores

Tumor	Dosis de la radiación	Tasa de regresión tumoral (%)	
		Ad5Empty	Ad5HEPPE-3x(ASM)
Fibrosarcoma MCA/129	14,5 Gy	0	30
Fibrosarcoma MCA/129	17 Gy	0	60
Fibrosarcoma MCA/129	20 Gy	20	80
Melanoma B16F1	34 Gy	0	25
Melanoma B16F1	41 Gy	0	66

A diferencia de lo que se vio tras la irradiación local del tumor con 17 Gy tras la infección con AdEmpty, la regulación genética de la ASMas al alza en el endotelio a través de la infección con Ad5HEPPE-3x(ASM) dio como resultado la radiosensibilización del tumor. Se observaron regresiones locales completas que se mantuvieron 90 días en 3 de 5 ratones SV129/C57^{asm+/+JAX} (60%) portadores de fibrosarcomas MCA/129. En los 2 ratones restantes se observó un retardo medio del crecimiento de $18 \pm 5,6$ días (FIG. 13C; $p < 0,005$ con respecto a Ad5Empty y controles de radiación).

El aumento escalonado de la dosis de radiación hasta 20 Gy dio como resultado la regresión local completa en 1 de 5 ratones SV129/C57^{asm+/+JAX} (20%) portadores de fibrosarcomas MCA/129 infectados con Ad5Empty (FIG. 14A y 14C y Tabla 2). Además, se observó un retardo medio del crecimiento del tumor de $16,7 \pm 2,4$ días en 2 ratones, aunque no se observó ningún impacto significativo en el crecimiento del tumor en los 2 animales restantes. La regulación genética de ASMas al alza a través del Ad5HEPPE-3x(ASM) radiosensibilizó adicionalmente los tumores a una sola dosis de radiación de 20 Gy. Se observó una regresión local completa del tumor en 4 de 5 ratones (80%), y en el animal restante se observó un retardo en el crecimiento del tumor de 10 días. Sin embargo, a diferencia de la restauración de la expresión de ASMas en ratones *asm^{-/-}* (colonia Sloan-Kettering), no se observó ningún efecto significativo en el crecimiento del tumor en ausencia de radiación tras la regulación genética de ASMas al alza en ratones SV129/C57^{asm+/+JAX} (FIG. 12B, 13B y 14B; $p > 0,05$).

En general, estos datos demuestran que la regulación genética de ASMas al alza a través del Ad5HEPPE-3x(ASM) en la vasculatura *asm^{+/+}* tiene un efecto radiosensibilizador significativo en los tumores murinos, pero no afecta al desarrollo del tumor en ausencia de radiación. Dado que el tratamiento de animales con Ad5HEPPE-3x(ASM) más una única dosis de radiación de 14,5 Gy produjo un efecto análogo al visto cuando los animales fueron tratados con una única dosis de radiación de 23 Gy en ausencia de sobreexpresión de ASMas (datos no mostrados), es decir, una tasa de regresión completa del tumor del 30%, la regulación de la ASMas al alza dio como resultado la radiosensibilización con un factor modificador de la dosis clínicamente significativo de 1,58.

Además, la radiosensibilización depende de la dosis de adenovirus. Se administraron por vía intravenosa una dosis de 1×10^{10} PFU y 4 dosis adicionales media disminución logarítmica menor que cada dosis previa de Ad5HEPPE-3x(ASM) a ratones SV129/C57^{asm+/+JAX} portadores de fibrosarcomas MCA/129. Cinco días después de la administración del virus, los tumores fueron localmente irradiados con 17 Gy. En la Tabla 3 se presentan los resultados.

Tabla 3. Estudio de disminución escalonada de la dosis

Adenovirus	Dosis	Tasa de regresión tumoral (%) después de 17 Gy
Ad5Empty	N/D	1/5 (20%)
AD5HEPPE-3x(ASM)	3×10^8 PFU	1/5 (20%)
AD5HEPPE-3x(ASM)	1×10^9 PFU	1/5 (20%)
AD5HEPPE-3x(ASM)	3×10^9 PFU	2/5 (40%)
AD5HEPPE-3x(ASM)	1×10^{10} PFU	3/5 (60%)

Ejemplo 9**La sobreexpresión de ASMas en el endotelio tumoral radiosensibiliza el melanoma B16F1**

La FIG. 18 y la Tabla 2 muestran que la sobreexpresión de ASMas en el endotelio tumoral radiosensibiliza el melanoma B16F1. Se administraron 1×10^{10} PFU de Ad5Empty o Ad5HEPPE-3x(ASM) por vía intravenosa a ratones SV129/C57^{asm+/+JAX} portadores de melanomas B16F1. Cuatro días después de la administración del virus los tumores fueron localmente irradiados con 34 (FIG. 18A) y 41 (FIG. 18B) Gy. La respuesta del melanoma B16F1 al tratamiento con Ad5Empty (líneas negras) o Ad5HEPPE-3x(ASM) (líneas grises) e IR es presentada como un volumen tumoral. N es igual al número de animales por grupo. Los tumores fueron medidos diariamente hasta 40 días y dos veces por semana posteriormente. La regresión de los tumores fue confirmada por medio de una biopsia local.

Estos datos demuestran que el Ad5HEPPE-3x(ASM) no solo radiosensibiliza tumores relativamente radiosensibles, tales como el fibrosarcoma MCA/129, sino también tumores completamente radiorresistentes, tal como el melanoma B16F1.

Ejemplo 10**La sobreexpresión de ASMas no radiosensibiliza en endotelio microvascular GI**

Los estudios que usaron Ad5HEPPE-3x(GFP) demostraron que la expresión de genes diana es específica para el endotelio angiogénico; no hubo ninguna expresión detectable dentro del endotelio de tejidos normal. Para confirmar la especificidad de la expresión de ASMas en el endotelio angiogénico, se comprobó si la infección con Ad5HEPPE-3x(ASM) da como resultado la radiosensibilización de la vasculatura dentro del tracto GI. Para estos estudios se escogió el tracto GI porque es particularmente sensible a la exposición a la radiación aguda. Una irradiación de todo el cuerpo o abdominal total da como resultado la letalidad de las células madre GI y la pérdida de la barrera protectora que separa el contenido de la luz de la circulación. Este síndrome GI, que es la toxicidad primaria limitante de la dosis para el tratamiento por radiación del tracto GI, es causado por una onda rápida de apoptosis endotelial microvascular inducida por la radiación dentro de la lámina propia, que coopera con el daño directo a las células madre situadas dentro de las criptas de Lieberkühn en la base de cada vellosidad. El ensayo de supervivencia de la microcolonia o cripta cuantifica directamente la letalidad, dependiente de la dosis, del compartimento de células madre de la cripta, y es predictivo de la muerte final del animal por el síndrome GI. Se sometió a ratones SV129/C57/BL/6 a 8-14 Gy de irradiación total del cuerpo (TBI) cinco días tras la infección con Ad5HEPPE-3x(ASM). El yeyuno proximal fue recolectado 3,5 días tras la irradiación. Según se muestra en la FIG. 15, no se observó una radiosensibilización significativa del tracto GI. Específicamente, se observó una supervivencia de las criptas del 91,6%, el 59,2%, el 30,2% y el 6,9% en ratones infectados con el vector vacío tras una TBI de 8, 10, 12 y 14 Gy, respectivamente, mientras que los ratones infectados con Ad5HEPPE-3x(ASM) presentaron una supervivencia de las criptas del 93,4%, el 34,6%, el 23,4% y el 4,1%, respectivamente. El análisis de estos datos reveló una supervivencia de las criptas del 10% a dosis de 13,7 y 13,1 Gy, respectivamente, para ratones infectados con Ad5Empty o Ad5HEPPE-3x(ASM), dando como resultado un factor modificador de la dosis de $1,05 \pm 0,29$.

Estos datos demuestran que la regulación genética de ASMas al alza a través del Ad5HEPPE-3x(ASM) afecta de forma específica únicamente a tejidos con vasculatura angiogénica, tal como la de tumores, que radiosensibiliza el endotelio angiogénico, pero preserva el endotelio dentro de otros órganos sensibles a la radiación, aumentando la eficacia de la radioterapia sin incurrir en una toxicidad no deseada en tejidos normales.

A no ser que se indique algo distinto, ha de entenderse que todos los números que expresan cantidades de ingredientes, propiedades tales como peso molecular, condiciones de reacción, etcétera, usados en la memoria y las reivindicaciones, están modificados en todos los casos por el término "aproximadamente". En consecuencia, a no ser que se indique lo contrario, los parámetros numéricos definidos en la memoria y las reivindicaciones adjuntas son aproximaciones que pueden variar dependiendo de las propiedades deseadas que la presente invención busca obtener. Como poco, y no como intento por limitar la aplicación de la doctrina de equivalentes al alcance de las reivindicaciones, cada parámetro numérico debería ser interpretado a la luz del número de dígitos significativos documentados y aplicando técnicas ordinarias de redondeo. A pesar de que los intervalos y los parámetros numéricos que definen el alcance general de la invención son aproximaciones, los valores numéricos definidos en los ejemplos específicos son documentados con tanta precisión como es posible. Sin embargo, cualquier valor numérico contiene inherentemente ciertos errores que son resultado necesario de la desviación típica encontrada en sus respectivas mediciones de comprobación.

Ha de interpretarse que los términos "un", "una", "el", "la" y referentes similares usados en el contexto de la descripción de la invención (especialmente en el contexto de las siguientes reivindicaciones) abarcan tanto el singular como el plural, a no ser que se indique algo distinto en la presente memoria o sea contradicho claramente por el contexto. La enumeración de intervalos de valores en la presente memoria está pensada meramente para que sirva como método taquigráfico de referirse individualmente a cada valor separado que se encuentre dentro del intervalo. A no ser que se indique algo distinto en la presente memoria, cada valor individual es incorporado a la memoria como si fuera enumerado individualmente en el presente documento. Todos los métodos descritos en la

5 presente memoria pueden llevarse a cabo en cualquier orden adecuado, a no ser que se indique algo distinto en el presente documento o esté claramente contradicho por el contexto. El uso de cualquier ejemplo y de todos ellos o de lenguaje ejemplar (por ejemplo, "tal como") proporcionado en la presente memoria está pensado meramente para iluminar la invención mejor y no plantea una limitación en el alcance de la invención reivindicado de otro modo. No debería interpretarse que ninguna expresión de la memoria indique que ningún elemento no reivindicado sea esencial para la puesta en práctica de la invención.

10 Las agrupaciones de elementos o realizaciones alternativos de la invención dados a conocer en la presente memoria no han de ser interpretadas como limitaciones. Cada miembro del grupo puede ser objeto de referencia y reivindicado individualmente, o en cualquier combinación con otros miembros del grupo u otros elementos encontrados en la presente memoria. Se prevé que uno o más miembros de un grupo puedan estar incluidos en un grupo, o borrados del mismo, por razones de conveniencia y/o patentabilidad. Cuando se produzca cualquier inclusión o eliminación tales, se considera que la memoria contiene el grupo modificado, satisfaciendo así la descripción escrita de todos los grupos de Markush usados en las reivindicaciones adjuntas.

15 En la presente memoria se describen ciertas realizaciones de esta invención, incluyendo el mejor modo conocido a los inventores para llevar a cabo la invención. Por supuesto, variaciones de estas realizaciones descritas resultarán evidentes para las personas con un dominio normal de la técnica tras leer la descripción anterior. El inventor prevé que los expertos en la técnica empleen tales variaciones según sea apropiado, y los inventores prevén que la invención sea puesta en práctica de formas distintas de la específicamente descrita en la presente memoria. En consecuencia, la presente invención incluye todas las modificaciones y los equivalentes del contenido enumerado en las reivindicaciones adjuntas a la presente memoria que permita la legislación aplicable. Además, cualquier combinación de los elementos anteriormente descritos en todas las variaciones posibles de los mismos está abarcada por la invención, a no ser que se indique algo distinto en el presente documento o sea contradicho claramente de otra forma por el contexto.

25 Las realizaciones específicas dadas a conocer en la presente memoria pueden estar limitadas adicionalmente en las reivindicaciones usando un lenguaje con "consistente en" o "consistente esencialmente en". Cuando se usa en las reivindicaciones, ya sea según se ha presentado o añadida como enmienda, la expresión de transición "consistente en" excluye cualquier elemento, etapa o ingrediente no especificado en las reivindicaciones. La expresión de transición "consistente esencialmente en" limita el alcance de una reivindicación a los materiales o las etapas especificados y a los que no afectan materialmente a la o las características básicas y novedosas. Las realizaciones de la invención así reivindicada son descritas inherente o expresamente y habilitadas en el presente documento.

30 Por último, ha de entenderse que las realizaciones de la invención dadas a conocer en la presente memoria son ilustrativas de los principios de la presente invención. otras modificaciones que pueden emplearse están dentro del alcance de la invención. Así, a título de ejemplo, pero no de limitación, pueden utilizarse configuraciones alternativas de la presente invención según las enseñanzas de la presente memoria. En consecuencia, la presente invención no está limitada a lo mostrado y descrito precisamente.

35

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un vector de expresión que comprende un constructo de ADN recombinante que comprende una región que codifica una ligada a secuencias reguladoras transcripcionales que confieren una expresión de dicha ASMasa secretora específica a los tejidos, caracterizado porque dicho vector de expresión es un vector de adenovirus, en el que las secuencias reguladoras transcripcionales son específicas al endotelio tumoral o al endotelio angiogénico de tumores.
2. El vector de expresión de la reivindicación 1 en el que las secuencias reguladoras transcripcionales son específicas al endotelio angiogénico de tumores.
- 10 3. El vector de expresión de la reivindicación 2 en el que dichas secuencias reguladoras transcripcionales específicas al endotelio angiogénico se seleccionan del grupo consistente en promotores y potenciadores.
4. El vector de expresión de la reivindicación 3 en el que dicho promotor es un promotor de preproendotelina-1 o modificaciones del mismo, tales como el promotor de PPE-1(x3).
5. El vector de expresión de la reivindicación 3 en el que dicho potenciador es un potenciador de HIF2 α -Ets-1.
- 15 6. El vector de expresión de la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento de cáncer en el que dicho constructo aumenta los niveles de ASMasa en el endotelio tumoral y, por ello, aumenta el daño inducido por la radiación a un tumor sin aumentar los efectos secundarios inducidos por la radiación.
7. El vector de expresión para su uso según la reivindicación 6, en el que dicho cáncer es un tumor sólido.
8. El vector de expresión para su uso según la reivindicación 6 en el que el aumento en el daño inducido por la radiación al cáncer sin un aumento en los efectos secundarios inducidos por la radiación se logra sensibilizando el tumor a la radiación.
- 20 9. El vector de expresión para su uso según la reivindicación 6 en el que el aumento en el daño inducido por la radiación al cáncer sin un aumento en los efectos secundarios inducidos por la radiación se logra sensibilizando el epitelio angiogénico del tumor a la radiación.
- 25 10. El vector de expresión para su uso según la reivindicación 6 en el que se incrementan específicamente los niveles de ASMasa secretora en el endotelio tumoral mediante la administración de dicho constructo.
11. El vector de expresión para su uso según la reivindicación 6 en el que se incrementan específicamente los niveles de ceramidas en el endotelio tumoral mediante la administración de dicho constructo de terapia génica.

FIG. 1

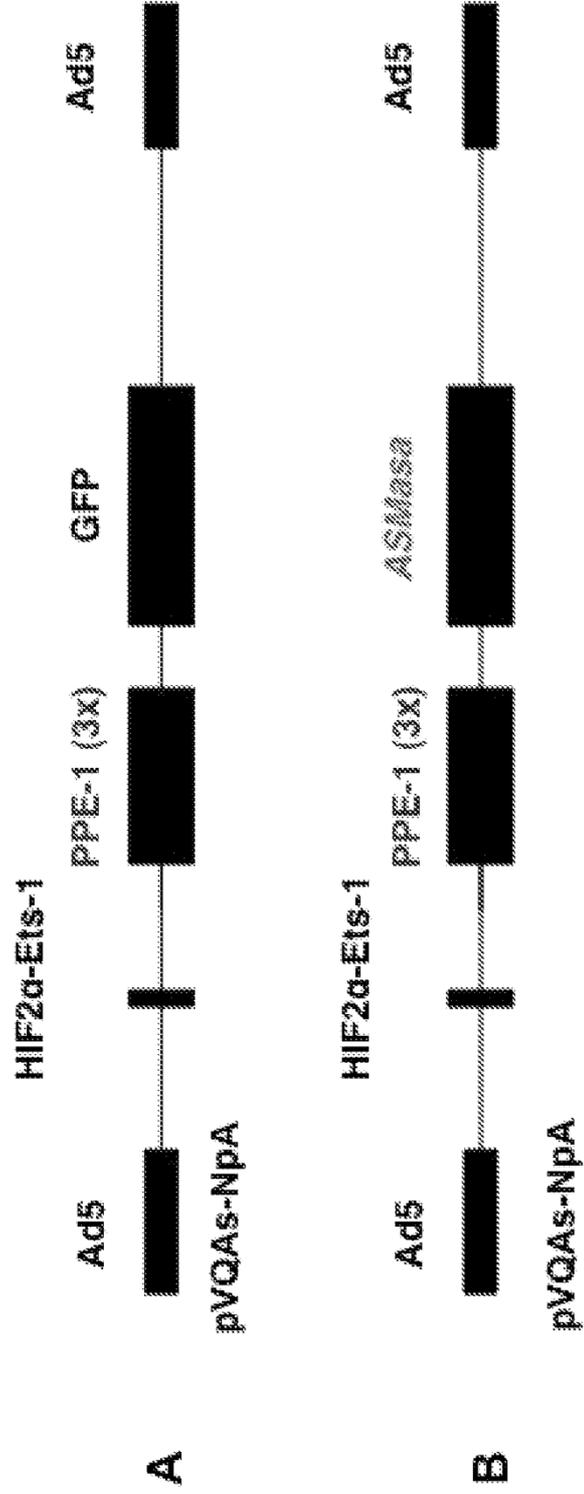


FIG. 2

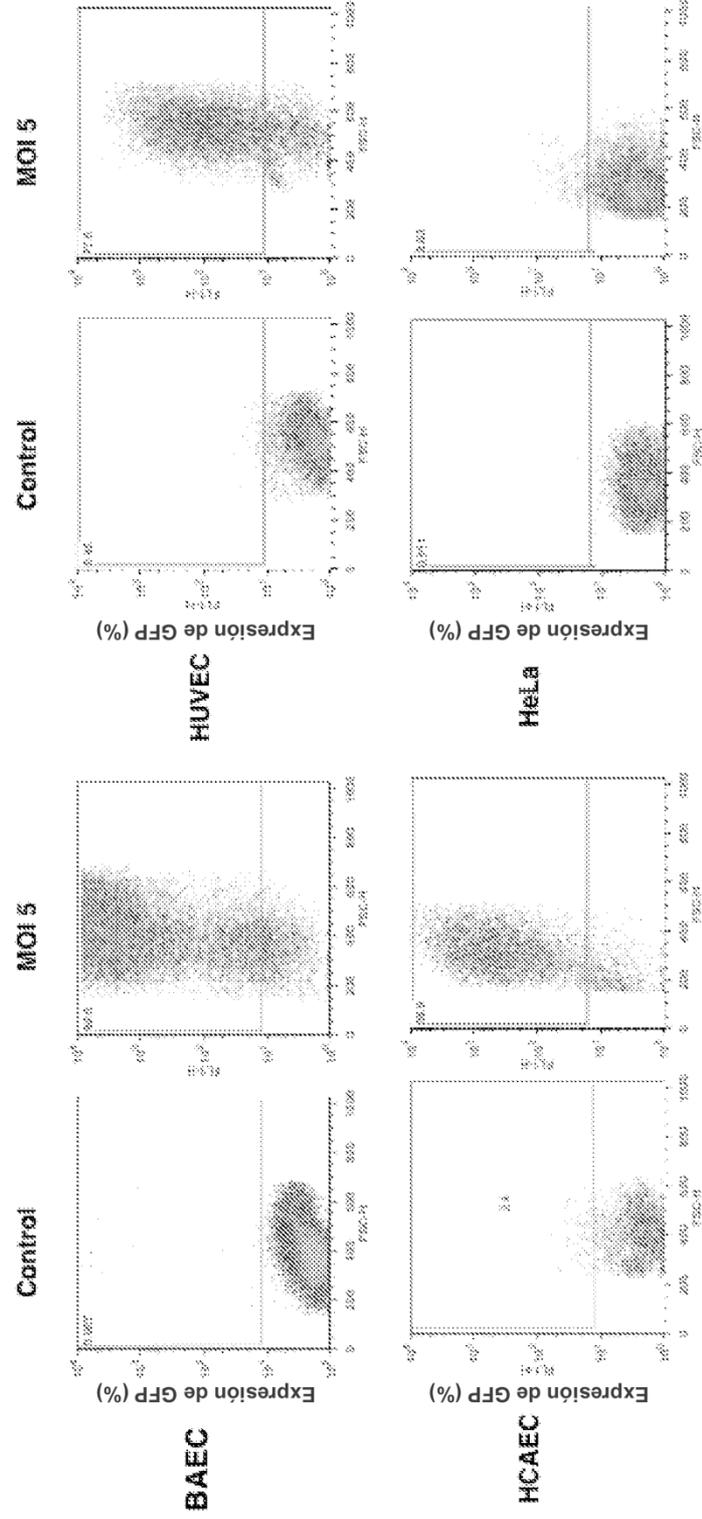
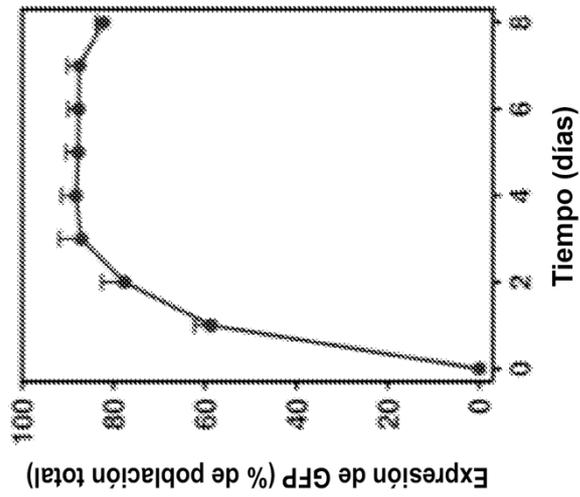


FIG. 3

A



B

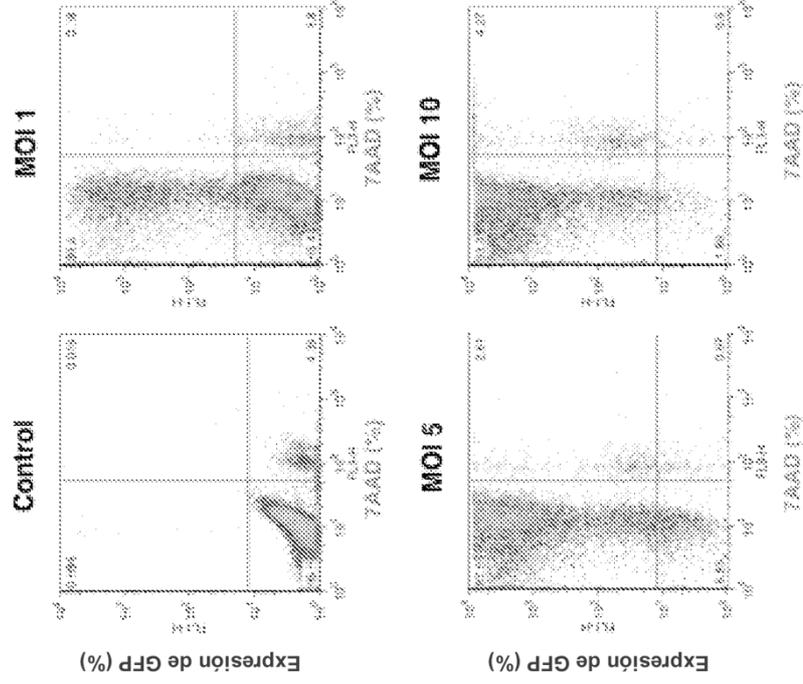


FIG. 4

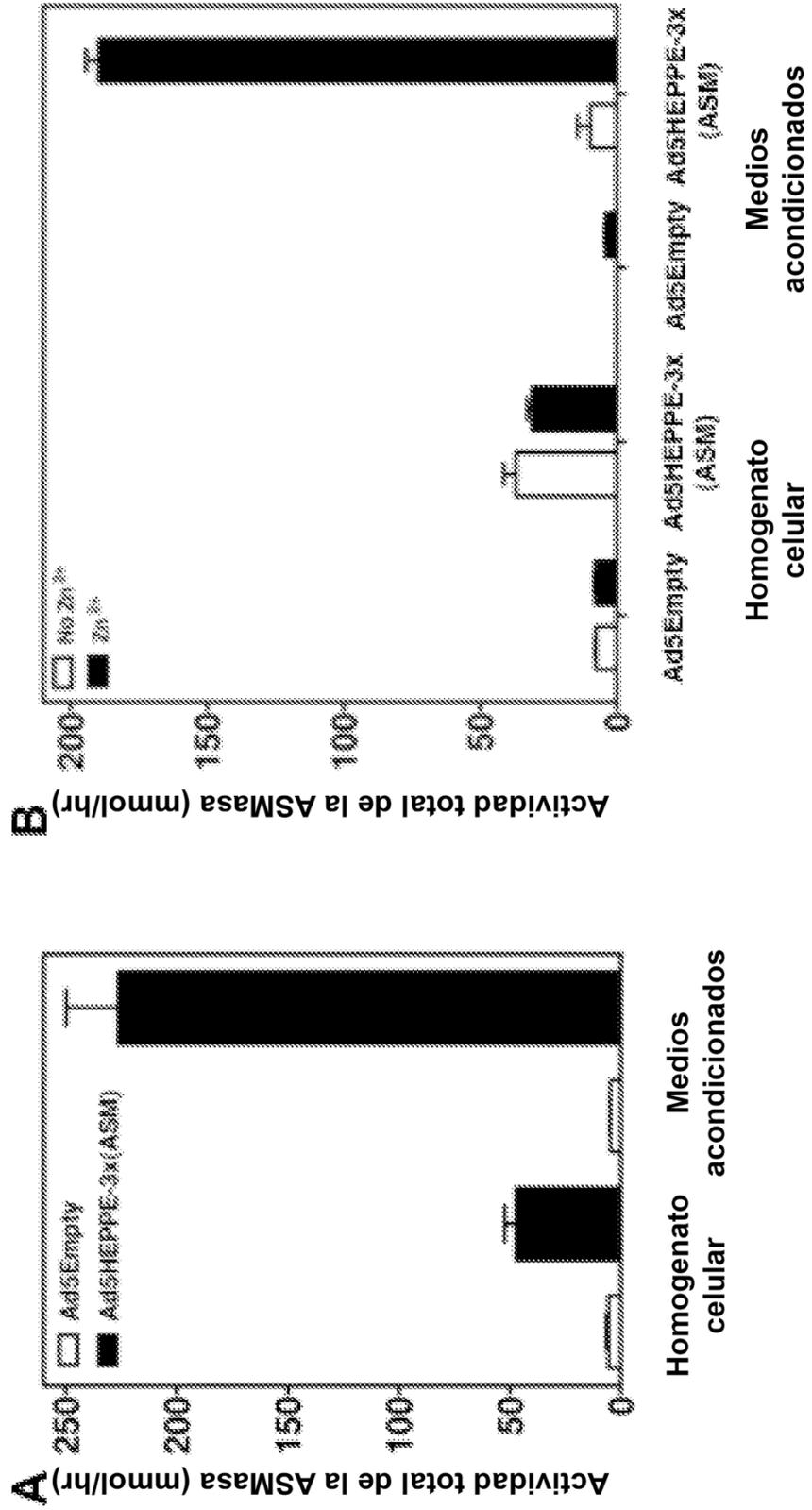


FIG. 5

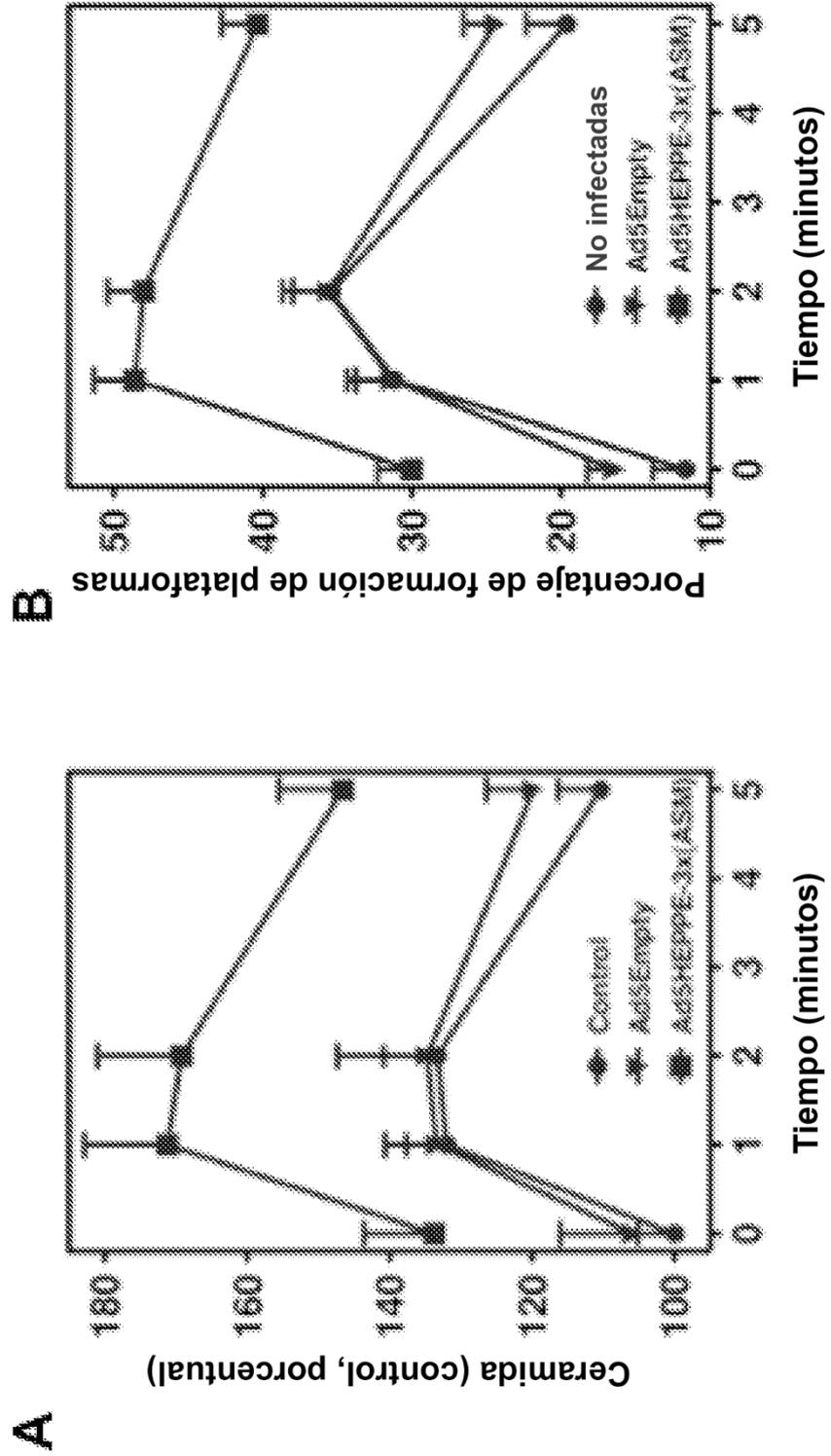


FIG. 6

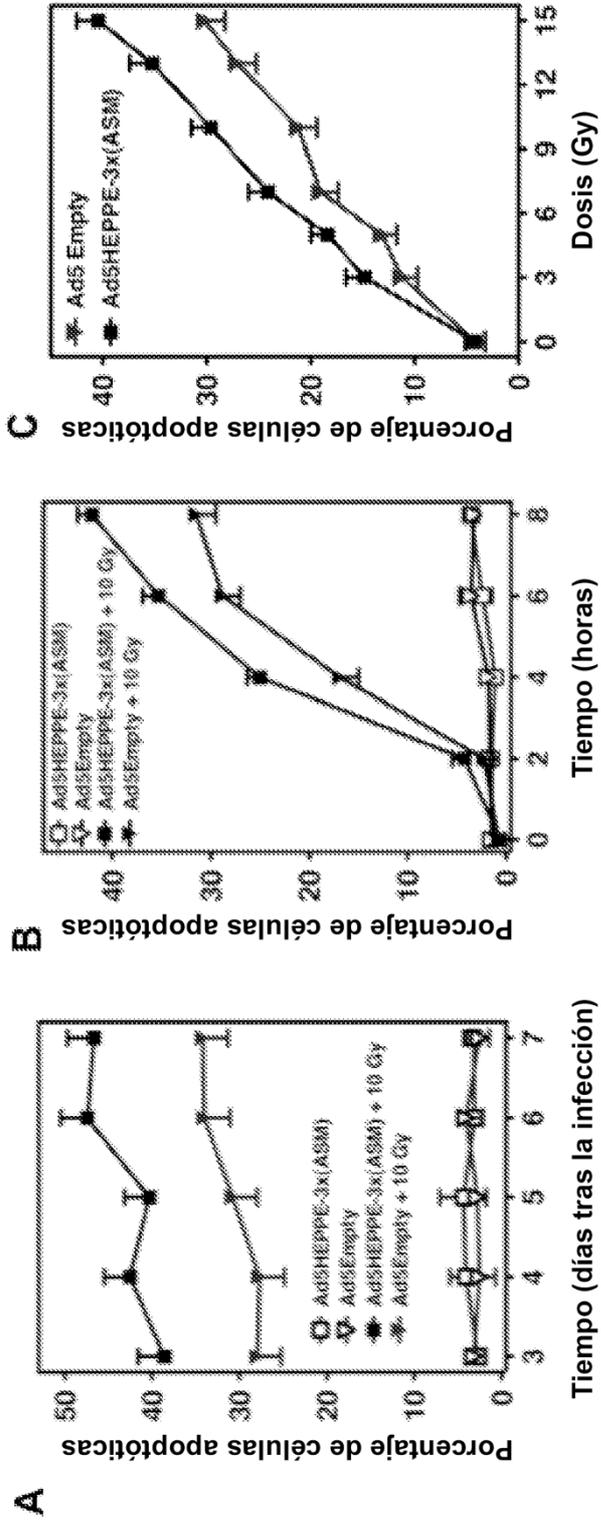
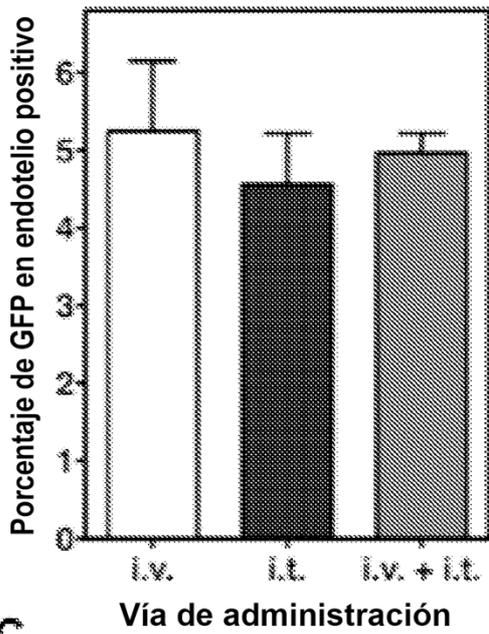
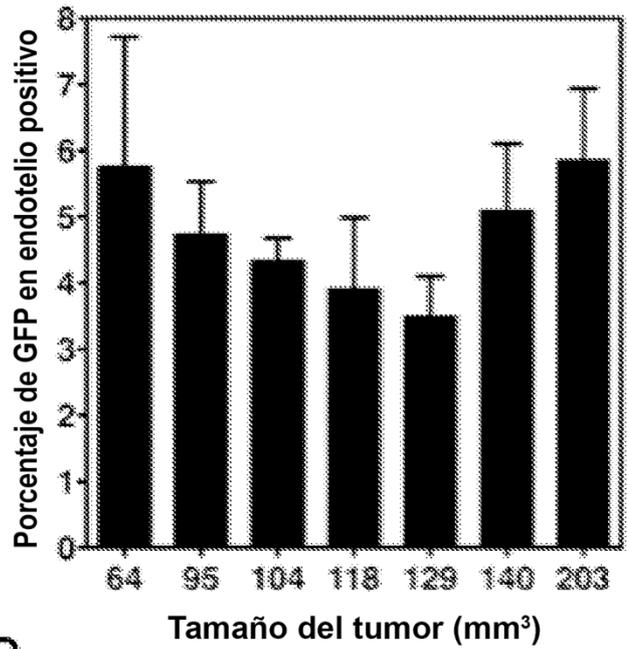


FIG. 7

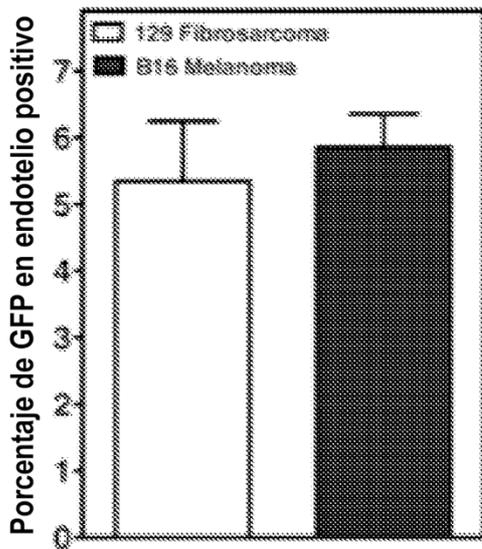
A



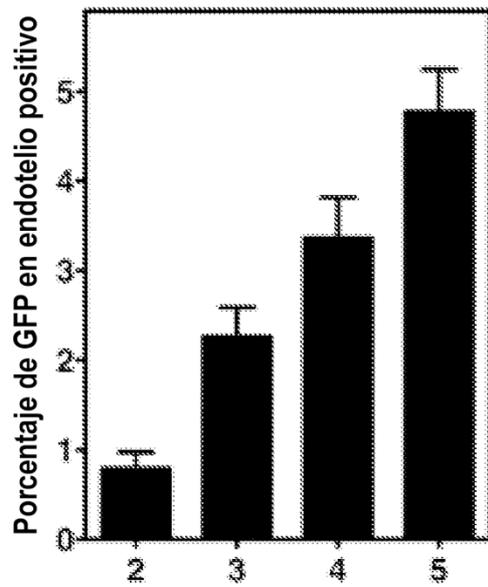
B



C



D



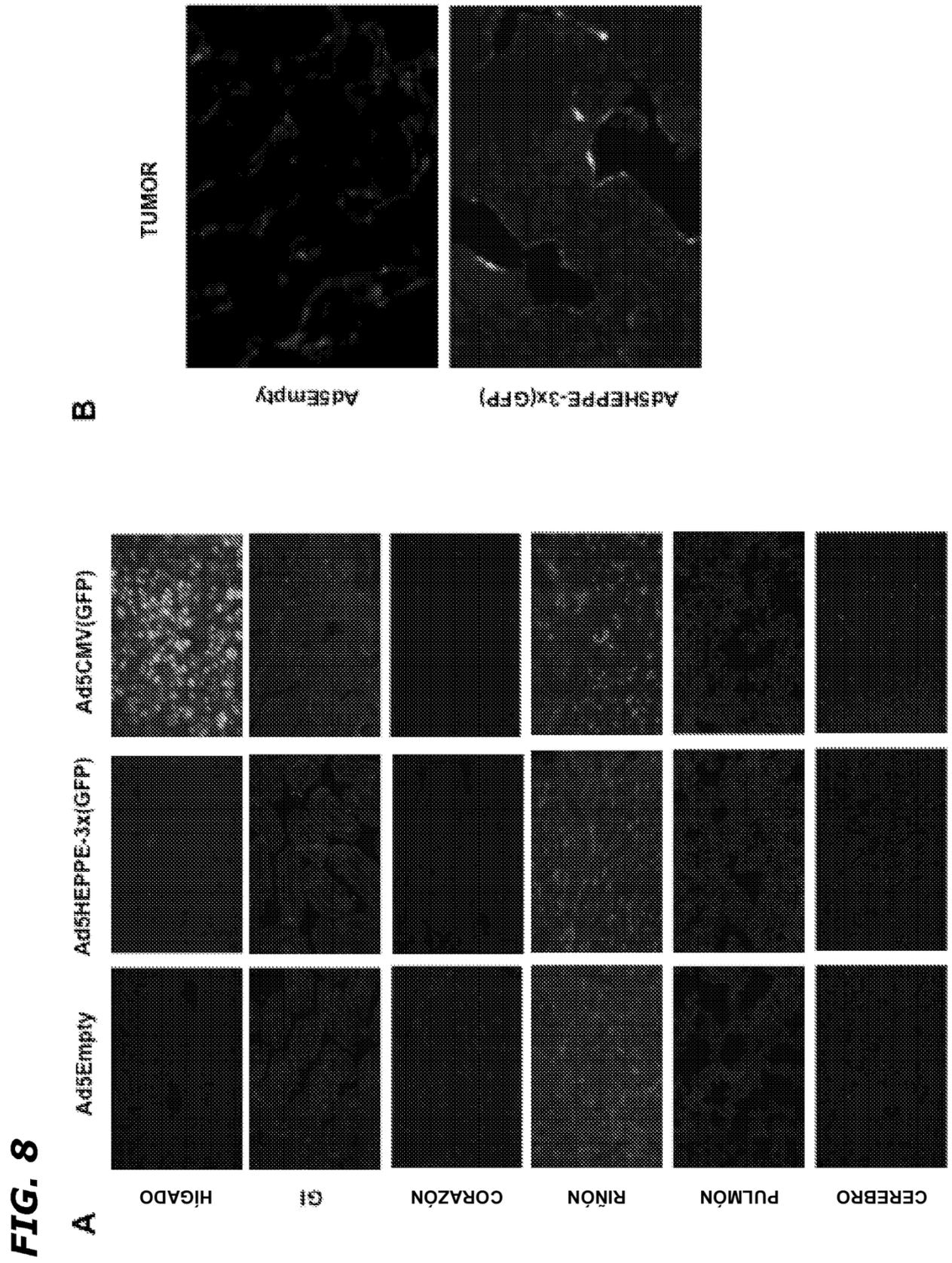


FIG. 9

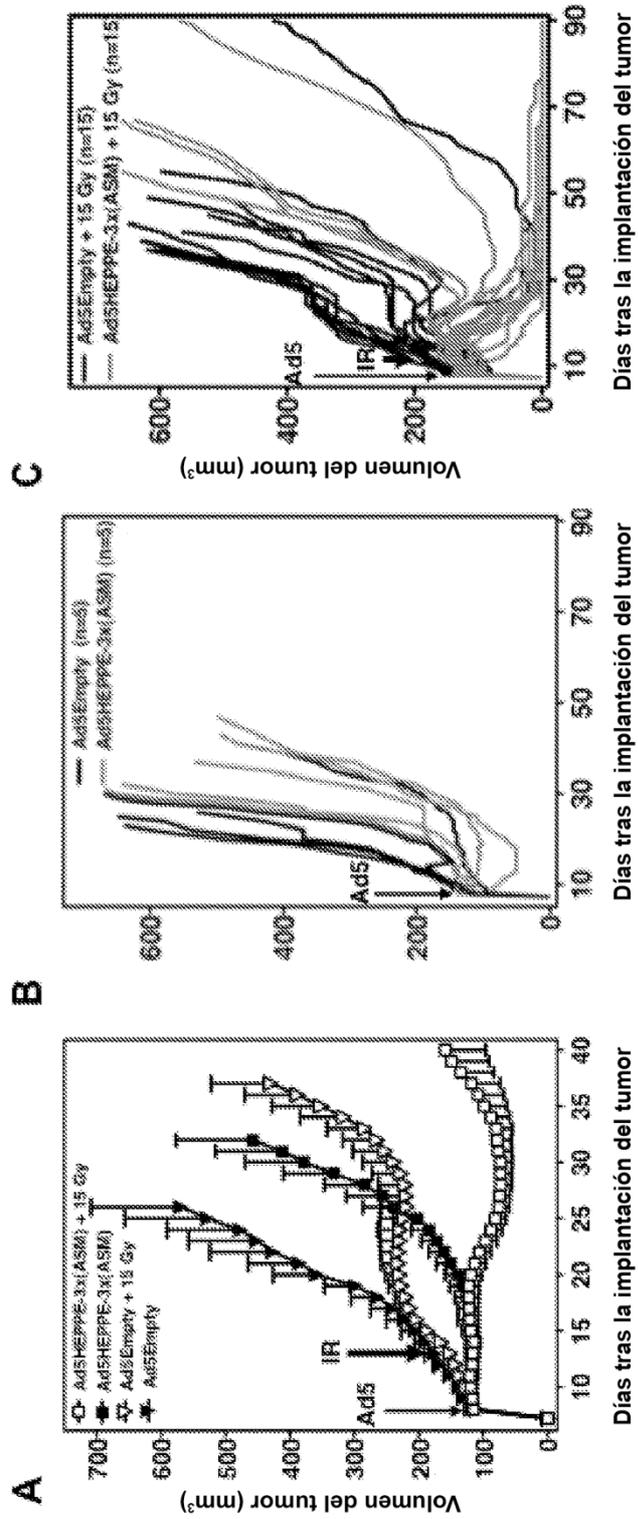
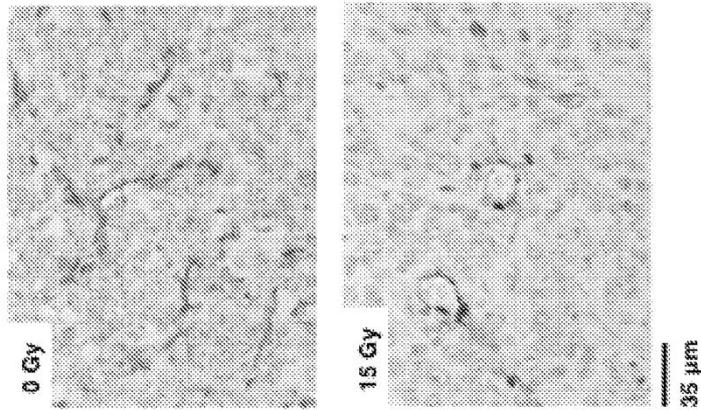


FIG. 10A

Ad5HEPPE-3x(ASM)



Ad5Empty

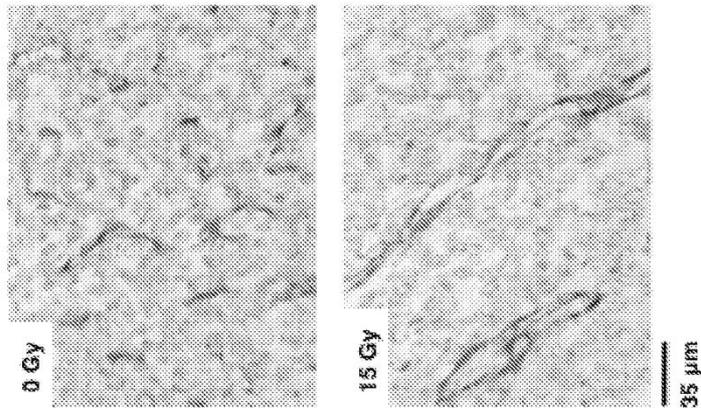


FIG. 10B

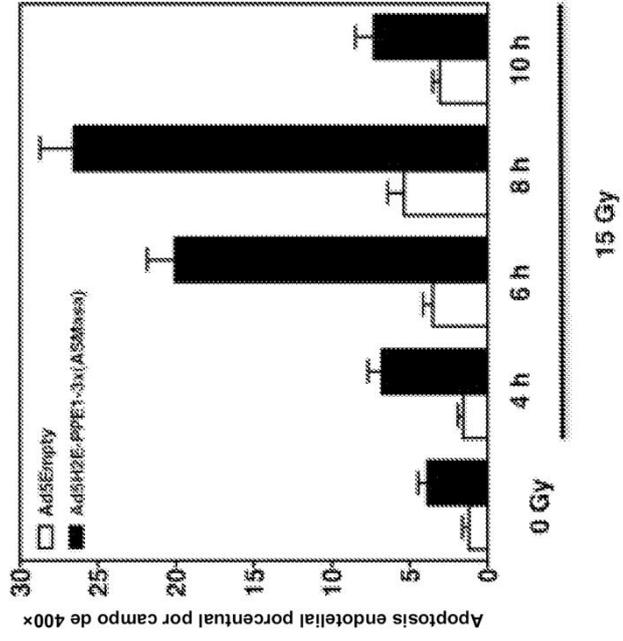


FIG. 11

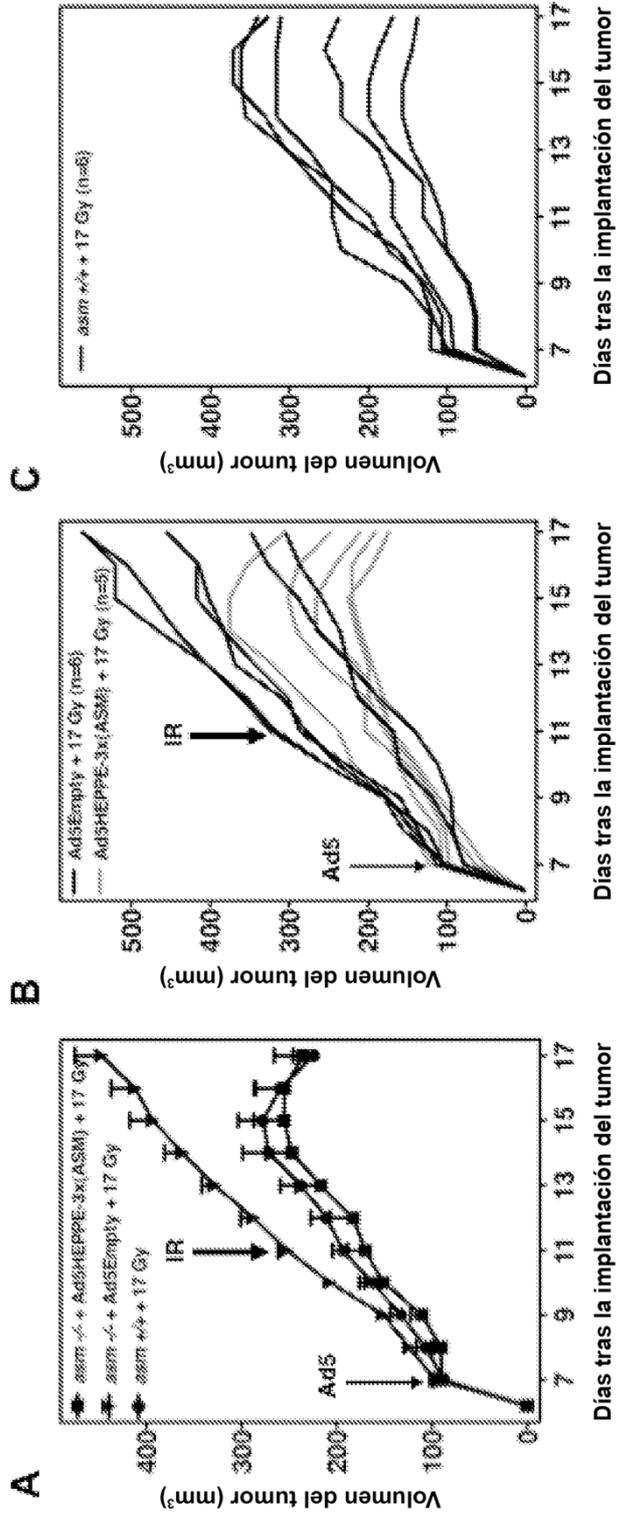


FIG. 12

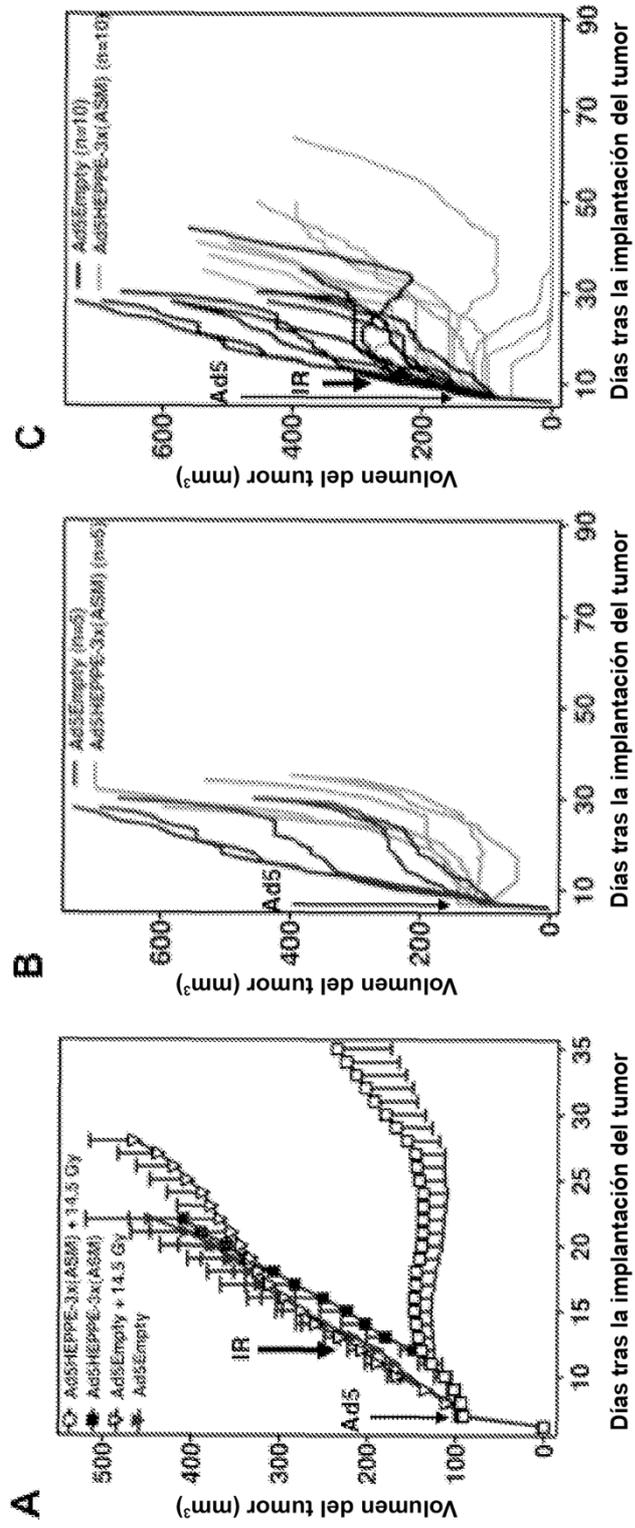


FIG. 13

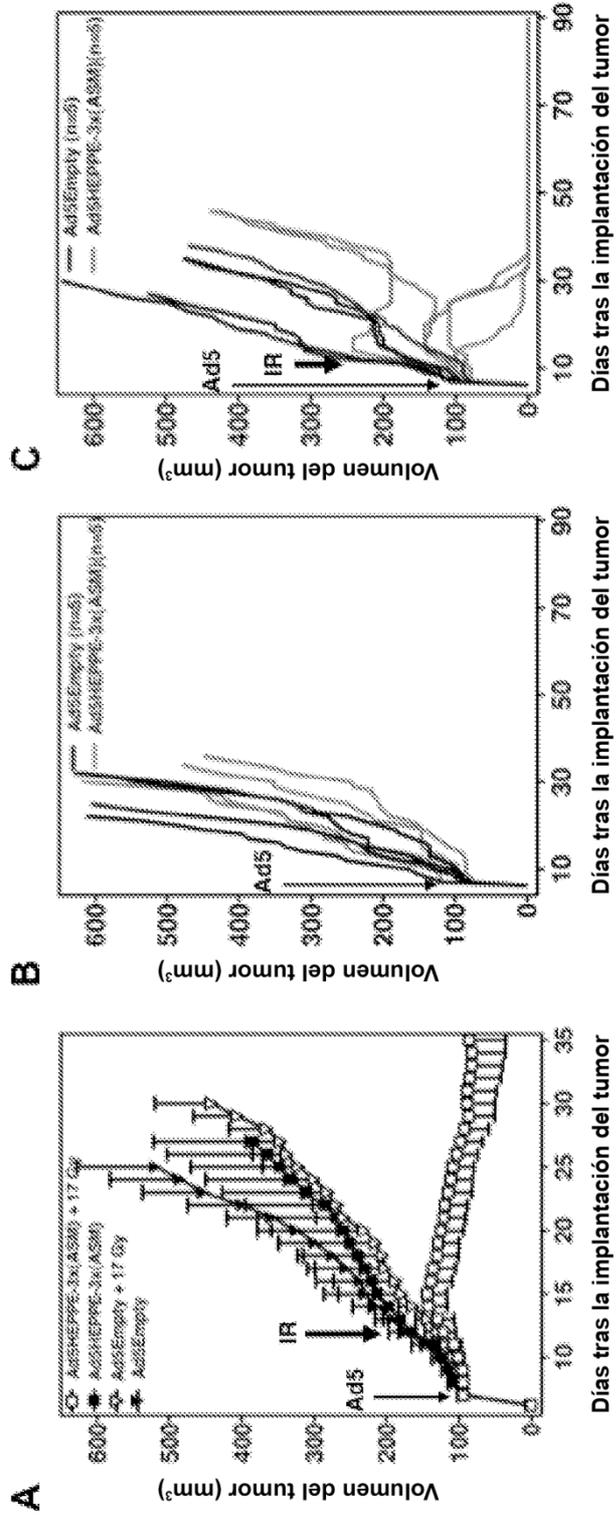


FIG. 14

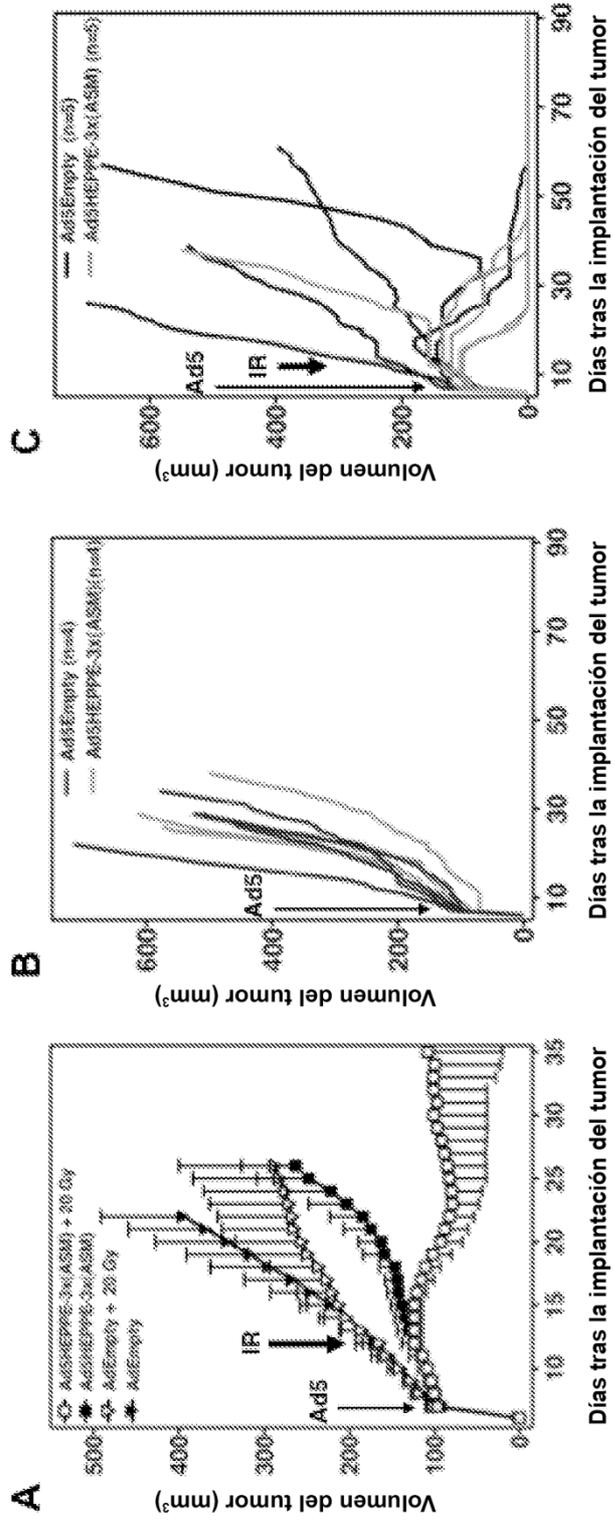


FIG. 15

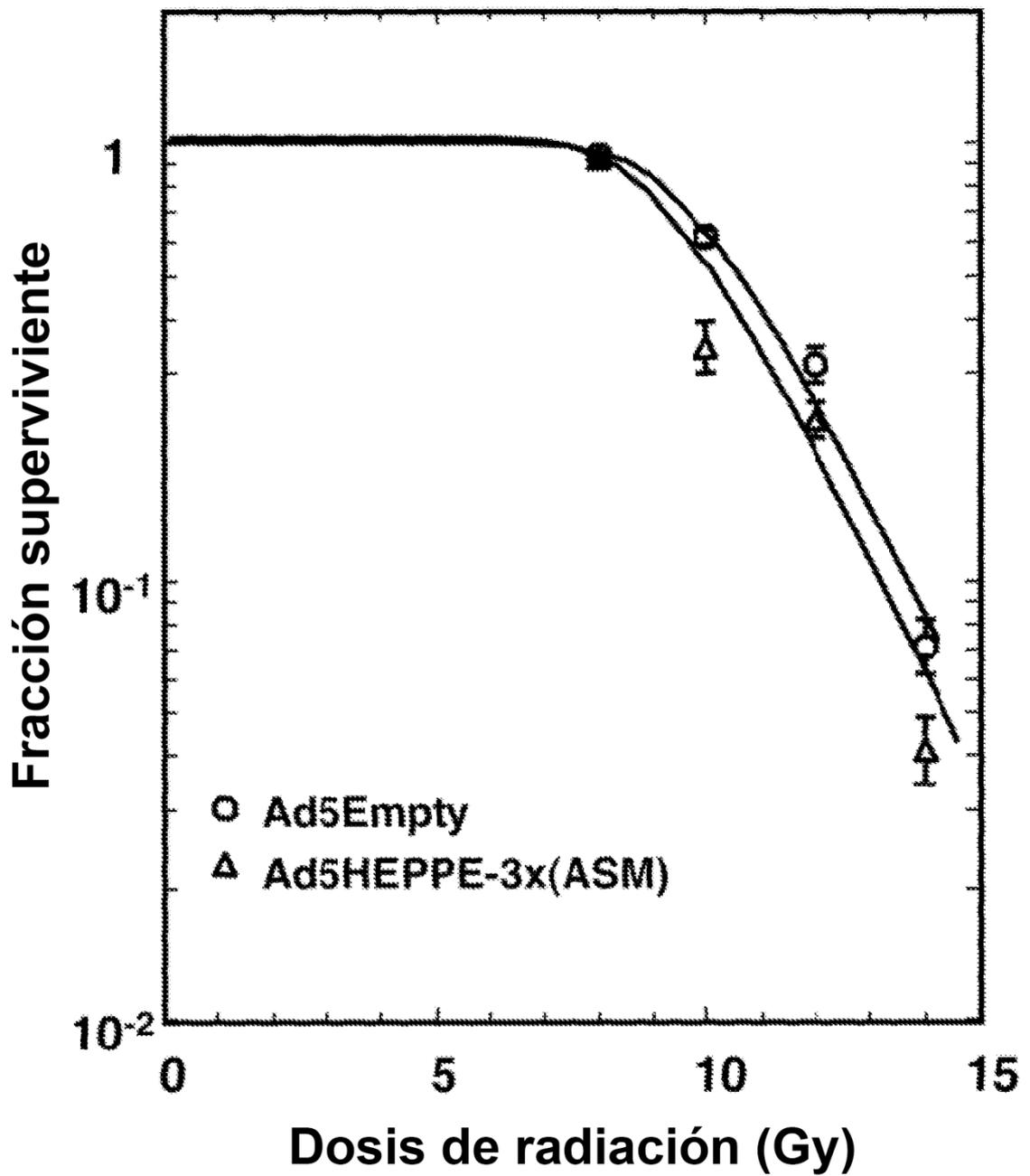


FIG. 16B

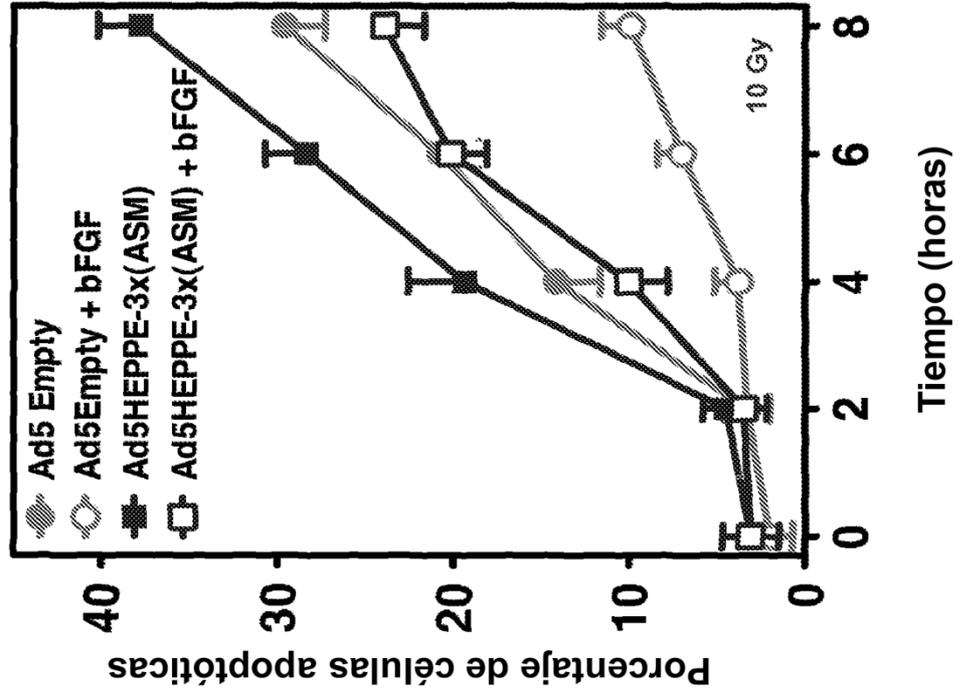


FIG. 16A

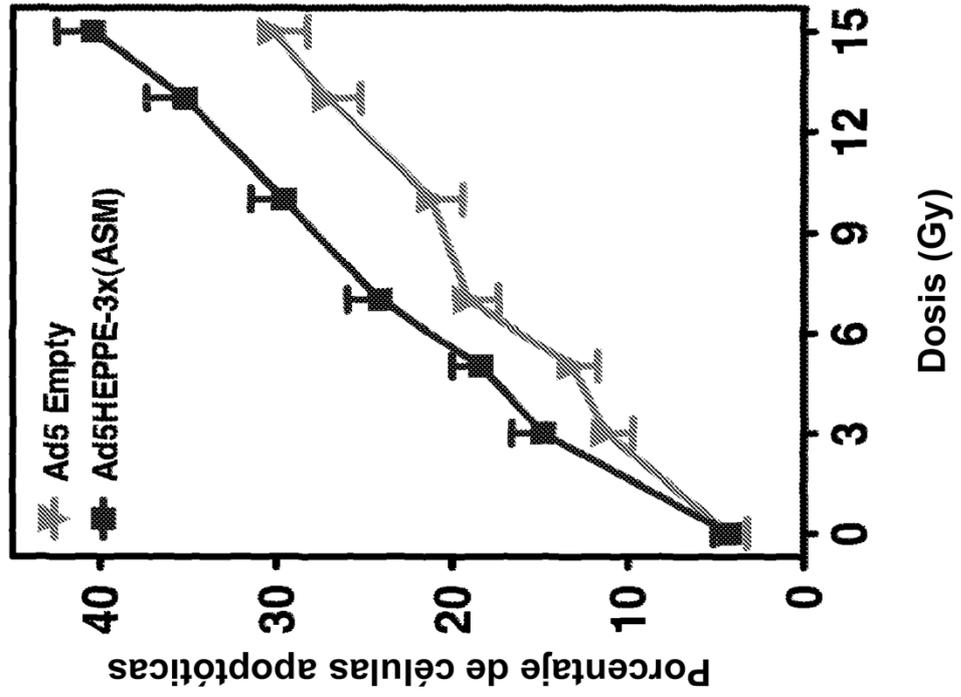


FIG. 17A

Fibrosarcoma MCA/129

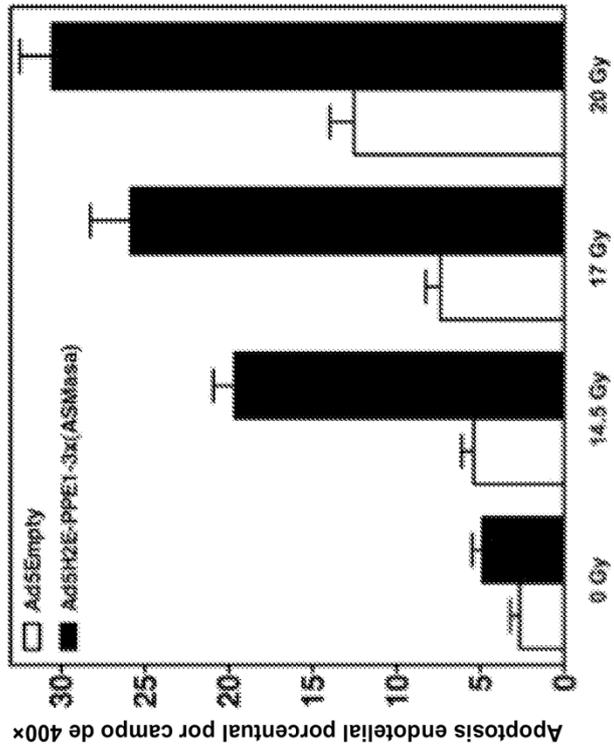


FIG. 17B

Melanoma B16F1

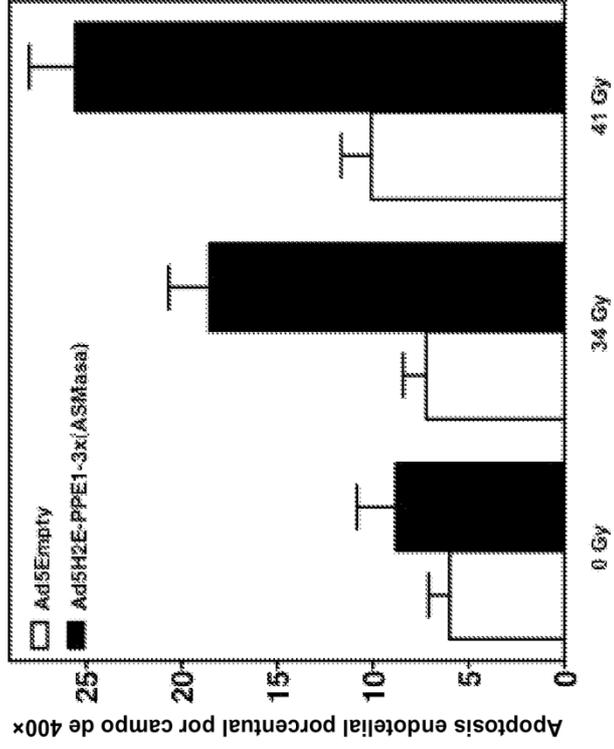
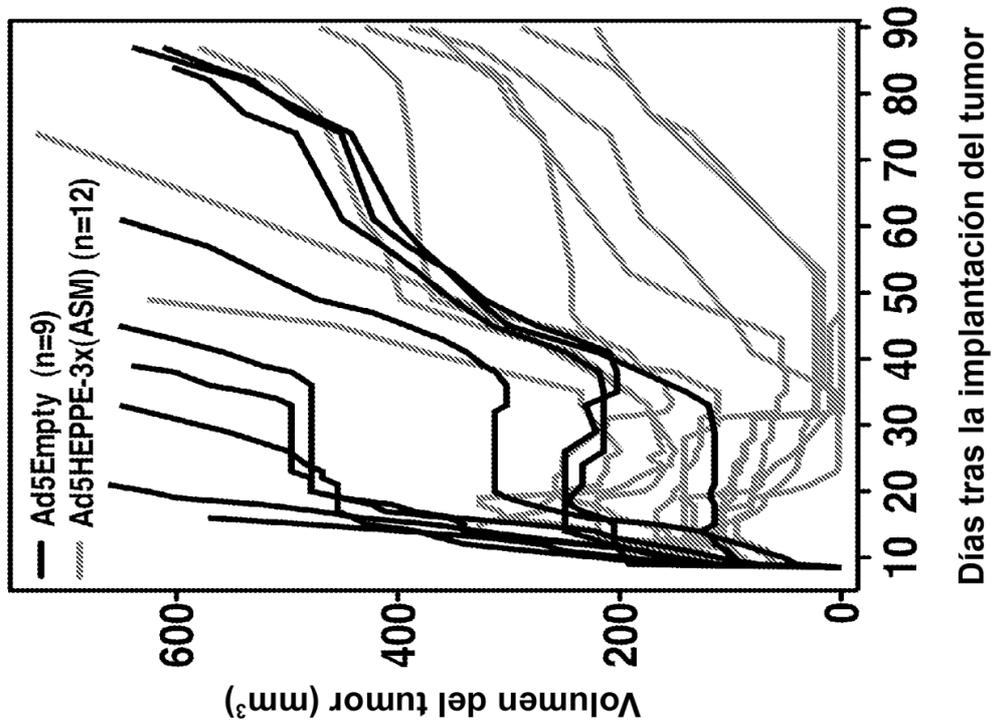
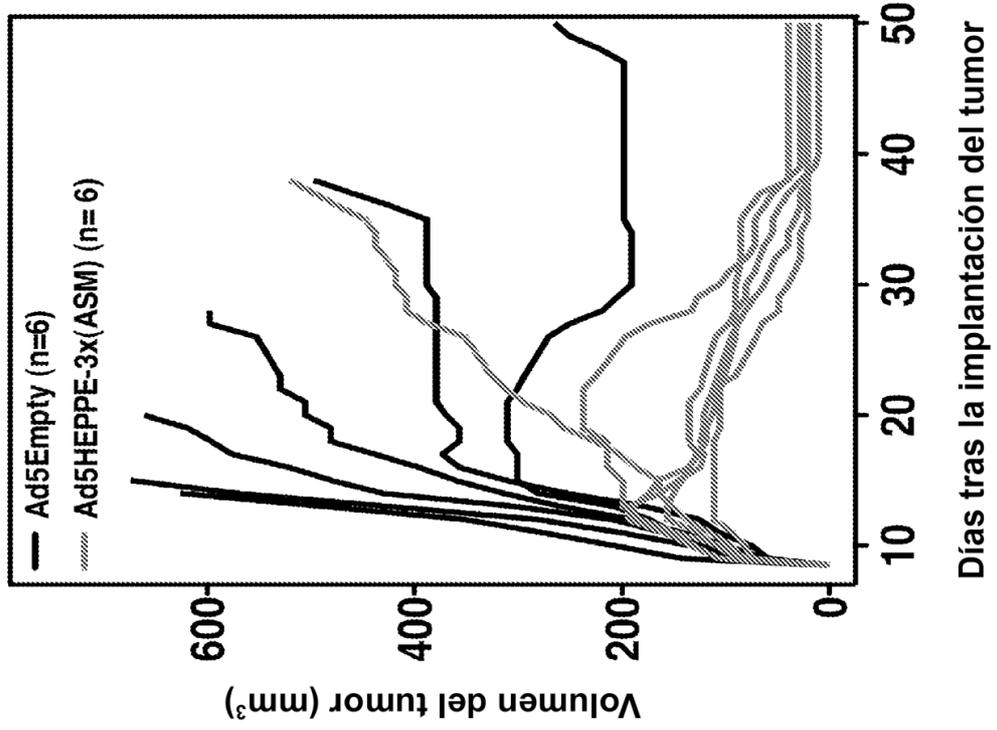


FIG. 18A



Días tras la implantación del tumor

FIG. 18B



Días tras la implantación del tumor