

# Cardiovascular gene therapy: an application of *HIF-1 $\alpha$* gene

## Terapia genowa chorób naczyniowo-sercowych: wykorzystanie genu *HIF-1 $\alpha$*

Maciej Małecki<sup>1</sup>, Robert Proczka<sup>3</sup>, Beata Chmiel<sup>2</sup>, Agnieszka Kotlarz<sup>1</sup>,  
Joanna Chorostowska-Wynimko<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Department of Cell Biology, Centre of Oncology, Maria Skłodowska-Curie Memorial Institute, Warsaw, Poland (Zakład Biologii Komórki, Centrum Onkologii — Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Warszawa)

<sup>2</sup>Student of pharmacy, Warsaw Medical Academy (studentka Farmacji, Warszawski Uniwersytet Medyczny)

<sup>3</sup>2<sup>nd</sup> Department of General, Vascular and Oncological Surgery, Medical University of Warsaw, Warsaw (II Katedra i Klinika Chirurgii, II Wydział Lekarski, Warszawski Uniwersytet Medyczny, Warszawa)

<sup>4</sup>Tuberculosis and Lung Diseases Institute, Warsaw, Poland (Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc, Warszawa)

---

### Abstract

Currently gene therapy is mostly focused on cancer treatment trials, cardiovascular and infectious diseases. Nowadays gene therapy for cardiovascular diseases is recognised thanks to successful clinical trials that have used mainly genes encoding proangiogenic cytokines, eg vascular endothelial growth factor (VEGF), fibroblast growth factor (FGF), hepatic growth factor (HGF). Progress in gene therapy of cardiovascular diseases needs not only basic studies for “new” genes, but also needs good prepared clinical trials.

Hypoxia inducible factor (HIF-1) is a physiological regulator of processes related to angiogenesis with a potential therapeutic meaning. A protein encoded by HIF-1 $\alpha$  activates groups of genes responsible for preservation of oxygen homeostasis, activation of angiogenesis, erythropoiesis, regulation of glucose metabolism. There are known preliminary studies describing that gene HIF-1 $\alpha$  is used in therapy of cardiovascular diseases. Animal trials and first clinic tests point out that administration of gene preparation HIF-1 $\alpha$  efficiently induces neovascularization in ischemic tissues. Further research will indicate if gene HIF will be useful in treating cardiovascular diseases and if yes then in what period of time we will get such a result.

**Key words:** gene therapy, gene preparations, hypoxia, cardiovascular diseases

### Streszczenie

Obecnie terapię genową chorób naczyniowo-sercowych ocenia się głównie dzięki pomyślnym próbom klinicznym opierającym się na wykorzystaniu głównie cytokin proangiogennych, przede wszystkim naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu (VEGF), fibroblastycznego czynnika wzrostu (FGF) czy hepatocytarnego czynnika wzrostu (HGF). Dalszy postęp wymaga kontynuowania prac podstawowych nad poszukiwaniem „nowych” genów, na przykład prowadzenia dobrze przygotowanych (randomizowanych) badań klinicznych. Czynniki transkrypcyjne indukowane przez hipoksję (HIF-1 $\alpha$ ) jest fizjologicznym regulatorem procesów związanych z angiogenezą o potencjalnym znaczeniu terapeutycznym. Białko kodowane przez HIF-1 $\alpha$  aktywuje grupy genów decydujących o utrzymaniu homeostazy tlenu, aktywacji angiogenezy, erytropoezy czy regulujących procesami metabolizmu glukozy. Znane są wstępne wyniki prac eksperymentalnych wykorzystania genu HIF-1 $\alpha$  w terapii chorób naczyniowo-sercowych. Wyniki badań przeprowadzonych na zwierzętach

---

### Address for correspondence (Adres do korespondencji):

dr Robert Proczka

II Katedra i Klinika Chirurgii, II Wydział Lekarski WUM

ul. Żwirki i Wigury 61, 02–091 Warszawa

Tel + 48 (22) 318 63 91, tel/fax: + 48 (22) 841 15 92

e-mail: ramjup@poczta.onet.pl

*i pierwszych prób klinicznych wskazują, iż podawany w postaci preparatu genowego HIF-1 $\alpha$  efektywnie indukuje w niedokrwionych tkankach proces neowaskularyzacji. Dalsze badania wskażą, czy i w jakim czasie preparat genu HIF-1 $\alpha$  będzie użyteczny dla terapii chorób naczyniowo-sercowych.*

**Słowa kluczowe:** terapia genowa, preparaty genowe, hipoksja, choroby naczyniowo-sercowe

Acta Angiol 2008; 14, 4: 125–130

## Introduction

Gene therapy has been known in the clinic for almost 20 years [1]. A sufficient operation of delivery of transgen encoding adenosine deaminase to the lymphocytes of children with severe combined immunodeficiency (SCID-ADA) took place at the end of the 1990s [2]. It encouraged researchers to use gene therapy in many different fields of clinical medicine. Currently gene therapy is mostly focused on cancer treatment trials, and cardiovascular and infectious diseases [1]. In most trials, gene encoding: therapeutic enzymatic proteins, regulating transforming growth factors and its receptors, are transfected into the cells through viral and non-viral vectors.

Nowadays gene therapy for cardiovascular diseases is recognised thanks to successful clinical trials that have used mainly gene encoding proangiogenic cytokines, e.g. vascular endothelial growth factor (VEGF), fibroblast growth factor (FGF), and hepatic growth factor (HGF) [1]. The clinical research projects that have been carried out: FGF Initiating Revascularization Support Trial (FIRST), Angiogenic Gene Therapy trial in patients with stable angine pectoris (AGENT), AGENT-2, -3, Euroinject One, Vascular Endothelial Growth Factor in Ischemia for Vascular Angiogenesis (VIVA) indicate that applied gene preparations are safe for patients, and in many cases an improvement of their clinical state was observed. Taking into consideration the small number of research groups and the experimental character of this research, the final conclusions are still to be discussed. Progress in gene therapy of cardiovascular diseases needs not only basic studies for “new” genes, but also needs well-prepared clinical trials.

Hipoxia-inducible factor (HIF-1) is a physiological regulator of processes related to angiogenesis with a potential therapeutic meaning. A protein encoded by HIF-1 $\alpha$  activates groups of genes responsible for the preservation of oxygen homeostasis, activation of angiogenesis, erythropoiesis, and regulation of glucose metabolism [3]. There are known preliminary studies describing how gene HIF-1 $\alpha$  is used in the therapy of cardiovascular diseases. Animal trials and the first clinic tests indicate that administration of gene prepa-

## Wstęp

Terapię genową stosuje się w leczeniu klinicznym już od niemal 20 lat [1]. Zespół amerykańskich naukowców przeprowadził pod koniec lat 90. zakończony sukcesem zabieg wprowadzenia transgeny kodującego deaminazę adenozyne do limfocytów u dzieci chorych na ciężki złożony niedobór odporności (SCID-ADA) [2]. Zachęciło to kolejnych badaczy do podjęcia prób wykorzystania terapii genowej w rozmaitych obszarach medycyny klinicznej. Obecnie terapia genowa w leczeniu klinicznym obejmuje głównie próby leczenia chorób nowotworowych, naczyniowo-sercowych i infekcyjnych [1]. W większości badań wykorzystuje się wprowadzane do komórek za pomocą wektorów wirusowych lub niewirusowych geny kodujące terapeutyczne białka enzymatyczne, regulatorowe, czynniki wzrostowe i ich receptory.

Obecnie dzięki pomyślnym próbom klinicznym opierającym się na wykorzystaniu głównie genów cytokin proangiogennych, na przykład naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu (VEGF), fibroblastycznego czynnika wzrostu (FGF) czy hepatocytarnego czynnika wzrostu (HGF) rozpoznaje się terapię genową chorób naczyniowo-sercowych [1]. W badaniach klinicznych: *FGF Initiating Revascularization Support Trial (FIRST)*, *Angiogenic Gene Therapy trial in patients with stable angine pectoris (AGENT)*, *AGENT-2, -3*, *Euroinject One*, *Vascular Endothelial Growth Factor in Ischemia for Vascular Angiogenesis (VIVA)* wykazano, iż stosowane preparaty genowe są bezpieczne dla pacjentów, a w wielu przypadkach obserwowano bardzo wyraźną poprawę stanu klinicznego chorych. Ze względu na niewielką liczebność grup badanych i eksperymentalny charakter badań ostateczne wnioski pozostają ciągle w obszarze dyskusji. Postęp w terapii genowej chorób naczyniowo-sercowych wymaga zarówno dalszych dynamicznych prac podstawowych nad poszukiwaniem „nowych” genów, jak i przeprowadzenia dobrze przygotowanych (randomizowanych) badań klinicznych.

Czynnik transkrypcyjny indukowany przez hipoksję (HIF-1 $\alpha$ ) jest fizjologicznym regulatorem procesów związanych z szeroko rozumianą angiogenezą o potencjalnym znaczeniu terapeutycznym. Białko kodowane

ration *HIF-1 $\alpha$*  sufficiently induces neovascularisation in ischaemic tissue. Further research will indicate if gene *HIF* will be useful in treating cardio-vascular diseases, and if yes, then in what period of time can we obtain such a result.

### **HIF-1 $\alpha$ : a universal hypoxia “sensor”, gene activator**

The absence of oxygen guarantees the stability as well as the activity of protein *HIF-1*. A molecule of *HIF-1* contains 2 subunits:  $\alpha$  and  $\beta$ . The protein component is destroyed in oxygen conditions [3–5]. The first phase starts with the degradation of 2 amino acids of proline in the *HIF-1* molecule. They are hydroxylated by the proline hydroxylase enzyme (PHD) in an oxygen-dependent degradation domain (ODD). The reaction depends directly on the presence of oxygen [3, 5]. The von Hippel-Lindau tumour suppressor protein (VHL) is attached to the hydroxyl groups. The VHL molecule recruits complex of E3 ubiquitin ligase. The protein *HIF-1 $\alpha$*  attached to the ubiquitin is guided to be degraded in proteasom [3, 5].

Equally, in oxygen conditions a transactivated part of *HIF-1 $\alpha$*  known as domain C-TAD is hydroxylated. The process of hydroxylation of this region results in the blockade of binding essential transcriptional co-activators [3]. Hypoxia conditions result in the block of the degradation and hydroxylation in proteasom. Stable protein *HIF-1 $\alpha$*  is transported to the nucleus where is bound to domain  $\beta$ . Activation of the gene by *HIF-1 $\alpha$*  protein complex depends on it binding with DNA in which there are hypoxia-responsive element sequences (HRE) [3, 4]. Hypoxia-responsive element is located in area of promoters and regions enhancing expression of selected genes [3, 4].

Protein *HIF-1 $\alpha$*  is a transcriptional factor that has activity under hypoxia conditions, and it stimulates genes that are important to maintain the local homeostasis of oxygen in a cell. Physiological hypoxia, which activates protein *HIF-1 $\alpha$* , guarantees correct function of bone marrow cells, cartilage cells, and the placenta [6]. In embryogenesis the protein is responsible for the formation of the vascular system. It has been proven that simultaneous activation of both isoforms of *HIF-1* and *HIF-2* leads to embryo lethal. On the other hand, expression of *HIF-1* can play a crucial role in the pathological processes of tumour growth [7–9]. Activation of *HIF-1* in the tumour results from an insufficiency of tumour blood vessels together with the high metabolic requirements of fast proliferating tumour cells. Within the tumour exist a variety of hypoxia degrees which reveal a variety of expressions of *HIF-1* [10, 11].

przez *HIF-1 $\alpha$*  aktywuje grupy genów decydujących o utrzymaniu homeostazy tlenu, aktywacji angiogenezy i erytropoezy czy regulujących procesy metabolizmu glukozy [3]. Znane są wstępne wyniki prac eksperymentalnych wykorzystania genu *HIF-1 $\alpha$*  w terapii chorób naczyniowo-sercowych. Na podstawie badań przeprowadzonych na zwierzętach i pierwszych prób klinicznych można wnioskować, iż *HIF-1 $\alpha$*  podawany w postaci preparatu genowego efektywnie indukuje proces neowaskularyzacji w niedokrwionych tkankach. Celem dalszych badań jest wykazanie, czy i w jakim czasie preparat genu *HIF-1 $\alpha$*  będzie użyteczny w leczeniu chorób naczyniowo-sercowych.

### **Czynnik HIF-1 $\alpha$ : uniwersalny “czujnik” hipoksji, aktywator genów**

Brak tlenu zapewnia stabilność i aktywność białka *HIF-1*. Cząsteczka *HIF-1* jest zbudowana z dwóch podjednostek:  $\alpha$  i  $\beta$ . Obecność tlenu działa destrukcyjnie na składnik *HIF-1 $\alpha$*  tego białkowego kompleksu [3–5]. Jednym z pierwszych etapów w degradacji *HIF-1 $\alpha$*  jest hydroksylacja dwóch aminokwasów proliny w obrębie domeny ODD (*oxygen-depend degradation domain*) przez enzym — hydroksylazę proliny (PHD). Jest to reakcja bezpośrednio zależna od obecności tlenu [3, 5]. Do przyłączonych grup hydroksylowych dołącza białkowy czynnik von Hippel-Lindau (VHL). Cząsteczka VHL rekrutuje kompleks ligazy ubikwityny E3. Połączona z ubikwityną proteina *HIF-1 $\alpha$*  zostaje skierowana do degradacji w proteasomie [3, 5].

Część transaktywacyjna *HIF-1 $\alpha$*  — domena C-TAD — również ulega hydroksylacji w obecności tlenu. Hydroksylacja tego regionu powoduje blokadę wiązania ważnych dla transkrypcji koaktywatorów [3]. W warunkach hipoksji, gdy tlen nie jest dostępny, zarówno hydroksylacja, jak i degradacja w proteasomie zostają wstrzymane. Stabilna proteina *HIF-1 $\alpha$*  jest transportowana do jądra komórkowego i na jego terytorium łączy się z obecną tu podjednostką  $\beta$ . Aktywacja genów za pośrednictwem kompleksu białkowego *HIF-1* zależy od związania się kompleksu z nicią DNA w miejscach występowania tak zwanej sekwencji elementów odpowiedzi na hipoksję (HRE) [3, 4]. Sekwencje HRE mogą znajdować się zarówno w obrębie promotorów, jak i regionów wzmacniających ekspresję wybranych genów [3, 4].

Białko *HIF-1* jest czynnikiem transkrypcyjnym aktywnym w warunkach obniżenia stężenia tlenu. Pobudzone przez ten czynnik geny mają znaczenie w ogólnej adaptacji komórki do spadku dostępności tlenu w środowisku oraz umożliwiają utrzymanie przez komórkę lokalnej homeostazy tego gazu [3]. Fizjologiczna hipoksja, która aktywuje białko *HIF-1*, zapewnia bez-

Factor HIF-1 induces expression of the genes responsible for the regulation of cell proliferation (genes: p21, Bcl2, insulin-like growth factor 2 (IGF2) and tumor growth factor  $\alpha$  (TGF- $\alpha$ )), glucose metabolism (glycolise enzymes and enzymes of glucose transport) and also haematopoiesis, angiogenesis, and vascular tonus [genes of: vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor (VEGFR), endothelial nitric oxide synthase (eNOS), heme oxygenase 1 (HO-1), and erythropoietin, transferrin] [3, 4, 8]. It is estimated that in hypoxia conditions more than 40 genes may be activated by protein HIF-1 [5].

### **HIF-1 $\alpha$ gene delivery into ischaemia tissue**

The major goal of angiogenic gene therapy is the development of circulation in pathologic tissue. The transfer of DNA sequence encoding HIF-1 $\alpha$  into ischaemic hearts and limbs may also be of therapeutic significance. An opportunity to improve circulation using gene therapy is extremely interesting in cases when it is not possible to perform an operation, e.g. critical limb ischaemia [5]. An interesting resolution is the transfer of *Vigilant* vectors that not only transfer therapeutic gene, but are also "sensors of hypoxia". There are known researchers who have used vectors with an in-built oxygen-dependent degradation domain (ODD) that comes from protein HIF-1 $\alpha$  [10, 13]. Delivery of oxygen-sensitive ODD fragments with cloned therapeutic gene ensures gene activation in hypoxia conditions. What is more, this mechanism can be placed into the construction of two plasmids/vectors- Double-plasmid/vector system [10, 13]. The first vector contains a domain ODD bound with transgenic activator sequence and with the promoter responsible for limiting expression in a chosen place. The second vector delivers the proper transgene. A practical application of the mechanism is a test that transforms mice cardiocytes with plasmid encoding heme oxygenase gene (HO-1) [14]. The expression of the HO-1 gene depends on GAL4 protein. The presence of GAL4 protein in a cell results from ischaemia induction. This condition discharges plasmid that consists of GAL4 sequence and ODD sequence, simultaneously binding myosin promoter limited expression GAL4 only in cardiomyocytes [14–16]. *Vigilant* vectors are also constructed with HRE sequences, which point out the places where protein HIF-1 binds with DNA. Sometimes vectors with several copies of HRE sequence (about 3 to 9) and with gene encoding therapeutic proteins are delivered into cells [15]. Delivery of the chosen gene together with the HRE sequence increases the expression of therapeutic genes in

pośrednio prawidłowe funkcjonowanie komórek szpiku kostnego, chrząstki i łożyska [6]. W rozwoju embrionalnym białko to odpowiada za formowanie się układu naczyniowego. Wykazano, iż jednoczesna inaktywacja dwóch izoform białka HIF-1 oraz HIF-2 prowadzi do letalności płodu [5]. Jednocześnie ekspresja HIF-1 może także towarzyszyć procesom patologicznym związanym ze wzrostem guza nowotworowego [7–9]. Aktywacja białka HIF-1 w guzie nowotworowym jest wynikiem niewydolności sieci krwionośnej guza w stosunku do wysokich wymagań metabolicznych szybko proliferujących komórek nowotworu. W obrębie samego guza istnieje zróżnicowanie pod względem stopnia hipoksji i w konsekwencji występuje także miejscowo różny poziom ekspresji HIF-1 [10, 11].

Czynnik HIF-1 indukuje ekspresję genów regulujących proliferację komórek [geny: p21, Bcl2, czynników wzrostu insulinopodobnego (IGF2) i transformującego (TGF- $\alpha$ )], metabolizm glukozy (geny enzymów glikolizy, transporterów glukozy) oraz hematopoezę, angiogenezę i napięcie naczyniowe [geny naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu (VEGF) i jego receptorów (VEGFR), syntetaz tlenku azotu (NOS), endoteliny, oksygenazy hemowej 1 (HO-1), erytropoetyny, transferyny] [3, 4, 8]. Szacuje się, że w warunkach niedotlenienia ponad 40 genów może podlegać aktywacji za pośrednictwem białka HIF-1 [5].

### **Wprowadzanie genu HIF-1 $\alpha$ do niedokrwionych tkanek**

Bezpośrednim celem angiogennej terapii genowej jest poprawa ukrwienia zmienionych chorobowo tkanek. Transfer do niedokrwionych obszarów kończyn czy serca sekwencji DNA kodującej HIF-1 $\alpha$  również może mieć znaczenie terapeutyczne. Możliwość poprawy ukrwienia drogą terapii genowej z udziałem tego genu jest szczególnie interesująca w sytuacjach, gdy leczenie wyklucza interwencję chirurgiczną (np. w wypadku krytycznego niedokrwienia kończyn) [5]. Ciekawym rozwiązaniem wydaje się być zastosowanie wektorów *Vigilant*, które obok wprowadzenia terapeutycznego genu odgrywają rolę „czujników” hipoksji. Znane są przykłady badań, w których wykorzystano wektory z wbudowaną domeną ODD białka HIF-1 $\alpha$  [10, 13]. Wprowadzenie wrażliwego na tlen fragmentu ODD do wektora z wklonowanym genem terapeutycznym zapewnia aktywację transgeny tylko w warunkach niedotlenienia. Dodatkową korzyścią wydaje się rozbudowanie tego mechanizmu na układ złożony z dwóch plazmidów/wektorów, tak zwany *double-plasmid/vector system* [10, 13]. Pierwszy wektor zawiera sekwencję domeny ODD połączoną z sekwencją aktywatora trans-

**Table I.** Clinical trials with HIF-1 $\alpha$  gene**Tabela I.** Próby kliniczne z wykorzystaniem genu HIF-1 $\alpha$ 

Trial ID	Indication	Phase	Gene	Vector	Administration route
Badanie	Wskazania	Faza	Gen	Wektor	Droga podania
UK-135	CLI	II	HIF-1 $\alpha$ /VP16	Adenovirus	<i>i.m.</i>
UK-123	IC	II	HIF-1 $\alpha$ /VP16	Adenovirus	<i>i.m.</i>
UK-063	CAD	I	HIF-1 $\alpha$	Adenovirus	<i>i.m.c.</i>
US-329	PAD	I	HIF-1 $\alpha$ /VP16	Adenovirus	<i>i.m.</i>
US-327	PAD	I	HIF-1 $\alpha$ /VP16	Adenovirus	<i>i.m.</i>
US-374	CAD	I	HIF-1 $\alpha$ /VP16	Adenovirus	<i>i.m.c.</i>
US-407	CAD	I	HIF-1 $\alpha$ /VP16	Adenovirus	<i>i.m.c.</i>
US-661	PAD	II	HIF-1 $\alpha$ /VP16	Adenovirus	<i>i.m.</i>
US-735	PAD	II	HIF-1 $\alpha$ /VP16	Adenovirus	<i>i.m.</i>

CLI — critical limb ischemia (krytyczne niedokrwienie kończyn dolnych); IC — intermittent claudication (chromanie przestankowe); CAD — coronary artery disease (niedokrwienie mięśnia sercowego); PAD — peripheral artery disease (miażdżycza naczyń obwodowych); *i.m.* — intramuscular (domięśniowo); *i.m.c.* — intramyocardial (do mięśnia sercowego)

low-oxygen conditions [16]. Very often the stability of protein encoded by cloned transgene is taken into account while designing gene preparations encoding HIF-1 $\alpha$ . It has been pointed out that in normoxia conditions an HIF-1 $\alpha$  molecule maintains stability for about 10 minutes [17]. Trials of enhancement protein stability are related to designing vectors which contain an expression cassette with the HIF-1 $\alpha$  gene together with domain VP16 from the herpes simplex virus. The attached fragment of VP16 increases HIF stability and what is more influences the effectiveness of transcriptional activation of target genes [17, 18]. *In vitro* studies (cell line HeLa, C6 and Hep3B) have proved that cell transfection with hybrid vector HIF-1 $\alpha$ /VP16 results in gene activation of lactate dehydrogenase A, VEGF, enolase 1, aldolase A, *Glut-1*, and transferrin in oxygen conditions [18]. Animal studies have shown that delivery of vector HIF-1 $\alpha$ /VP16 corrects blood flow, influences blood pressure, and stimulates neoangiogenesis [5, 17–19]. In spite of the wide spectrum of interaction of HIF-1 with DNA, delivery of vector HIF-1 $\alpha$ /VP16 into the skeletal muscle does not change the number of erythrocytes, hematocrit, or the level of haemoglobin. It indicates a lack of induction erythropoietin gene. Moreover, transfectional activity of the used plasmid vector is restricted to the place of the injection [18].

### Clinical studies

The Table I shows assembled examples of clinical trials of gene therapy cardiovascular diseases in which HIF-1 was used. Currently, vectors encoding HIF-1 $\alpha$  and hybrid constructs HIF-1 $\alpha$ /VP16 are used in trials. Expression plasmid vectors or adenoviruses are applied.

genu oraz z promotorem odpowiedzialnym za ograniczenie ekspresji tylko do wybranego miejsca. Natomiast za pomocą drugiego wektora wprowadza się właściwy transgen. Przykładem zastosowania tego typu układu jest próba transfekcji mięśnia sercowego myszy plazmidem kodującym gen oksydazy hemowej (*HO-1*) [14]. Ekspresję genu *HO-1* uzależnia się od białka GAL4. Pojawienie się w komórce białka GAL4 jest możliwe tylko podczas indukcji niedokrwienia dzięki plazmidowi powstałemu z połączenia sekwencji GAL4 z sekwencją ODD. Ponadto jednoczesne przyłączenie do plazmidu promotora miozyny ogranicza ekspresję GAL4 tylko do komórek serca [14–16]. Wektory *Vigilant* konstruuje się również przez zastosowanie sekwencji *HRE*, które wyznaczają miejsce wiązania się białka HIF-1 z DNA. Niekiedy próbuje się wprowadzać do komórek wektory zawierające kilka kopii (około 3–9 powtórzeń) sekwencji *HRE*, do których dołącza się geny kodujące białka o funkcji terapeutycznej [15]. W efekcie w warunkach obniżonej dostępności tlenu wprowadzenie do komórek wybranego genu w połączeniu z powtórzeniami *HRE* podnosi ekspresję terapeutycznego genu [16].

W projektowaniu preparatów genowych kodujących czynnik HIF-1 $\alpha$  bardzo często uwzględnia się również stabilność białka kodowanego przez klonowany transgen. Wskazuje się, iż w warunkach normoksji cząsteczka HIF-1 $\alpha$  utrzymuje stabilność przez około 10 minut [17]. Próby wzmocnienia stabilności białka wiążą się z konstruowaniem wektorów, których kasyety ekspresyjne zawierają gen HIF-1 $\alpha$  połączony z pochodzącą od wirusa opryszczki domeną białka VP16. Dołączony fragment VP16 zwiększa stabilność HIF, wpływając tym samym na efektywność aktywacji transkrypcji docelowej

The published clinical data is promising, but its character is still preliminary.

### References

1. www.wiley.com
2. Blaese RM, Culver KW, Miller AD et al (1995) T lymphocyte-directed gene therapy for ADA- SCID: initial trial results after 4 years. *Science*, 270: 475–480.
3. Zagórska A, Dulak J (2004) HIF-1 the knowns and unknowns of hypoxia sensing. *Acta Biochem Polon*, 3: 563–585.
4. Hänze J, Eul BG, Savai R (2003) RNA interference for HIF-1 alpha inhibits its downstream signaling and affects cellular proliferation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 312: 571–577.
5. Hewiston KS, Schofield CJ (2004) The HIF pathway as a therapeutic target. *DDT* 9: 704–710.
6. Blagosklonny MV (2004) Antiangiogenic therapy and tumor progression. *Cancer Cell*, 5: 13–17.
7. Carins RA, Papandreou I, Sutphin PD, Denko NC (2007) Metabolic targeting of hypoxia and HIF-1 in solid tumors can enhance cytotoxic chemotherapy. *PNAS*, 104: 9445–9450.
8. Semenza GL (2007) Evaluation of HIF-1 inhibitors as anti-cancer agents. *Drug Discovery Today*, 12: 853–859.
9. Song X, Liu X, Chi W et al (2006) Hypoxia-induced resistance to cisplatin and doxorubicin in non-small cell lung cancer is inhibited by silencing of HIF-1 alpha gene. *Cancer Chemother Pharmacol*, 58: 776–784.
10. Maxwell PH (2005) The HIF pathway in cancer. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 16: 523–530.
11. Ravi R, Mookerjee B, Bhujwala ZM et al (2000) Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Genes Develop*, 1: 34–44.
12. Dai S, Huang ML, Hsu CY, Chao KS (2003) Inhibition of hypoxia inducible factor 1 alpha causes oxygen-independent cytotoxicity and induces p53 independent apoptosis in glioblastoma cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 55: 1027–1036.
13. Tang Y, Schmitt-Ott K, Qian K, Kagiyama S, Phillips MI (2002) Vigilant vectors: adeno-associated virus with a biosensor to switch on amplified therapeutic genes in specific tissues in life-threatening diseases. *Methods*, 28: 259–266.
14. Tang YL, Tang Y, Zhang YC, Qian K, Shen L, Phillips MI (2004) Protection from ischemic heart injury by a vigilant heme oxygenase-1 plasmid system. *Hypertension*, 43: 746–751.
15. Dulak J, Zagórska A, Wegiel B, Loboda A, Józkowicz A (2006) New Strategies for Cardiovascular Gene Therapy. Regulated Preemptive Expression of Proangiogenic and Antioxidant Genes. *Cell Biochem Biophys*, 44: 31–42.
16. Tang Y, Jackson M, Qian K, Phillips I (2002) Hypoxia in-

wych dla HIF-1 genów [17, 18]. W badaniach *in vitro* (linie komórkowe HeLa, C6 oraz Hep3B) wykazano, iż po transfekcji komórek wektorem hybrydowym HIF-1 $\alpha$ /VP16 dochodzi do aktywacji genów dehydrogenazy mleczanowej A, VEGF, enolazy I, aldolazy A, Glut-1 oraz transferyny w warunkach dostępności tlenu [18]. W badaniach przeprowadzonych na zwierzętach laboratoryjnych wykazano również, iż podanie wektora HIF-1 $\alpha$ /VP16 poprawia przepływ krwi, wpływa na wartość ciśnienia krwi oraz stymuluje neoangiogenezę [5, 17–19]. Pomimo szerokiego spektrum oddziaływania białka HIF-1 na DNA wprowadzenie do mięśnia szkieletowego wektora HIF-1 $\alpha$ /VP16 nie zmienia liczby czerwonych krwinek, hematokrytu oraz stężenia hemoglobiny. Można na tej podstawie wnioskować o braku indukcji genu erytropoetyny oraz sądzić, iż aktywność transfekcyjna zastosowanego wektora plazmidowego ogranicza się do miejsca jego iniekcji [18].

### Badania kliniczne

W tabeli I przedstawiono przykłady prób klinicznych terapii genowej chorób naczyniowo-sercowych, w których zastosowano gen *HIF-1*. Obecnie w badaniach wykorzystuje się wektory kodujące HIF-1 $\alpha$  oraz konstrukty hybrydowe HIF-1 $\alpha$ /VP16. Stosuje się ekspresyjne wektory plazmidowe lub pochodzenia adenowirusowego. Na podstawie publikowanych danych, mimo iż mają one charakter badań wstępnych, można spodziewać się dobrych wyników badań klinicznych.

17. ducible double plasmid system for myocardial ischemia gene therapy. *Hypertension*, 39: 695–698.
17. Wihide ME, Jones WK (2006) Potential therapeutic gene for the treatment of ischemic disease: Ad2/Hypoxia-Inducible Factor-1 alpha (HIF-1)/VP16 enhances B-type natriuretic peptide gene expression via a HIF-1 responsive element. *Perspective*, 69: 1773–1778.
18. Vincent KA, Shyu K, Luo Y et al (2000) Angiogenesis is induced in a rabbit Model of hindlimb Ischemia by naked DNA encoding an HIF-1  $\alpha$ /VP16 hybrid transcription factor. *Circulation*, 102: 2255–2261.
19. Shyu K, Wang M, Wang B et al (2002) Intramyocardial injection of naked DAN encoding HIF-1 $\alpha$ /VP16 hybrid to enhance angiogenesis in an acute myocardial infarction model in the rat. *Cardiovascular Research*, 54: 576–583.