



UNIVERSITAT DE BARCELONA

ICO
Institut Català d'Oncologia
Hospital Duran i Reynals



UNIVERSITAT DE BARCELONA
FACULTAT DE FARMÀCIA
DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR
PROGRAMA DE DOCTORAT EN BIOTECNOLOGIA (bienni 2003-2005)

**AUGMENT DE L'EFICÀCIA ANTITUMORAL D'ADENOVIRUS
REPLICATIUS MITJANÇANT L'EXPRESSIÓ DE
HIALURONIDASA I PROTEÏNES FUSOGÈNIQUES DE
MEMBRANA**

SÒNIA GUEDÁN CARRIÓ

Abril, 2009

**AUGMENT DE L'EFICÀCIA ANTITUMORAL D'ADENOVIRUS
REPLICATIUS MITJANÇANT L'EXPRESSIÓ DE HIALURONIDASA I
PROTEÏNES FUSOGÈNIQUES DE MEMBRANA**

Memòria presentada per

Sònia Guedán Carrió

Beneficiària de la beca predoctoral per a la formació
de personal investigador (FI). 2005 FI 00384

per optar al grau de

Doctora per la Universitat de Barcelona

Tesi realitzada sota la codirecció de la Dra. Elena Mercadé i Gil, del Departament de
Microbiologia i Parasitologia Sanitàries de la Facultat de Farmàcia i el Dr. Ramon
Alemany Bonastre del Laboratori de Recerca Translacional de l'Institut Català
d'Oncologia

La directora de la tesi

El director de la tesi

L'autora

Elena Mercadé Gil

Ramon Alemany Bonastre

Sònia Guedán Carrió

Barcelona, Abril del 2009

Al meu pare

A la meva mare

Al meu tiet

Després de més de quatre anys en aquest laboratori, coneixent més a fons la gent del meu voltant, compartint moments molt especials, aprenent, creixent...després de tots els viatges en metro imaginant-me el que escriuria en els agraïments de la meua tesi, i plorant, es clar... finalment ha arribat l'hora... l'hora d'agrair-vos a tots el suport que he rebut durant tots aquests anys, i que ha estat imprescindible per la realització d'aquesta tesi.

Primer de tot, voldria donar les gràcies als meus directors de tesi, el Ramon i l'Elena. Em sento molt afortunada d'haver tingut uns directors com vosaltres.

GRÀCIES RAMON! Gràcies per donar-me l'oportunitat de treballar amb tu, d'aprendre sense parar, dia darrera dia...Gràcies pel teu suport, la teua confiança i la llibertat que m'has donat durant tots aquests anys. Gràcies per la teua honestedat, transparència i generositat. Per creure en el que fas i per transmetre-ho a la gent del teu entorn. Gràcies per no perdre l'esperança, per lluitar pel que creus, encara que sigui a contracorrent, per ajudar a tothom i per ser tan especial. Poder aprendre de tu ha estat magnífic. Tens per sempre la meua més profunda admiració com a científic, i sobretot, com a persona.

Gràcies **Elena**, perquè sempre has confiat amb mi, i sempre m'ho has transmès. Per les teves paraules de suport i per ser tan propera. Gràcies per estar sempre disposada a ajudar, a donar idees, a moure mar i cel per aconseguir el que creus que és just i necessari. I sobretot gràcies per cuidar-me tant.

Però la direcció d'aquesta tesi no s'acaba en els meus codirectors de tesi. Dues persones més han estat claus i imprescindibles per la realització d'aquest treball: el Manel i l'Alena.

Gràcies **Manel**, per ajudar-me tant. Per ser tan necessari en aquest grup i per ser el complement perfecte del Ramon. Gràcies per la teua energia, la teua eficàcia i la teua dedicació incondicional al grup. Et vaig trobar molt a faltar quan estava a Rochester, i estic convençuda que et trobaré molt a faltar durant el meu post-doc.

I que dir-te, **Alena**...totes les paraules d'agraïment del món serien insuficients. Gràcies per haver estat sempre al meu costat, des del dia que vaig arribar fins al dipòsit d'aquesta tesi. Per haver-me ensenyat tant. Per haver-me ajudat en tot. Per ser tan bona, per estimar el teus i per estar sempre disposada a fer el que calgui. Gràcies pel teu somriure, la teua vocació i el teu amor pel que fas. Per totes les hores que hem passat juntes (que han estat moltes), i per tot el que hem compartit. La teua amistat és el millor record que me'n duc d'aquesta tesi.

Agraïments

I abans de donar les gràcies a tota la gent del meu grup, i a tots els companys del laboratori, m'agradaria donar les gràcies a una persona que ha ajudat molt a que tot això sigui possible. Que ha confiat en el nostre grup i que ha tirat endavant el Laboratori de Recerca Translacional. Gràcies, **Gabi**, perquè el que has fet per aquest centre és molt gran, i molt important. Gràcies, perquè sempre has estat molt proper. Però sobretot gràcies per estar al meu costat quan realment ho vaig necessitar. Les diverses converses amb tu, i una trucada telefònica, van ser molt preuades, tant per mi, com per la meva família. El meu agraïment és per sempre.

I ara sí, gràcies a la gent del meu grup, els RA/TG! Per tots els moments compartits, a la poiata, a la sala de cultius, a la de virus, a l'estabulari...Pels dinars, els cafès, les reunions, els sopars...Gràcies **Juanjo**, per la teva amistat, per totes les estones compartides, per explicar-me tantes coses, per fer-me riure amb les teves aventures, i per escolar-me quan ho he necessitat. Per haver estat sempre disposat a ajudar-me, per ser un gran científic i per salvar-me la tesi amb l'ICOVIR15! Gràcies **Neus**, pel teu somriure, per les converses que hem tingut, sempre animades i plenes de vitalitat. I gràcies per haver estat la becària gran i modèlica del grup, eficient i rigorosa. M'ha encantat aprendre de tu. Gràcies **Jordi**! Per cuidar-me quan vaig arribar. Per la tranquil·litat que transmetes, per la teva alegria i la teva innocència. Per ser un gran amic, i una millor persona. Ai, **Martona**... tu sí que ets un solet! Gràcies per ser tan dolça i tan bona. Per haver estat sempre disposada a ajudar-me. Per tots els donuts, el cafès i els moments que em compartit, i perquè en compartim molts més. Gracies **Panchita**, por ser como eres, transparente y sincera. Y por todos los consejos recibidos, siempre tan sabios. Gràcies **Cristina**! Per la teva energia i la teva motivació. Per no haver-me matat quan et vaig donar un VAdel que no era VAdel i per quedar-te amb l'ICOVIR14. Per les teves ganes de fer les coses bé, i de fer que aquest grup tiri endavant. Estic segura que seràs un pilar molt important, i et desitjo tota la sort del món. Gracias **Miguel**! Por tu buen humor, tu alegría i tu inocencia. Porque siempre me has hecho reír, y por la paciencia que has tenido en muchas ocasiones. Y perdona, porque el curso intensivo de minis que te dí al llegar quizá fue excesivo! Soy consciente...Gracias **Raúl**, por tu tranquilidad, por todos los viajes en metro, y por reírte conmigo. Gràcies **Edu**, per la teva energia i per no desesperar-te. Estic segura que tot millorarà. Thank you, **Linda**! You came just for 3 months, but it was enough to steal my heart. Thank you for all the moments we shared, for your happiness and for helping me with my English.

A continuació, voldria donar les gràcies a tota la gent de LRT amb qui durant aquests anys he compartit tantes coses. Gràcies a l'**Alvaro**! Una peça clau en el laboratori. Gràcies per tots els cops que m'has fet riure (pels que m'has fet plorar, també. Segur que m'ho mereixia!). Per totes les converses que hem tingut. Per ser sempre tan sincer. Per reivindicar el que és just, per demanar explicacions i per lluitar pel que creus. Gràcies per ser l'amic que tots volem tenir aprop. I gràcies per haver estat aprop. Gràcies a la meva germaneta, la **Laureta**. Per tots els

moments compartits, dins i fora del laboratori. Per ser companya d'excursions i esquiades. I per ser tan maca. A l'**Ari**, per tots els cops que m'has ajudat amb les PCR. Per escoltar-me quan ho he necessitat, i pels consells rebuts. A l'**Ester**, per ser com un home! Per fer-me riure, per tot el que hem compartit i per fer que les llesques guanyessim la lliga! Gràcies a la **Mireia Morell** i a la **Marta Pineda** per les converses als passadisos, a les màquines de café, al bus i al metro. Per ser tan dolçes i per escoltar-me sempre. I gràcies al **Josep Maria**, al **David**, al **Marc**, a la **Gemma**, a la **Laia** i a la **Maria** per totes les vegades que m'heu ajudat, deixant-me reactius diversos, ajudant-me amb les màquines, les RT-PCR, els ordinadors, la bateria d'alcohols...Gràcies també per fer-me riure dins i fora del laboratori. M'ho he passat molt bé amb vosaltres! Gràcies també a la **Conxi** i al **Miquel Àngel**, els meus veïnets, per tots els cops que m'heu ajudat, portant-me en cotxe, deixant-me el parking, el despatx. Ajudant-me a reclamar multes, regalant-me fotos...espero que em pogueu seguir mimant durant molts anys! Gràcies a l'**Alberto**, l'**Oriol**, el **Francesc**, el **Josep** per totes les vegades que m'heu ajudat i per totes les vegades que m'heu fet riure a la màquina del café. I gràcies a tota la resta de gent de LRT1 i del LRT2 que no puc anomenar per motius d'espai però que de ben segur m'heu ajudat en diverses ocasions i heu fet el meu dia a dia al laboratori més amé.

Gràcies també a tots aquells que heu estat claus en alguns dels experiments realitzats en aquesta tesi. Gràcies al **Felip**, aquest patòleg tan especial que es va mirar totes les mostres que li vaig ensenyar amb tota la paciència del món. Gràcies a l'**Agnès**, la reina de les immunohistoquímiques! Per iniciar-me en aquesta tècnica i per tots els consells rebuts durant tots aquests anys. Gràcies a l'**Eduard**, per haver-nos ajudat a revolucionar el món dels clonatges amb els teus llevats màgics!! Gràcies per la teva paciència infinita i per tenir sempre un moment per ajudar-me a resoldre els meus problemes amb els llevats! Gràcies a la **Marga**!! Per què mai un experiment m'havia costat tan poc i m'havia donat tan bons resultats com la teva FISH! Dos dies de feina que van donar lloc a una resposta clara, a la última figura del meu primer article i a la portada de la meva tesi! Deu ni dor, no? Hauré de treballar més sovint amb tu! Però el millor resultat d'aquells dos dies no va ser la foto sinó tenir la oportunitat de coneixe't i compartir cada matí el teu somriure únic i un "estic estupenda" que sempre anima el dia. Gracias **Blanca**!!! Por todos los ratones que me has inyectado!! Por inyectarlos siempre tan bien, tan rápido, y con tanta alegría! Eres un cielo!

Gràcies també a la gent de l'IRO, l'**Anna**, el **Lluís**, la **Cristina Aguilera**, la **Vane**, la **Vero**, l'**Eder**, la **Júlia**, l'**Anna Marazuela**, l'**Antonia**, la **Itziar**, el **Carles**...per tots els cops que m'heu ajudat amb l'electroporador, el microscopi, l'espectrofotòmetre...per respondre'm les preguntes, per deixar-me els reactius, per passar-me les cèl·lules...per la vostra energia i alegria!

Agraïments

Thanks to all the people I met in Rochester for helping me in everything and for the wonderful time I spent there. Thanks to **Richard** for allowing me to work in Mayo, for the excellent scientific advices and for taking care of me. Thanks to **Susanne, Candice,** and **Phomphimon,** for helping me a lot in and out of the lab. For taking me everywhere, since the first day to the last one! For all the moments we shared! I miss you so much! Thanks to **Memy, Tim, Jian, Jill, Hong** and **Feorillo** for helping me in the lab, and for all the things I learned from you. Thanks to **Dragan!** Thanks for helping me to understand the lab, for showing me the nicest places in Rochester and Minneapolis, and for all the wonderful moments we shared, in Rochester and in Barcelona! Thanks to **Wissam** for the Arabic classes, for being so nice and for taking care of me. You know you are my favourite! And thanks to all the international people I met there, **Josef, Angel, Sandra, Michaella, Harald, Gerlies, Aisling, Pedro, Rafaela, Barry** for all the things we did together, for being so nice and so funny! Thanks to **Xavier,** for contacting me before I came to Rochester and for helping me in everything. And Thanks to **Noemi,** the best person I have ever met. Gràcies per cuidar-me tant, tant, tant, tant que cada vegada que hi penso em poso a plorar! Gràcies per portar-me a tot arreu amb tu, per presentar-me els teus amics, per escoltar-me, per cuinar-me escudella i croquetes, per fer-me sentir com a casa, per compartir els embotits que t'enviava la teva mare (tan preuats), per tots els banana chocolate muffin (ideals per ofegar les penes), per l'humidificador, pels pantalons de pana, per tots els cops que em vas treure del laboratori per oferir-me un bon plan i una millor companyia. I gràcies per mai esperar res a canvi. Et trobo a faltar!

Gràcies també al grup de l'Anna Bassols, del Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Facultat de Farmàcia per haver-me ajudat amb els meus primers passos amb l'àcid hialurònic. Gràcies a l'**Anna** per acollir-me al seu laboratori molt amablement, i a la **Laia** i al **Dani** per ajudar-me amb la detecció de l'àcid hialurònic en cèl·lules i teixits, tan els primers cops a veterinària, com més tard des de la distància. Ha estat un plaer treballar amb vosaltres.

Gràcies a tota la gent del **Via Fora,** el Joel, la Núria, el Josep, l'Oriol, l'Ari, el Sergi, la Vicky, l'Alex, la Montse, la Clelia... Per tots els sopars compartits, plens d'humor, intel·ligència, i carinyo! Sou tots uns cracs! Com a científics i com a persones!

Gràcies a tota la gent del **CBATEG,** perquè tots i cadascun de vosaltres m'ha acollit sempre amb un somriure. Per tots els sopars, congressos, tesis, excursions, viatges, cines... que he compartit amb vosaltres. Ha estat sempre divertit, senzill i fantàstic. Tan de bo tot fos tan fàcil com estar entre vosaltres. Gràcies al Miguel per recomenar-me realitzar aquesta tesi amb el Ramon.

I gràcies també a tots els meus **amics i amigues de Manresa** per ser-hi sempre. Per tots els moments que hem compartit i que m'han servit per a desconectar de la tesi. Per la vostra amistat,

tant important per sobreviure en aquest món tan complicat. Gràcies al Jordi, al Quicu, al Sergi i a l'Oriol per ser la meva família adoptiva a Barcelona. Viure amb vosaltres ha estat fàcil, divertit i familiar. Gràcies al Biel, el quart habitant del pis, per fer-me aquesta portada tan xula, que és tan del teu estil. I per tot el que hem compartit. Gràcies al Ricky, al Ferran, a la Neus, a l'Anna, a l'Agnés i a la Laura. I gràcies a la Míriam, perquè sempre que ho he necessitat he tingut la teva abraçada.

I finalment, voldria agrair a la meva **família** tot el suport rebut durant tot aquest temps. Gràcies als meus avis, per intentar entendre el que faig, i per seguir-me cuidant com quan era petita. Gràcies als meus germans per tots els dinars de diumenge que compartim, que gràcies a ells són sempre tan amens. I sobretot gràcies als meus pares, que m'han donat la formació, l'educació, l'energia, l'empenta i l'efecte necessari per arribar fins aquí. Sens dubte, tot això sense vosaltres no hagués estat possible! Gràcies mama, perquè tot i que no has tingut mai molt clar que aquest doctorat fos la millor opció, m'has recolçat sempre. Gràcies per cuidar-me i per animar-me. I gràcies papa, pel recolçament incondicional des del primer moment per fer aquest doctorat i per acabar-lo. Gràcies per preocupar-te i per cuidar-me.

I gràcies, **Xavier!** Tu has tingut el paper més difícil. Has estat al meu costat quan he arribat a casa tard, cansada i de mal humor. Quan les coses no sortien, quan els virus no curaven, quan no podia més. Però també has estat al meu costat en els moments més bonics: quan el Ramón em va dir que podia fer el doctorat amb ell, quan vaig veure el primer sinciti, quan la prova de la hialuronidasa va funcionar, quan els tumors van començar a regressar, quan em van acceptar l'article i quan vaig dipositar aquesta tesi. Gràcies per compartir tot això amb mi. Per estar sempre al meu costat. Gràcies per les teves idees, crítiques i suggerències per fer d'aquesta tesi un treball millor. Junts hem recorregut un camí llarg i difícil. Però també preciós. Ara s'obren milers d'oportunitats noves. Viure-les amb tu serà, sens dubte, magnífic.

TAULA D'ABREVIATURES

%	Tant per cent
$\Delta 24$	<i>Delta 24</i> , delecio de 24 parells de bases
A	Amstrongs
Ad5	Adenovirus serotip 5
ADP	En anglès, <i>Adenovirus Death Protein</i> (proteïna de mort de l'Ad)
AFP	α -fetoproteïna
ALT	Alanina aminotransferasa
AST	Aspartat aminotransferasa
ATCC	En anglès, <i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Trifostat d'adenosina
BAD	En anglès, <i>Bcl2-antagonist of cell death</i>
BSA	En anglès, <i>Bovine Serum Albumin</i>
CAF	Fibroblastes humans associats a carcinoma
CAR	En anglès, <i>Coxsackie and Adenovirus Receptor</i>
CD	Citosina deaminasa
CEA	Antigen carcinoembrionari
CEC	Extracte cel·lular clarificat
cèl	Cèl·lula
CMV	Citomegalovirus
col.	col·laboradors
C-terminal	Carboxi-terminal
dATP	Trifostat de deoxiadenosina
DC	Cèl·lula dendrítica
dCTP	Trifostat de deoxicitidina
ddNTP	Trifostat de dideoxinucleòsid
DEPC	Dietilpirocarbonat
dGTP	Trifostat de deoxiguanosina
DM	Distròfia muscular
DMEM	En anglès, <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Di-metil-sulfòxid
DNA	Àcid desoxiribonucleic
dNTP	Trifostat de deoxinucleòtids
DO	Densitat òptica
dTTP	Trifostat de deoxitimidina
dUTP	Trifostat de deoxiuridina
ECM	Matriu extracel·lular
EDTA	Àcid etilendiaminotetraacètic
EGTA	Àcid etilenglicotetraacètic
ELISA	En anglès, <i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
EMCV	Virus de l'encèfalomiocarditis
ERBB	Receptor dels factors de creixement de la família de l'EGF.
FBS	Sèrum Fetal Boví
FELASA	En anglès, Federation of European Laboratory Animal Science Associations
FISH	Hibridació Fluorescent <i>In Situ</i>
FITC	En anglès, <i>Fluorescein Isothiocyanate</i>
FMG	En anglès, Fusogenic Membrane Glycoprotein (glicoproteïna de membrana fusogènica)

g	grams
GAG	Glicosaminoglicans
GALV	En anglès, <i>Gibbon Ape Leukaemia Virus</i>
GM-CSF	Factor estimulator de la formació de colònies de macròfags i granulòcits
gp96	Glicoproteïna 96
h	hores
HA	Àcid hialurònic
HABP	Proteïna d'unió a àcid hialurònic
HAS1, HAS2, HAS3	Hialuronan sintases 1, 2 i 3
HBS	En anglès, <i>Hepes Buffered Saline</i>
HIV-1	Virus de la immunodeficiència humana
HRA,HRB	Repeticions heptamèriques A i B
hsp-70	Proteïna de xoc tèrmic 70
HSVtk/GCV	Sistema de la timidina quinasa del virus herpes simplex/ ganciclovir
Hyal	Hialuronidasa
IC₅₀	Concentració inhibidora 50
IRES	En anglès, <i>internal ribosome entry site</i>
ITR	Repetició terminal invertida
iv	Intravenós
Kb	Kilobase
KDa	Kilodalton
LD₅₀	Dosi Letal 50
MAP	Proteïna quinasa activada per mitogens
MHC	Complex d'histocompatibilitat principal
ml	Mililitre
MLP	Promotor principal tardà de l'adenovirus
mm	Mil·límetre
mM	Mil·limolar
mm³	Mil·límetre cúbic
MMP	Metaloproteïnases
mRNA	RNA missatger
mTOR	En anglès, <i>mammalian target of rapamycin</i>
MTT	Bromur de 3-(4,5-dimetietiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium
NFκB	Factor nuclear <i>kappa</i> B
nm	Nanòmetre
nM	Nanomolar
N-terminal	Amino-terminal
°C	Grau centígrad
ORF	Pauta oberta de lectura
p.i.	Post-infecció o post-injecció
P/S	Penicil·lina/estreptocitosina
PARP	De l'anglès: poly ADP(adenosine diphosphate)-Ribose Polymerase
pb	Parell de bases
PBS	Tampó salí fosfatat
PCR	Reacció en cadena de la polimerasa
PEG	Polietilenglicol
PI3K	Fosfatidil inositol 3 quinasa
poliA	Poliadenilació

PP2A	Proteïna fosfatasa 2
PSA	Antígen específic de prostata
RGD	Arginina-Glicina-Àcid Aspàrtic
RHAMM	Receptor de la motilitat mediada per àcid hialurònic
RNA	Àcid ribonucleic
rpm	Revolucions per minut
SA	En l'anglès, splicing acceptor (acceptor de tall i lligació)
SDS	Dodecilsulfat sòdic
SPAM-1	Molècula d'adhesió de l'esperma 1
SSC	Citrat salí estàndard
SU	Unitat de superfície
SV5	Virus Simi 5
TAE	Tris-acetat-EDTA
TCF	Factor citotòxic tumoral
TCF/LEF	En l'anglès, T-cell factor/lymphoid enhancer factor
TE	Tris-EDTA
TK	Timidina quinasa
TM	Transmembrana
TNF-α	Factor de necrosi tumoral α
TP	Proteïna terminal
TU	En anglès, transducing unit (unitat de transducció)
TUNEL	En anglès, <i>Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling</i>
U	Unitats
vp	Partícules virals
VSG-G	Proteïna G del virus de l'estomatitis vesicular
WOX-1	Oxidoreductasa que conté el domini WW
μg	Microgram
μl	Microlitre
μm	Micròmetre

Aminoàcids

F Phe, fenilalanina	S Ser, serina	Y Tyr, tirosina	K Lys, lisina	W Trp triptòfan
L Leu, leucina	P Pro, prolina	H his, histidina	D Asp, aspàrtic	R Arg, arginina
I Ile, isoleucina	T Thr, treonina	Q Gln, glutamina	E Glu, glutàmic	G Gly, glicina
M Met, metionina	A Ala, Alanina	N Asn, asparragina	C Cys, cisteïna	V Val, valina

ÍNDEX	1
INTRODUCCIÓ	9
1. La viroteràpia del càncer	9
2. Els adenovirus oncolítics	13
2.1. Estructura dels adenovirus.....	13
2.2. Biologia dels adenovirus.....	13
2.2.1 La regió E4.....	15
2.3. Disseny d'adenovirus selectius de tumor.....	20
2.3.1. Delecions dels gens virals com estratègia per conferir selectivitat tumoral.....	20
2.3.2. Control de la replicació viral mitjançant l'ús de promotors específics de tumor.....	20
2.3.3. Direccionament de la infectivitat viral: Targeting transduccional.....	24
2.3.4. L'ICOVIR5.....	25
2.4. L'experiència clínica amb adenovirus oncolítics: limitacions i possibles obstacles a superar....	26
2.5. Estratègies per augmentar la potència oncolítica: adenovirus oncolítics armats.....	28
2.5.1. Transgens terapèutics utilitzats per armar adenovirus replicatius.....	29
2.5.2. Control de l'expressió del transgèn terapèutic.	29
3. Les glicoproteïnes fusogèniques de membrana (FMG)	31
3.1. El mecanisme de fusió de membranes.	31
3.2. L'ús de FMG en la teràpia gènica del càncer.....	33
3.3. L'ús de FMG per la immunoteràpia pel càncer.....	33
3.3.1. Mecanismes de mort dels sincitis.....	34
3.3.2. L'ús de FMG en la preparació de vacunes pel càncer.....	35
3.4. Combinació de virus oncolítics i FMG pel tractament del càncer.	36
3.5. La glicoproteïna F del paramyxovirus SV5.....	36
3.6. La glicoproteïna de l'envolta del virus de la leucèmia de gibó (GALV)	38
4. La matriu extracel·lular.	39
4.1. El transport intersticial en els tumors sòlids.	39
4.2. L'àcid hialurònic.	40
4.2.1. Àcid hialurònic, hialuronidases i càncer.....	42
4.3. Les hialuronidases.	43
4.3.1. La hialuronidasa dels testicles dels mamífers: la PH20.....	44
OBJECTIUS	49
MATERIALS I MÈTODES	53
1. Tècniques relacionades amb la manipulació de bacteris	53
1.1. Preparació de bacteris competents.....	53
1.2. Transformació de bacteris competents.....	54
1.2.1. Transformació per xoc tèrmic.....	54
1.2.2. Transformació per electroporació.....	54
1.3. Aïllament de DNA plasmídic de bacteris.....	54
1.3.1. Preparacions de DNA plasmídic a petita escala.....	55
1.3.2. Preparacions de DNA plasmídic a gran escala.	55

2. Tècniques relacionades amb la manipulació de llevats	56
2.1. Preparació de llevats competents.....	56
2.2. Transformació de llevats pel mètode LiAc/SS-carrier DNA/PEG.....	57
2.3. Aïllament de DNA plasmídic de llevats.....	58
3. Tècniques relacionades amb la manipulació d'RNA	59
3.1. Extracció d'RNA total.....	59
3.2. Qualitat de l'RNA.....	59
3.2.1. Valoració espectrofotomètrica de l'RNA.....	59
3.2.2. Electroforesi en gel d'agarosa.....	60
3.3. Anàlisi de l'RNA.....	60
3.3.1. Retrotranscripció a cDNA.....	61
3.3.2. Northern Blot.....	61
4. Adenovirus recombinants	63
4.1. Construcció dels adenovirus recombinants.....	63
4.1.1. Construcció dels adenovirus AdwtRGD-F, AdwtRGD-GALV i AdwtRGD-PH20.....	63
4.1.2. Construcció dels adenovirus Adwtorf12 i Adwtorf123.....	69
4.1.3. Construcció dels adenovirus ICOVIR8dE4 i ICOVIR9dE4.....	70
4.1.4. Construcció dels adenovirus ICOVIR16 i ICOVIR17.....	71
4.2. Generació dels adenovirus recombinants per transfecció. Mètode del fosfat càlcic.....	71
4.3. Selecció de clons d'adenovirus recombinants per l'assaig de formació de calbes.....	72
4.4. Amplificació i purificació dels adenovirus.....	74
4.4.1. Amplificació dels adenovirus.....	74
4.4.2. Purificació dels adenovirus.....	74
4.5. Tècniques emprades per titular els adenovirus.....	75
4.5.1. Determinació de les partícules víriques per espectrofotometria (vp/ml).....	77
4.5.2. Determinació de les partícules víriques per PCR a temps real (vp/ml).....	77
4.5.3. Determinació de les partícules virals funcionals (TU/ml) per tinció d'hexó.....	79
4.6. Tècniques emprades per la caracterització dels adenovirus.....	79
4.6.1. Mètodes per a l'obtenció del DNA de l'adenovirus.....	79
4.6.2. Digestió amb enzims de restricció i seqüenciació del DNA de l'adenovirus.....	81
4.6.3. Electroforesi de les proteïnes majoritàries de la càpside de l'adenovirus.....	82
5. Assajos <i>in vitro</i> amb els adenovirus recombinants	83
5.1. Característiques de les línies cel·lulars.....	83
5.1.1. Cèl·lules HEK293.....	83
5.1.2. Línies tumorals humanes.....	83
5.2. Condicions de cultiu de les línies cel·lulars.....	84
5.3. Recompte cel·lular.....	84
5.4. Congelació i descongelació de les línies cel·lulars.....	84
5.5. Control de micoplasma en les línies cel·lulars en cultiu.....	84
5.6. Anàlisi de l'expressió d'àcid hialurònic de les línies cel·lulars en cultiu.....	85
5.6.1. Obtenció de les mostres.....	86

5.6.2. Quantificació de l'àcid hialurònic (HA)	86
5.7. Assajos de producció viral dels adenovirus recombinants.....	87
5.8. Assaig de competició.....	88
5.9. Anàlisi de la citotoxicitat.....	89
5.9.1. Anàlisi de la proteïna total.....	89
5.9.2. Recompte cel·lular.....	90
5.9.3. Anàlisi de l'activitat metabòlica mitocondrial.....	91
5.10. Detecció de l'expressió de la proteïna F per immunofluorescència	91
5.11. Avaluació de l'efecte de la temperatura, la tripsina i la proteïna HN sobre la proteïna F....	92
5.12. Hibridació <i>in situ</i> per fluorescència.....	92
5.12.1. Preparació de les mostres.....	92
5.12.2. Preparació de les sondes.....	93
5.12.3. Hibridació fluorescent <i>in situ</i>	93
5.13. Anàlisi de l'activitat hialuronidasa.....	94
5.13.1. Obtenció de mostres.....	94
5.13.2. Microanàlisi dels oligosacàrids d'àcid hialurònic per electroforesi en gel d'acrilamida.....	94
6. Tècniques emprades en els assajos <i>in vivo</i> en ratolins amb adenovirus recombinants.....	95
6.1. Soques de ratolins emprades i condicions d'estabulació.	95
6.2. Implantació subcutània de cèl·lules tumorals.....	95
6.3. Administració dels adenovirus	96
6.3.1. Injecció intratumoral d'adenovirus.....	96
6.3.2. Administració sistèmica d'adenovirus.....	96
6.4. Obtenció de mostres.....	96
6.4.1. Obtenció de sèrum i anàlisi de transaminases.....	96
6.4.2. Obtenció de tumors.....	97
7. Tècniques histològiques.....	98
7.1. Obtenció de talls histològics.....	98
7.1.1 Talls histològics parafinats.....	98
7.1.2. Talls histològics congelats.....	98
7.2. Immunohistoquímiques en talls parafinats.....	98
7.3. Immunohistoquímiques en talls congelats.....	100
RESULTATS.....	105
1. Expressió de FMG com estratègia per augmentar la potència d'adenovirus replicatius.....	105
1.1. Generació d'un adenovirus replicatiu armat amb la proteïna F del Paramixovirus SV5.....	105
1.1.1. Construcció i caracterització de l'adenovirus recombinant AdwtRGD-F.....	105
1.1.2. Caracterització fenotípica de l'AdwtRGD-F.....	107
1.1.3. Capacitat oncolítica de l' AdwtRGD-F respecte AdwtRGD <i>in vitro</i>	108

1.1.4. Efecte de la proteïna HN, la temperatura i les proteases sobre l'efecte fusogènic i citotòxic de la proteïna F.....	109
1.1.5. Eficàcia antitumoral de l'adenovirus AdwtRGD-F <i>in vivo</i>	110
1.2. Generació d'un adenovirus replicatiu armat amb la proteïna de l'envolta del virus de la leucèmia de gibó.....	111
1.2.1. Generació i caracterització de l'adenovirus AdwtRGD-GALV.....	111
1.2.2. Anàlisi de la producció i alliberament de l'AdwtRGD-GALV.....	112
1.2.3. Anàlisi de la replicació viral a l'interior d'un sinciti.....	115
1.2.4. Efecte citotòxic de l'AdwtRGD-GALV respecte l'AdwtRGD.....	116
2. Expressió de FMG com estratègia per augmentar l'eficàcia terapèutica d'adenovirus de replicació condicionada.....	118
2.1. Efecte de la inserció del gen GALV, i la delecció dels ORF1,2,3 de la regió E4 sobre l'eficàcia antitumoral de l'ICOVIR5.....	118
2.1.1 Generació de l'adenovirus Adwtorf123 i estudi de l'efecte de la delecció dels ORF1,2,3 de la regió E4 sobre la replicació viral.....	119
2.1.2. Capacitat citotòxica de l'Adwtorf123 respecte l'Adwt.....	121
2.1.3. Generació i caracterització de l'adenovirus ICOVIR9dE4.....	122
2.1.4. Anàlisi de la citotoxicitat de l'ICOVIR9dE4 respecte l'ICOVIR5.....	124
2.1.5. Anàlisi de l'eficàcia antitumoral <i>in vivo</i> de l'ICOVIR9dE4 respecte l'ICOVIR5.....	125
2.2. Efecte de la inserció del gen GALV sobre l'eficàcia antitumoral de l'ICOVIR15.....	126
2.2.1. Generació i caracterització de l'adenovirus ICOVIR16.....	126
2.2.2. Anàlisi de la citotoxicitat de l'adenovirus ICOVIR16 respecte l'ICOVIR15.....	128
2.2.3 Anàlisi de l'eficàcia antitumoral <i>in vivo</i> de l'ICOVIR16 respecte l'ICOVIR15 després de l'administració intratumoral.....	129
2.2.4. Anàlisi de l'eficàcia antitumoral de l'administració sistèmica de l'adenovirus ICOVIR16 respecte l'ICOVIR15.....	131
3. Expressió de hialuronidases com estratègia per millorar la distribució intratumoral d'adenovirus replicatius.....	133
3.1. Efecte de la degradació de l'àcid hialurònic sobre l'eficàcia antitumoral de l'adenovirus ICOVIR5.....	133
3.1.1 Anàlisi de l'expressió d'àcid hialurònic en línies tumorals de diferents orígens.....	133
3.1.2. Efecte de la coadministració de hialuronidasa soluble en l'eficàcia antitumoral de l'adenovirus ICOVIR5.....	135
4. Expressió de la hialuronidasa PH20 com estratègia per millorar la distribució d'adenovirus replicatius en la massa tumoral.....	137
4.1. Generació d'un adenovirus replicatiu armat amb la hialuronidasa humana PH20.....	137
4.1.1. Generació i caracterització de l'adenovirus AdwtRGD-PH20.....	137
4.1.2. Efecte citotòxic de l'adenovirus AdwtRGD-PH20 respecte l'adenovirus AdwtRGD.....	139
4.1.3. Anàlisi de l'eficàcia antitumoral <i>in vivo</i> de l'adenovirus AdwtRGD-PH20 respecte l'adenovirus AdwtRGD.....	140

5. Expressió de la hialuronidasa PH20 com estratègia per millorar l'eficàcia terapèutica d'adenovirus de replicació condicionada	142
5.1. Efecte de la inserció del cDNA de la hialuronidasa PH20, i la deleció dels ORF1,2 d'E4 sobre l'eficàcia antitumoral de l'adenovirus ICOVIR5.....	142
5.1.1. Generació de l'adenovirus Adwtorf12 i estudi de l'efecte de la delecció dels ORF1,2 d'E4 sobre la replicació viral.....	143
5.1.2. Capacitat citotòxica de l'adenovirus Adwtorf12 respecte l'adenovirus Adwt.....	144
5.1.3. Generació i caracterització de l'adenovirus ICOVIR8dE4.....	144
5.1.4. Capacitat citotòxica de l'adenovirus ICOVIR8dE4 respecte l'adenovirus ICOVIR5.....	146
5.1.5. Anàlisi de l'eficàcia antitumoral de l'administració sistèmica l'adenovirus ICOVIR8dE4 respecte l'adenovirus ICOVIR5.....	147
5.2. Efecte de la inserció del cDNA de la hialuronidasa PH20 sobre l'eficàcia antitumoral de l'adenovirus ICOVIR5.....	148
5.2.1. Generació i caracterització de l'adenovirus ICOVIR17.....	148
5.2.2. Capacitat citotòxica de l'adenovirus ICOVIR17 respecte l'adenovirus ICOVIR15...	150
5.2.3. Anàlisi de l'eficàcia antitumoral de l'administració intratumoral de l'adenovirus ICOVIR17 respecte l'adenovirus ICOVIR15.....	150
5.2.4. Anàlisi de l'eficàcia antitumoral de l'administració sistèmica d'ICOVIR17 respecte l'ICOVIR15.....	152
5.2.5. Efecte de l'expressió de la hialuronidasa PH20 en l'angiogènesi tumoral.....	154
DISCUSSIÓ	157
1. Estratègies per armar adenovirus oncolítics	157
2. L'expressió de FMG per incrementar la potència d'adenovirus oncolítics	164
3. L'expressió de hialuronidasa per millorar l'eficàcia terapèutica d'adenovirus oncolítics	170
4. GALV o PH20?	176
CONCLUSIONS	183
BIBLIOGRAFIA	187
ANNEX	205

Introducció

El càncer és una de les principals causes de mort a nivell mundial. S'estima que a nivell mundial, una de cada vuit morts són degudes al càncer, causant més morts que el virus de la SIDA, la tuberculosi i la malària combinades. Durant els últims anys s'han fet grans progressos en la supervivència global dels pacients de càncer, gràcies a l'aparició de noves tècniques d'imatge i diagnòstic, la millora en el coneixement dels processos moleculars que causen el càncer, i el coneixement addicional dels tractaments combinats de quimio i radioteràpia. Tot i així, els tractaments actuals no han incrementat la supervivència dels pacients diagnosticats amb metàstasis o amb certs tumors neoplàsics malignes de cervell, pàncrees o fetge. Això es deu, generalment, a què les cèl·lules tumorals desenvolupen mecanismes genètics que generen resistència a l'apoptosi causada pel dany al DNA generat per la quimioteràpia i la radiació. Aquests clons de cèl·lules genèticament resistents s'expandeixen generant una resistència general al tractament. En els darrers anys, s'han fet grans esforços dirigits a trobar vies alternatives complementàries a la inducció de l'apoptosi, que superin la resistència a múltiples drogues, i millorin la mitjana de curació (Chu *et al.*, 2004). Les noves teràpies dirigides haurien de tenir, idealment, un baix perfil de toxicitat, un mecanisme d'acció únic (efectiu en les cèl·lules tumorals resistents a l'apoptosi) i sinergisme amb els tractaments actuals estàndards. Els virus oncolítics, que s'utilitzen com a teràpies dirigides (viroteràpia), compleixen aquest perfil (Liu *et al.*, 2007).

1. LA VIROTERÀPIA DEL CÀNCER

El concepte de "viroteràpia" es coneix com el tractament del càncer amb virus oncolítics. Els virus oncolítics són virus amb capacitat de replicar-se en les cèl·lules tumorals sense afectar a les cèl·lules normals. Mentre que en la teràpia gènica els virus són eines (o vectors) per a la transferència de gens terapèutics, la viroteràpia es basa en la replicació del virus com a mecanisme terapèutic. Els nous virus produïts a l'interior de la cèl·lula tumoral són alliberats al medi extracel·lular per infectar noves cèl·lules, ja siguin adjacents a la cèl·lula infectada, o distants. Aquest cicle es pot repetir diverses vegades, resultant en l'amplificació de la droga, i la conseqüent eliminació de la massa tumoral (Fig.1). La mort de la cèl·lula tumoral es pot donar mitjançant mecanismes independents de l'apoptosi, i per tant diferents als de les teràpies anticancerígenes convencionals.

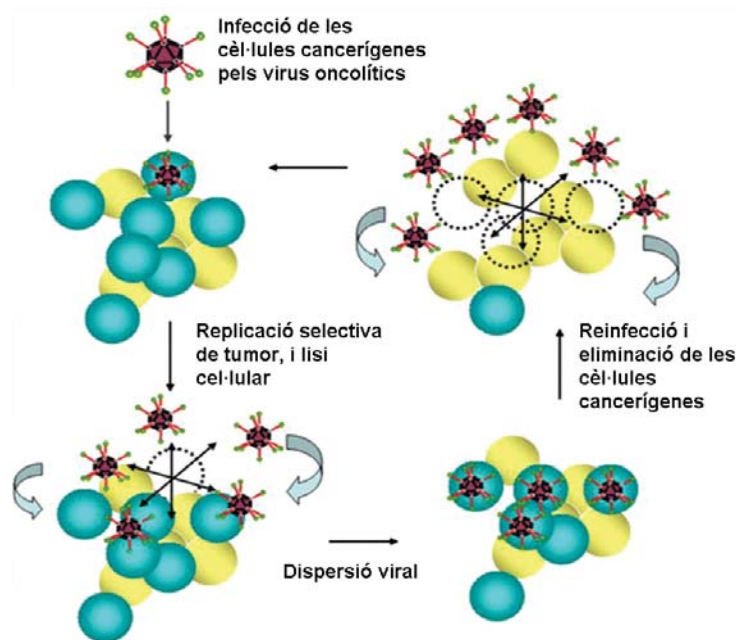


Figura 1. Propagació intratumoral dels virus oncolítics. Els virus oncolítics es repliquen selectivament a la cèl·lula tumoral. La replicació del virus dóna lloc a la mort de la cèl·lula infectada i a l'alliberament de la progènie viral al medi extracel·lular. Els nous virions tornaran a infectar més cèl·lules tumorals, amplificant la dosi inicial de droga i eliminant la massa tumoral.

El concepte de viroteràpia es remunta a principis de segle XX quan es van observar regressions ocasionals de tumors en malalts que patien infeccions virals, o que havien rebut alguna vacuna. Pràcticament totes les regressions tumorals es van donar exclusivament en pacients amb leucèmies i limfomes, generalment pacients joves amb sistemes immunitaris compromesos. El 1904, un pacient amb leucèmia mieloide crònica va tenir una disminució dramàtica de leucòcits durant una infecció gripal. Entre els anys 50 i els anys 80, es van reportar diferents exemples de regressions tumorals degudes a infeccions virals: una infecció per varicel·la va induir la regressió d'una leucèmia limfoblàstica aguda (Bierman *et al.*, 1953), el virus del xarampió va induir regressions de leucèmies (Pasquinucci 1971), limfomes de Burkitt (Bluming and Ziegler 1971) i limfomes de Hodgkin (Taqi *et al.*, 1981), i el virus de la malaltia de Newcastle va induir la regressió d'un càncer gàstric a un granger de gallines després d'una exposició ocupacional al virus (Csatary 1971).

Altres respostes van ser reportades després de la vacunació de pacients amb càncer. Al 1912, una dona amb carcinoma cervical va respondre a vacunacions repetides pel virus de la ràbia. Durant els anys 70 un pacient amb leucèmia limfocítica crònica va tenir una resposta completa després de la disseminació sistèmica del virus de la verola a partir del focus d'injecció cutani de la vacuna (Hansen and Libnoch 1978). Durant la dècada dels 80, es van veure respostes en dos pacients amb limfoma de Hodgkin després de l'administració de la vacuna del

Nom	Tipus de tumor	Modificacions genètiques	transgèn	Estudi Clínic	Referència
Adenovirus dl1520	Cap i coll, ovari, colon, pancreàtic, hepàtic...	E1B-55K (-) E3B (-)	-	Fase I-III	(Ganly <i>et al.</i> , 2000) (Khuri <i>et al.</i> , 2000) (Nemunaitis <i>et al.</i> , 2000) (Nemunaitis <i>et al.</i> , 2007b) (Nemunaitis <i>et al.</i> , 2007a)
Adenovirus H101	Sòlids	E1B-55K (-) E3 (-)	-	Fase I-III	(Lu <i>et al.</i> , 2004) (Xia <i>et al.</i> , 2004) (Garber 2006)
Adenovirus CG706	Pròstata	PSE1A E3B (-)	-	Fase I	(DeWeese <i>et al.</i> , 2001)
Adenovirus CG7870	Pròstata	PSE1A PSE1B	-	Fase I	(Small <i>et al.</i> , 2006)
Adenovirus AdΔ24RGD	Glioma	E1A-Δ24 Fibra RGD	-	Fase I	Estudi clínic en procés
Herpes Virus HSV1716	Glioma Melanoma Cap i coll	IPC34.5 (-)	-	Fase I	(Rampling <i>et al.</i> , 2000) (Mackie <i>et al.</i> , 2001) (Mace <i>et al.</i> , 2008)
Herpes Virus G207	Glioma	IPC34.5 (-) IPC6 (-)	-	Fase I-II	(Markert <i>et al.</i> , 2000)
Herpes Virus NV1020	metàstasis colorectals a fetge	IPC34.5 (-), UL24 (-), UL56 (-), reemplaçats per un fragment del HSV2.	-	Fase I	(Kemeny <i>et al.</i> , 2006)
Virus vacunal JX-509	Carcinoma hepàtic	Timidina quinasa (-)	GM-CSF	Fase I	(Park <i>et al.</i> , 2008)
Adenovirus Ad5-CD/TKrep	Pròstata	E1B-55K (-) E3B (-)	CD/TK	Fase I	(Freytag <i>et al.</i> , 2002) (Freytag <i>et al.</i> , 2003)
Herpes Virus OncoVEX ^{GM-CSF}	Gàstric, cervell, cap i coll, melanoma	IPC34.5 (-) IPC47 (-) Sobreexpressió Us11	GM-CSF	Fase I	(Hu <i>et al.</i> , 2006)
Xarapió MV-CEA	Ovari	Soca Vacunal	CEA	Fase I	(Msaouel <i>et al.</i> , 2009)

Taula 1. Virus oncolítics genèticament modificats analitzats en estudis clínics. CD/TK, fusió dels gens de la citosina deaminasa i la timidina quinasa de l'herpes virus. CEA, antigen carcinoembrionari; GM-CSF, factor estimulator de colònies de macròfags granulocítics; PSE1A, control d'E1A per un promotor específic de pròstata; PSE1B, control d'E1B per un promotor específic de pròstata.

xarampió (Greentree 1983; Schattner 1984). En general, però, pràcticament totes les remissions tumorals induïdes per virus es van donar durant un període de temps curt, i van ser incompletes.

Tots aquests casos de remissions tumorals induïdes per virus, juntament amb els progressos fets en la caracterització i amplificació dels virus, van portar, entre els anys 1950 i 1980, al tractament de centenars de pacients amb càncers terminals amb una gran varietat de virus (adenovirus, virus de les galteres, virus del la verola i el virus de l'Oest del Nil, entre d'altres) (Arakawa *et al.*, 1987; Asada 1974; Huebner *et al.*, 1956; Hunter-Craig *et al.*, 1970; Kawa and Arakawa 1987; Milton and Brown 1966; Roenigk *et al.*, 1974; Shimizu *et al.*, 1988; Southam and Moore 1951). A partir d'aquests assajos, es van publicar diverses dades sobre seguretat i eficàcia. Els resultats van ser variables i, tot i que es van produir remissions en alguns tumors, les investigacions en aquesta direcció es van acabar abandonant a causa de la variabilitat dels resultats i el baix quocient eficàcia/toxicitat.

A partir dels anys 90, es van descobrir els mecanismes que aporten selectivitat inherent als virus d'RNA de replicació selectiva en tumors, com el virus de la malaltia de Newcastle, el virus de l'estomatitis vesicular, el virus de la verola i el reovirus. També durant la dècada dels 90, els avenços en biologia molecular i la millora en el coneixement de les funcions dels gens virals han permès la modificació genètica d'altres virus, com els adenovirus i els herpesvirus, per fer-los selectius de cèl·lules tumorals. A partir d'aquests avenços, el camp de la viroteràpia ha reascut i s'ha expandit significativament. Actualment, diferents virus han estat modificats genèticament per millorar la seva selectivitat i la seva potència antitumoral. Com a mínim, 15 constructes virals diferents (12 d'ells genèticament modificats) han estat administrats en assajos clínics, i com a mínim dos d'ells han entrat en assajos clínics randomitzats de fase III (Taula 1).

2. ELS ADENOVIRUS ONCOLÍTICS

Alhora d'utilitzar una espècie viral com a agent terapèutic pel tractament del càncer, cal tenir en compte una sèrie de consideracions sobre eficàcia, seguretat i manipulació. Primer de tot, cal que el virus infecti, es repliqui i destrueixi les cèl·lules tumorals, incloent idealment les cèl·lules tumorals que no s'estan replicant. És preferible que el virus parenteral causi una malaltia poc severa en humans i que estigui ben caracteritzada. En cas contrari, es podrien considerar mutants amb delecions que evitin la seva virulència. Els virus no integratius presenten avantatges considerables en quant a seguretat, evitant els problemes impredecibles causats per la integració del genoma viral. Cal també que el virus sigui genèticament estable, tant per qüestions de seguretat com de producció. En cas que el virus no presenti un mecanisme natural de selectivitat tumoral, serà necessari que el genoma es pugui manipular genèticament per evitar la replicació viral en els teixits normals. Finalment, el virus s'ha de poder obtenir a títols suficientment elevats pel seu ús en assajos clínics.

Els adenovirus compleixen gran part d'aquests requisits, i són per això especialment atractius com a virus oncolítics. Els adenovirus són patògens comuns. La seva replicació porta a la destrucció de la cèl·lula hoste i a una ampliació de la càrrega viral de l'ordre de 10000 partícules víriques en un sol cicle de replicació, afavorint així la disseminació de la infecció viral. El genoma viral no s'integra en el genoma de la cèl·lula hoste, evitant el risc de recombinació i possibles mutacions. A més, el gran coneixement de la biologia de l'adenovirus fa possible la manipulació del seu genoma per aconseguir, per una banda, la selectivitat tumoral i, per l'altra, l'increment de la potència. Finalment, els adenovirus poden amplificar-se fins a títols virals elevats (10^{10} partícules formadores de colònies/ml), que poden addicionalment concentrar-se fins a 100 vegades.

2.1. ESTRUCTURA DELS ADENOVIRUS

Els adenovirus humans es classifiquen dins de la família *Adenoviridae*. Actualment es coneixen fins a 51 serotips diferents, sent l'adenovirus 2 i el 5 els més usats com a adenovirus oncolítics. Aquests virus infecten el teixit epitelial del tracte respiratori, produint infeccions que cursen amb afeccions respiratòries lleus. Els símptomes més comuns inclouen congestió nasal, tos i conjuntivitis.

Cada virió està compost per una càpsida icosaèdrica, sense envolta lipídica, que embolcalla el nucli de DNA genòmic (Fig. 2A). La càpsida està formada per 8 proteïnes estructurals, entre elles, la proteïna hexó, que forma les 20 cares de l'icosaèdre, la proteïna de la

base del pentó, que forma els 12 vèrtex de l'icosaèdre, des de cadascun dels quals es projecta a mode d'antena la proteïna de la fibra. La fibra està constituïda per tres dominis: la cua de l'extrem N-terminal (*tail*), una regió central anomenada *shaft* (o cos de la fibra), i el domini *knob*, que correspon a l'extrem C-terminal, responsable de la interacció del virus amb el receptor CAR (receptor coxsackie-adenovirus) (Zhang and Bergelson 2005). El nucli del virió està compost per un DNA lineal de doble cadena que es troba associat a 4 proteïnes diferents: la proteïna TP (terminal protein), que es troba unida covalentment als extrems 5' terminals, i les proteïnes V, VII i el pèptid mu, que estan directament unides al DNA (Russell 2000; Volpers and Kochanek 2004). El genoma, de 36kb, presenta els cassets gènics (unitats transcripcionals) solapats en ambdues cadenes del DNA, i gràcies a l'empalmament (*splicing*) alternatiu, s'arriben a transcriure fins a 50 proteïnes diferents (Verma and Weitzman 2005).

2.2. BIOLOGIA DELS ADENOVIRUS.

Els adenovirus són virus amb un cicle lític. L'entrada del virus a la cèl·lula hoste té lloc mitjançant el reconeixement i la interacció del domini *knob* de la fibra amb el receptor cel·lular d'alta afinitat CAR. Aquest reconeixement permet l'acostament del virus a la cèl·lula i la interacció entre el domini RGD (Arg-Gly-Asp) de la proteïna de la base del pentó i les integrines. Aquesta unió pentó-integrina permet la internalització del virus mitjançant la formació de vesícules de clatrina. Durant el transport cap al nucli, es produeix la disgregació de la càpside viral, permetent la translocació del nucli viral al nucli. Una vegada dins del nucli, el virus aprofita la maquinària transcripcional cel·lular per iniciar la transcripció dels gens virals.

La transcripció adenoviral es dona en dues fases: la primerenca (*early*) i la tardana (*late*)(Fig. 2B). Durant la fase primerenca, la cèl·lula hoste es converteix en una productora eficient del genoma viral. Degut a que la majoria de les cèl·lules hostes es troben en un estat quiescent en el moment de la infecció, les proteïnes virals han d'interaccionar amb les proteïnes de la cèl·lula hoste per tal d'activar la replicació i la divisió cel·lular. El primer gen que es transcriu a nivell del genoma viral és *E1a*, i el seu producte s'uneix a diferents proteïnes cel·lulars com pRB, p107, i p130. Aquesta interacció impedeix que aquestes proteïnes cel·lulars s'uneixin al factor de transcripció E2F i el bloquegin. D'aquesta manera s'activa el cicle cel·lular, i comença la replicació del DNA viral. La desregulació del cicle cel·lular provocada per E1A indueix l'acumulació del gen supressor tumoral *p53*. L'activació de la via de *p53* pot resultar en la inducció de l'apoptosi, prevenint així la supervivència de la cèl·lula danyada. L'expressió del producte del gen adenoviral *E1b* impedeix la mort prematura de la cèl·lula hoste. La proteïna E1B-55kD s'uneix a *p53* i indueix la seva degradació, mentre la proteïna E1B-19kD presenta funcions similars a les del factor antiapoptòtic Bcl2. A través d'aquests mecanismes

antiapoptòtics el virus manté la cèl·lula viva el màxim de temps possible per tal de maximitzar la producció viral. La regió E2 codifica les proteïnes necessàries per a la replicació del genoma viral. Els productes sintetitzats a partir de la transcripció de la regió E3 inhibeixen la resposta immunitària antiviral, permetent la permanència de la cèl·lula hoste infectada. Finalment, la unitat transcripcional E4 codifica per proteïnes involucrades en el transport de l'RNA viral i el control del cycle cel·lular. L'expressió dels gens primerencs condueix a la replicació del DNA viral. Un cop el DNA s'ha replicat, s'activa el promotor principal tardà (MLP), que conduirà a l'expressió d'un transcrit d'RNA missatger que per tall i lligació diferencial genera tots els RNA que codifiquen per les proteïnes estructurals que formen la càpsida. Finalment, es dona l'encapsidació del core i la formació dels nous virions, que surten de la cèl·lula hoste mitjançant la lisi de la cèl·lula i la conseqüent mort cel·lular.

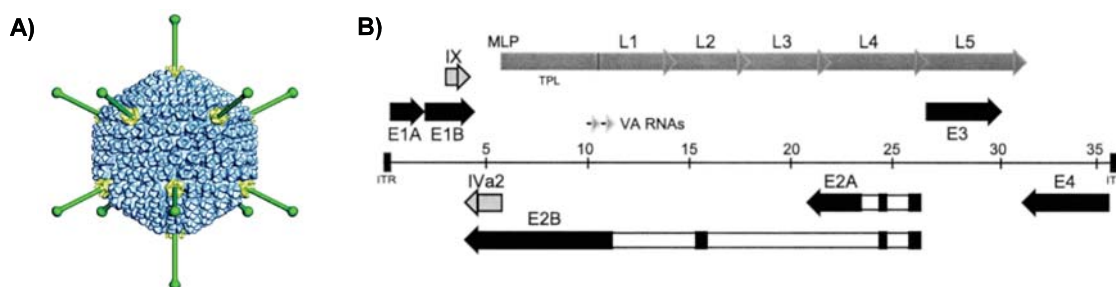


Figura 2. Estructura i organització genòmica de l'adenovirus 5. (A) Estructura del viriò a una resolució d'1.7 Å. Cadascuna de les 20 cares de la càpsida està formada per 12 molècules del trimer hexó (blau). En cadascun dels vèrtexs la proteïna de la fibra (verd) sobresurt de la proteïna de la base del pentó (groc) (Su *et al.*, 2006). (B) Organització genòmica de l'adenovirus 5. El DNA de doble cadena es representa com una línia prima al centre de la figura, amb les dues repeticions terminals invertides (ITR) als extrems. La llargada del DNA està marcada en kilobases. Les unitats transcripcionals es mostren en la seva orientació i posició en el genoma de l'Ad5. Els gens primerencs s'indiquen amb fletxes negres, i els gens intermedis i tardans s'indiquen amb fletxes grises. (Basat en l'esquema de Tauber i Dobner, 2001)

2.2.1. La regió E4

Degut a què en aquest treball s'han generat adenovirus oncolítics amb una part de la regió E4 deletada, en aquest apartat s'aprofundirà en l'organització de la regió E4 i en la funció de les proteïnes expressades pels gens d'aquesta regió.

En l'adenovirus 5 la unitat de transcripció E4 és troba localitzada entre les unitats de mapa 91.3 i 99.1, al final de l'extrem dret del genoma adenoviral, i es transcriu en sentit invers, a partir de la cadena de DNA complementària (Fig. 2B). Aquesta regió és controlada pel promotor E4, que genera un primer transcrit d'aproximadament 2800 pb de llargada. A partir d'un complex patró d'*splicings* alternatius, aquest transcrit genera fins a 18 mRNA diferents, que comparteixen una regió comú en els extrems terminals 3' i 5'. Aquests mRNA codifiquen per set polipèptids diferents, l'ORF1, l'ORF2, l'ORF3, l'ORF3/4, l'ORF4, l'ORF6 i l'ORF7 (Fig. 3). Tots ells, menys

l'ORF3/4 han estat identificats en cèl·lules infectades. La transcripció de la regió E4 arriba a un màxim d'expressió aproximadament a les 4 h després de la infecció, i a partir d'aquí disminueix, tot i que encara continua activa durant la fase tardana de la replicació.

Els primers estudis realitzats per entendre el rol dels productes gènics de la regió E4 van utilitzar una sèrie de mutants dels Ad2 i Ad5, que portaven diferents insercions o delecions de la regió E4. La caracterització fenotípica d'aquests mutants indicava que modificacions d'ORF individuals no tenien efecte, o presentaven un efecte moderat en el cicle lític viral (Halbert *et al.*, 1985). Per contra, els mutants que els hi faltava la regió E4 sencera, o els ORF3 i ORF6, presentaven defectes greus en la replicació viral. Aquests mutants presentaven un fenotip complex, que incloïa defectes en l'encapsidació viral, dificultats en l'acumulació nuclear i citoplasmàtica d'mRNA tardans, pitjor síntesi de proteïnes tardanes, i dificultats en aturar la síntesi de macromolècules de la cèl·lula hoste durant la fase tardana (Bridge and Ketner 1989; Halbert *et al.*, 1985; Tauber and Dobner 2001). A més, l'acumulació de DNA viral es trobava substancialment dificultada, i aquests mutants produïen poblacions heterogènies de concatèmers de DNA viral (Weiden and Ginsberg 1994). Anàlisis més extensives demostraven que, mentre els mutants amb els ORF3 i ORF6 deleccionats tenien deficiències greus en el creixement, els mutants que expressaven l'ORF6 es replicaven pràcticament igual que l'adenovirus salvatge. Els mutants que expressaven l'ORF3 però no l'ORF6 presentaven deficiències moderades en la replicació. A més, els mutants que tenien l'ORF3 o l'ORF6 funcional no acumulaven concatèmers de DNA viral. En general, aquests estudis suggerien que l'ORF3 i l'ORF6 presentaven funcions redundants per a una replicació viral eficient, mentre la resta de productes d'E4 podrien ser dispensables pel cicle lític viral. En aquesta tesi s'han deleccionat els ORF1, ORF2 i ORF3 de la regió E4 per tal d'obtenir espai suficient pel clonatge de transgens en el genoma d'adenovirus oncolítics. En un estudi realitzat per Bridge i Ketner, els mutants amb els ORF1, ORF2 i ORF3 de la regió E4 deleccionats no van presentar defectes en cap dels processos analitzats, incloent la síntesi de proteïnes virals tardanes, l'acumulació d'mRNA virals tardans al citoplasma, l'acumulació de DNA viral i l'habilitat de formar calbes (Bridge and Ketner 1989).

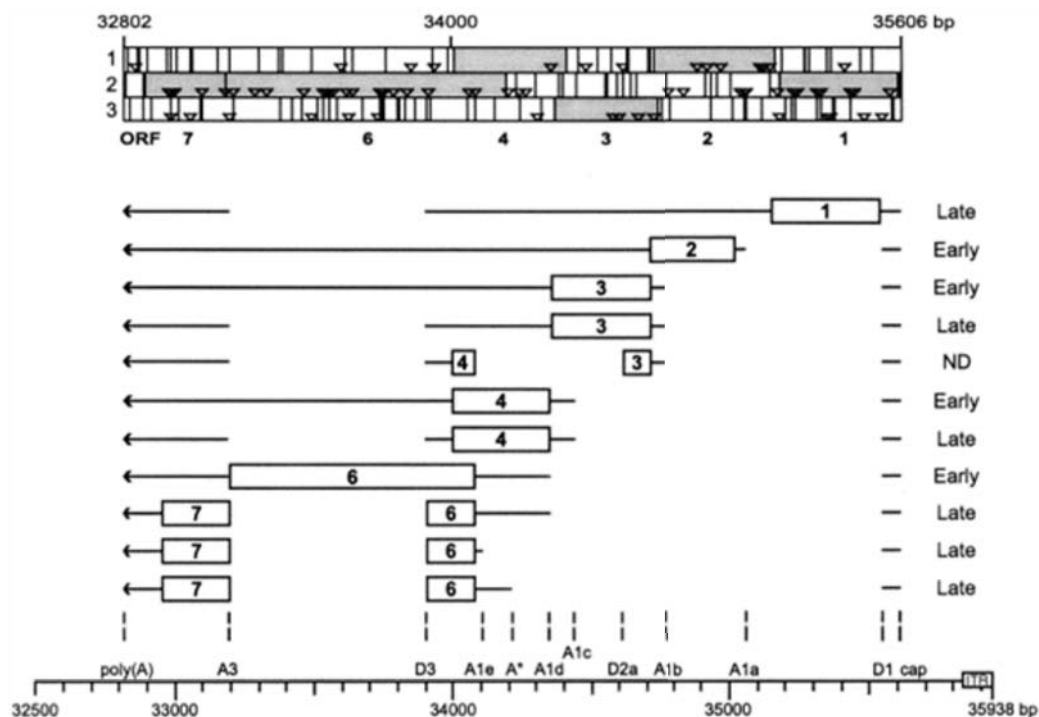


Figura 3. Unitat de transcripció E4 de l'Ad5. A dalt de tot: es presenta un mapa dels ORF de la regió E4. Es mostren els tres marcs de lectura (1, 2 i 3) de la cadena "sense" des de la posició 32802 a la 35606. Els rectangles grisos indiquen les seqüències codificants de l'ORF1 fins a l'ORF7. Les línies verticals indiquen els codons de parada de la transcripció, mentre els triangles indiquen els codons metionina. Al mig: s'indiquen els mRNA d'E4, mitjançant línies i rectangles. Els rectangles simbolitzen les regions codificants. A baix: La localització dels ORF i de les combinacions de seqüències donadores (D) i acceptores (A) de tall i lligació. (Tauber i Dobner, 2001).

ORF1

L'expressió de la proteïna ORF1 s'ha detectat només en alguns serotips i actualment, els coneixements sobre les funcions de l'ORF1 de l'Ad5 són pocs. En les cèl·lules infectades amb l'Ad5, l'mRNA d'ORF1 s'acumula durant la fase tardana de la replicació, indicant que l'ORF1 podria presentar funcions lítiques tardanes (Tauber and Dobner 2001). Mutacions en el gen *ORF1* tenen efectes mínims en la replicació viral en la majoria de cèl·lules tumorals, tot i que la deleció de l'ORF1 va provocar problemes en la replicació viral en cèl·lules primàries (Weitzman and Ornelles 2005). Altres estudis demostren que la proteïna ORF1 és necessària per a l'activació de la via d'mTOR, mitjançant l'activació de la PI3-quinasa (O'Shea *et al.*, 2005). L'activació de la via d'mTOR és important per a l'entrada de la cèl·lula a la fase S del cicle cel·lular i és independent d'E2F. L'activació d'aquesta via és necessària perquè l'adenovirus es repliqui en cèl·lules quiescents primàries. Estudis amb l'ORF1 de l'Ad9 indiquen que aquesta proteïna pot transformar cèl·lules humanes i animals (Javier 1994).

ORF2

Actualment, no hi ha informació sobre la funció de la proteïna sintetitzada per l'ORF2. Els mutants de l'Ad5 amb mutacions a l'ORF2 es repliquen a nivells semblants als de l'adenovirus

salvatge en cèl·lules HeLa i en fibroblasts humans no transformats (Dix and Leppard 1995; Halbert *et al.*, 1985; Tauber and Dobner 2001). La proteïna ORF2 és una proteïna soluble citoplasmàtica, que es produeix durant la fase primerenca de la infecció (Dix and Leppard 1995). La seva possible interacció amb altres proteïnes virals o cel·lulars no ha estat detectada.

ORF3

La proteïna ORF3 és una proteïna d'11 kDa que es localitza al nucli. La proteïna ORF3 presenta funcions redundants amb la proteïna viral ORF6, algunes de les quals deriven de l'habilitat d'aquestes proteïnes d'interaccionar amb factors cel·lulars i virals comuns. La proteïna ORF3, així com la proteïna ORF6, millora l'estabilitat dels mRNA virals no processats en el nucli, incrementant així la quantitat d'RNA disponible per madurar i ser transportat al citoplasma. Com a conseqüència, es dona una acumulació d'mRNA al citoplasma i un augment de la síntesi de proteïnes virals tardanes. Per altra banda, la proteïna ORF3, així com la proteïna ORF6, augmenta la replicació del DNA viral, la inhibició de la síntesi de proteïnes de la cèl·lula hoste, i la producció de virions (Tauber and Dobner 2001).

Durant la replicació, l'amplificació del DNA viral produeix uns 100.000 extrems de DNA de doble cadena. La cèl·lula hoste respon a aquest perill amb l'activació de la resposta cel·lular al dany del DNA, que funciona com una resposta antiviral. Aquesta resposta només es detecta en les infeccions produïdes per un adenovirus deficient en la regió E4. En l'Ad5, les proteïnes ORF3 i ORF6 poden prevenir la formació de concatàmers de DNA viral i l'activació de la resposta cel·lular al dany del DNA mitjançant la interacció amb el complex Mre11 (Stracker *et al.*, 2002). La proteïna ORF3 és capaç de reorganitzar el complex Mre11, mentre que la proteïna ORF6, unida a E1B-55K és la responsable de la degradació del complex.

La proteïna ORF3 és necessària i suficient per induir la reorganització d'uns cossos nuclears (NB) anomenats dominis oncogènics PML (POD) (Doucas *et al.*, 1996). La proteïna ORF3 s'uneix a la matriu nuclear on és capaç de reorganitzar els cossos nuclears en formacions *trak-like*, procés que es dona durant la fase primerenca de la infecció. La reorganització dels NB, duta a terme per diferents virus, s'associa amb la formació de compartiments de replicació virals i amb una replicació viral eficient (Everett 2001; Maul 1998). Més recentment, s'ha demostrat que la reorganització dels POD per part de la proteïna ORF3 és un procés necessari per a la inhibició de la resposta antiviral induïda pels interferons α i β (Ullman *et al.*, 2007).

ORF4

La proteïna ORF4 és una proteïna de 14 kDa. Els adenovirus mutants d'E4 amb l'ORF4 deletionat es repliquen als nivells de l'adenovirus salvatge. L'expressió de la proteïna ORF4 és

altament citotòxica per les cèl·lules tumorals, tot i que la mort cel·lular no es dona fins 24-48 h després de la seva expressió (Branton and Roopchand 2001). La citotoxicitat de l'ORF4 s'atribueix a la seva capacitat d'induir una nova via d'apoptosi independent de p53 (Kleinberger 2004; Marcellus *et al.*, 2000; Marcellus *et al.*, 1998). A dia d'avui, la possible cooperació de la proteïna ORF4 amb la proteïna ADP no ha estat establerta .

La majoria de funcions de la proteïna ORF4 es duen a terme mitjançant la interacció amb la fosfatasa cel·lular PP2A (Kleinberger and Shenk 1993). La interacció d'ORF4 amb PP2A resulta en la hipofosforilació selectiva de diferents proteïnes cel·lulars i víriques. Com a conseqüència, l'ORF4 modula diferents processos com la down-regulació dels senyals de transducció induïts per la infecció viral i la regulació de l'expressió gènica viral (E2 i E4) i cel·lular a nivells transcripcionals i post-transcripcionals (Tauber and Dobner 2001). La unió de la proteïna ORF4 amb la proteïna PP2A és capaç d'activar la via d'mTOR, necessària per a la replicació dels virus en les cèl·lules quiescents. L'activació de la via d'mTOR per l'ORF4 és dona per activació de la proteïna p70^{S6K} upstream d'mTOR, i és independent de l'activació d'mTOR per la proteïna ORF1 (O'Shea *et al.*, 2005). La unió de la proteïna ORF4 a la proteïna PP2A també està implicada en la regulació dels *splicings* alternatius de la regió L1. La proteïna E4 incrementa l'ús de l'acceptor de tall i lligació distal de la regió E1, i indueix una acumulació de l'mRNA IIIa, en detriment de la transcripció de l'mRNA de 52,55K que utilitza l'acceptor de tall i lligació proximal (Kanopka *et al.*, 1998). Sembla que aquest canvi en el patró d'*splicings* induït per la proteïna ORF4 es dona per defosforilació i inactivació de les proteïnes SR pel complex ORF4-PPIA, encarregades d'inhibir l'*splicing* del IIIa mRNA (Kanopka *et al.*, 1996).

ORF6

La proteïna ORF6 és una proteïna multifuncional de 34 kDa que s'expressa durant la fase primerenca de la infecció. La proteïna ORF6 regula diferents processos mitjançant la interacció amb diferents proteïnes cel·lulars i virals. El complex ORF6-E1B-55kDa regula processos com la síntesi de DNA viral, l'expressió de gens virals tardans, l'*splicing* i el transport dels mRNAtardans al citoplasma i la inhibició de la síntesi de proteïnes de la cèl·lula hoste (Babiss *et al.*, 1985; Bridge and Ketner 1990; Halbert *et al.*, 1985; Pilder *et al.*, 1986). La proteïna ORF6 també recluta factors cel·lulars com Cullin-5, Elongina B i Elongina C, que juntament amb la proteïna E1B-55k formen el complex ubiquitina lligasa, d'alt pes molecular. Es coneixen dos substracts principals per aquest complex: la proteïna p53 (Harada *et al.*, 2002; Querido *et al.*, 2001) i el complex MRN, format per les proteïnes Mre11, RAD50 i NBS1 (Stracker *et al.*, 2002). La unió del complex ORF6/E1A-55K amb la proteïna p53 és capaç d'inhibir l'apoptosi mediada per aquesta proteïna, mentre la unió del complex ORF6/E1A-55K al complex MRN inhibeix la resposta cel·lular al dany del DNA, mitjançant la degradació del complex MRN.

ORF6/7

La proteïna ORF6/7 actua com un transactivador viral, complementant la funció de la proteïna E1A de promoure l'expressió de la unitat de transcripció E2 i els gens cel·lulars controlats per la família dels factors de transcripció d'E2F (Tauber and Dobner 2001). L'expressió de la proteïna ORF6/7 és suficient per desplaçar les proteïnes pRb i p107 dels heterodímers d'E2F i per activar l'expressió d'E2 mitjançant la inducció de la unió del factor E2F lliure al promotor d'E2 (O'Connor and Hearing 2000).

2.3. DISSENY D'ADENOVIRUS SELECTIUS DE TUMOR

Pel disseny d'adenovirus replicatius selectius de cèl·lula tumoral, s'utilitzen principalment tres estratègies: (a) la deleció de funcions virals que són necessàries a per la replicació en cèl·lules normals, però prescindibles en cèl·lules tumorals; (b) el control dels gens virals que inicien la replicació mitjançant promotors específics de tumor; (c) la modificació de les proteïnes de la càpsida viral implicades en la infecció de la cèl·lula hoste.

2.3.1. Deleccions dels gens virals com estratègia per conferir selectivitat tumoral.

La capacitat d'un adenovirus de replicar el seu genoma viral recau en l'habilitat d'aquest virus d'apoderar-se de la maquinària de la cèl·lula hoste. La deleció o mutació dels gens virals implicats en l'activació de la replicació cel·lular o en la inhibició de l'apoptosi genera adenovirus incapaços de replicar-se en cèl·lules normals. En les cèl·lules tumorals, on la replicació cel·lular es troba activada, i la via de l'apoptosi resta inhibida, el virus és capaç de replicar-se i lissar la cèl·lula tumoral.

La primera aproximació en aquesta línia va ser la deleció de la regió gènica que codifica per la proteïna E1B-55kD per generar l'adenovirus dl1520 (també conegut com ONYX-015). En les cèl·lules normals, la proteïna E1B-55kD s'uneix a la proteïna p53 i l'inactiva, permetent així la replicació viral. Aquesta funció de la proteïna E1B-55kD és innecessària en la cèl·lula tumoral, on la proteïna p53 es troba generalment inactivada. La selectivitat tumoral de l'adenovirus dl1520 ha estat demostrada en pacients i en cèl·lules normals *in vitro*, tot i que les dades *in vitro* sobre el rol de p53 durant la infecció adenoviral han estat conflictives (Kirn 2000).

Una altra aproximació en la mateixa línia va ser la deleció de la regió conservada 2 d'E1A. Els mutants adenovirals dl922-947 (Heise *et al.*, 2000) i Δ 24 (Fueyo *et al.*, 2000) presenten petites deleccions en aquesta regió, responsable de la unió d'E1A a la proteïna cel·lular pRb. En la

cèl·lula normal, la unió de la proteïna E1A a pRb allibera el factor de transcripció E2F-1, necessari perquè la cèl·lula progressi de la fase G1 a la fase S (de síntesi de DNA) del cicle cel·lular. Aquesta funció de la proteïna E1A no és necessària en les cèl·lules tumorals, on la via de pRb es troba generalment alterada. Estudis preclínic van demostrar que la replicació del mutant adenoviral dl922-947 en les cèl·lules tumorals testades era similar a la replicació del virus salvatge, mentre la producció viral en cèl·lules quiescents normals disminuïa en varis logaritmes. L'eficàcia antitumoral dels mutants d'E1A ha estat demostrada en models humans xenògrafs en ratolins immunocompetents. En canvi, la falta d'un bon model animal que permeti la replicació de l'adenovirus en cèl·lules normals, i la manca d'estudis clínics en humans, ha impedit l'avaluació de la selectivitat tumoral d'aquest adenovirus (Alemany *et al.*, 2000).

Tot i que aquesta estratègia sembla efectiva, la possibilitat que aquests adenovirus puguin replicar-se en teixits normals que estiguin en proliferació restringeix l'ús d'aquests adenovirus a l'administració intratumoral.

2.3.2. Control de la replicació viral mitjançant l'ús de promotors específics de tumor

Direccionament transcripcional.

Una altra estratègia per conferir a l'adenovirus selectivitat tumoral és el control de l'expressió de gens virals mitjançant promotors específics de teixit o de cèl·lula tumoral (Taula 2). La primera aproximació en aquesta línia va ser l'adenovirus CV706, on l'expressió d'E1A es controla mitjançant el promotor de l'antigen específic de pròstata (PSA). L'adenovirus CV706 es va utilitzar pel tractament del carcinoma de pròstata (Rodríguez *et al.*, 1997). L'ús de promotors específics de teixit, com el PSA, té l'inconvenient que el virus també es replicarà en el teixit normal del qual prové el tumor. Aquesta estratègia s'haurà de combinar amb mecanismes addicionals de selectivitat (com la deleció de E1B-55K o la deleció $\Delta 24$) i només serà aplicable en cas que la pèrdua de teixit normal sigui acceptable. Una altra aproximació en aquesta línia és l'ús de promotors selectius de tumor. En l'AvE1a041, el gen d'E1A es troba sota el control del promotor de l' α -fetoproteïna (AFP) (Hallenbeck *et al.*, 1999). L'AFP és un marcador tumoral del carcinoma hepatocel·lular, que en condicions fisiològiques normals només s'expressa en el fetge fetal. Un altre exemple, en aquesta mateixa línia, és l'ús del promotor de l'antigen carcinoembrionari (CEA) pel tractament del càncer colorectal (Li *et al.*, 2003). La principal limitació de l'ús d'aquests promotors és que no són actius en qualsevol tipus de tumor. Inclús, dins del mateix tumor, no totes les cèl·lules expressaran el marcador tumoral (Chu *et al.*, 2004).

Això va portar a la identificació i disseny de nous promotors que fossin universalment actius en diferents tipus tumorals. Una de les principals característiques de les cèl·lules tumorals és una proliferació aberrant deguda a una desregulació del cicle cel·lular. L'expressió constitutiva d'altres concentracions d'E2F-1 en la cèl·lula tumoral permet la replicació selectiva d'adenovirus on el gen d'E1A està controlat pel promotor d'E2F-1 (Cascallo *et al.*, 2007; Johnson *et al.*, 2002; Majem *et al.*, 2006; Ryan *et al.*, 2004). En la cèl·lula normal, on E2F es troba segregat per pRb, el complex pRb-E2F s'uneix al promotor i inhibeix la transcripció d'E1A. Altres aproximacions similars, són l'ús del promotor de la telomerasa o l'ús del promotor de resposta al factor induïble per hipòxia.

Una altra estratègia per controlar l'expressió dels gens primerencs adenovirals és l'ús de promotors artificials. Els promotors artificials són seqüències modulares que combinen elements reguladors de DNA, que poden estar separats per diferents parells de bases. Normalment estan formats per llocs d'unió a factors de transcripció, silenciadors, o estimuladors (*enhancers*) units al core d'un promotor (Adamia *et al.*, 2005; Hernandez-Alcoceba *et al.*, 2002; Peter *et al.*, 2003).

Finalment, una aproximació més conservadora és la modificació dels promotors nadius virals per inserció de llocs d'unió a factors de transcripció. En aquest cas, cal considerar l'arquitectura dels promotors virals que seran modificats. La zona d'inserció de les modificacions, i la distància entre els llocs d'unió, seran claus per l'èxit de l'estratègia. Un exemple, és la inserció de llocs d'unió pel factor de transcripció TCF/LEF en diferents promotors adenovirals pel tractament de tumors amb la via de Wnt constitutivament activada (Brunori *et al.*, 2001; Hsieh *et al.*, 2002).

Mètodes de control de la fidelitat dels promotors.

Perquè es doni un correcte control de la replicació viral, cal que els promotors específics de cèl·lula tumoral mantinguin la seva selectivitat en el context del genoma viral. Pel contrari, diferents estudis demostren que promotors que mostren especificitat en transfeccions de plasmidis reporters, un cop inserits en el genoma adenoviral perden la seva especificitat. Una possible causa d'aquesta pèrdua de fidelitat transcripcional és la presència de llocs críptics d'inici de la transcripció en l'extrem esquerra del genoma adenoviral. Aquests llocs críptics poden mediar la transcripció de qualsevol gen viral localitzat a continuació d'aquests llocs, independentment de la posició del promotor. Per tal de prevenir aquesta transcripció inespecífica, s'han usat tres estratègies diferents: (a) la inserció de seqüències de poliadenilació (polyA) just abans del promotor; (b) la col·locació del cassat d'expressió "promotor-E1A" en l'orientació inversa; (c) la relocalització del senyal d'empaquetament.

Taula 2.Targeting transcripcional: Taula resum d'alguns adenovirus oncolítics amb gens primerencs controlats per promotors específics.

Virus	Tumor	Promotor	Gen controlat	Especificitat	Assajos Clínics	Referencies
Adv-TERTp-E1a	Pan	TERT	E1A	TERT +	No	(Huang <i>et al.</i> , 2003)
TEhRt-Ad		TERT	E1A	TERT +	No	(Wirth <i>et al.</i> , 2003)
HyPR-Ad		HIF	E1A	HIF + o hipoxia	No	(Post <i>et al.</i> , 2007)
Ad9xHRE1A		HIF	E1A	HIF + o hipoxia	No	(Cuevas <i>et al.</i> , 2003)
Ar6pAE2fE3F		E2F-1	E1A	Cèl·lulas en replicació + inactivació pRb	No	(Jakubczak <i>et al.</i> , 2003)
ONYX-411		E2F-1	E4, E1AΔCR2	Cèl·lulas en replicació + inactivació pRb	No	(Johnson <i>et al.</i> , 2002)
AdE2F-1 ^{RC}		E2F-1	E1A	Cèl·lulas en replicació + inactivació pRb	No	(Tsukuda <i>et al.</i> , 2002)
AdE3-cox2-327		Ciclooxigenasa 2	E1A	Cox-2 +	No	(Shirakawa <i>et al.</i> , 2004)
AdEHT2	mama	a) Estrògen + hipoxia b) TERT	a) E1A b) E4	Receptor d'estrògen	No	(Hernandez-Alcoceba <i>et al.</i> , 2002)
AdEHE2F		a)Estrógeno + hipoxia b)E2F-1	a) E1A b) E4	Receptor d'estrògens ⁺	No	(Hernandez-Alcoceba <i>et al.</i> , 2002)
Ad.ERE2		Promotor pS2 Resposta a estrògens	E1A, E4	Receptor d'estrògens ⁺	No	(Hernandez-Alcoceba <i>et al.</i> , 2000)
Ad-OC-E1A	Pròstata	Osteocalcina murina	E1A	Osteocalcina +	No	(Matsubara <i>et al.</i> , 2001)
CV787	Pròstata	a)Probasina de rata b)PSA	a) E1A b) E1B	PSA+	Fase I	(Yu <i>et al.</i> , 1999)
CV764	Pròstata	a) PSA b) Calicreïna glandular	a) E1A b) E1B	PSA+	No	(Yu <i>et al.</i> , 1999)
CN706	Pròstata	Promotor PSA	E1A	PSA+	Fase I	(Rodriguez <i>et al.</i> , 1997)
AvE1a04i	Fetge	Fetoproteïna α	E1A	AFP +	No	(Hallenbeck <i>et al.</i> , 1999)
CV890	Fetge	Fetoproteïna α	E1A-IRES-E1B	AFP +	No	(Li <i>et al.</i> , 2001b)
AdTyrwt	Melanoma	'Enhancer' Tirosinasa	E1A	Tirosinasa +	No	(Nettelbeck <i>et al.</i> , 2002)
AdTyrΔ24	Melanoma	'Enhancer' Tirosinasa	E1AΔ24 (CR2)	Tirosinasa + inactivació pRb	No	(Nettelbeck <i>et al.</i> , 2002)
vCF11	Colon	Responde a sitios Tcf	E1A	Via Wnt activada	No	(Fuerer and Iggo 2002)
AdMKE1	Neuroblastoma	Midquina	E1A	Midkina +	No	(Adachi <i>et al.</i> , 2001)

Per altra banda, la presència de llocs d'unió a factors d'activació, amb activitat *enhancer*, en la regió ITR i en el senyal d'empaquetament interfereix amb la selectivitat del promotor. Una estratègia per prevenir aquesta pèrdua de selectivitat és l'aïllament dels promotors específics de tumor amb una seqüència aïllant (*insulator*). Els *insulators* són elements reguladors del DNA presents en el genoma de les cèl·lules eucariòtiques. Els *insulators* prevenen l'activació dels promotors pels *enhancers* sempre i quan estiguin inserits entre ells (West *et al.*, 2002). Diferents treballs han demostrat la fidelitat dels *insulators* de la β -globulina de pollastre (HS4) o del gen de la distròfia humana (DM) en el genoma d'adenovirus defectiu en replicació, i en adenovirus oncolítics (Majem *et al.*, 2006; Martin-Duque *et al.*, 2004; Steinwaerder and Lieber 2000). Una aproximació diferent consisteix en la relocalització de la senyal d'empaquetament des de la seqüència terminal esquerra a la seqüència terminal dreta del genoma viral (Fuerer and Iggo 2002; Hearing and Shenk 1983; Jakubczak *et al.*, 2003), tot i que aquesta relocalització s'ha relacionat amb inestabilitat genòmica.

2.3.3. Direccionament de la infectivitat viral: Targeting transduccional

Una altra estratègia interessant pel direccionament de la infecció adenoviral cap a les cèl·lules tumorals és la modulació del tropisme viral, mitjançant la modificació de la càpsida adenoviral. El receptor cel·lular CAR, que media l'entrada de l'adenovirus 5 a la cèl·lula, està poc expressat en la majoria de cèl·lules tumorals (Bauerschmitz *et al.*, 2002). La inserció del motiu RGD en el *HI-loop* del *knob* de la fibra adenoviral millora la infectivitat tumoral, permetent l'entrada del virus a la cèl·lula mitjançant la interacció amb les integrines. Una altra aproximació per augmentar la infectivitat tumoral es la construcció de fibres adenovirals quimèriques, que contenen el *shaft* de la fibra de l'adenovirus 5 i el *knob* de la fibra de l'adenovirus 3. Aquestes modificacions, tot i augmentar la infectivitat, no medien una infecció selectiva de les cèl·lules tumorals.

Recentment, s'ha descobert que l'entrada a la cèl·lula hoste quan l'adenovirus entra a l'organisme via sistèmica (pel seu ús terapèutic, en teràpia gènica o viroteràpia), difereix de l'entrada clàssica a les cèl·lules epitelials del tracte respiratori dels adenovirus aeris, mediada pel receptor CAR i les integrines. En la sang, l'adenovirus s'uneix a factors de coagulació dependents de la vitamina K, com els factors VII, IX i X i a proteïnes del complement, com la C3 i la C4BP (Parker *et al.*, 2006; Shayakhmetov *et al.*, 2005). El factor IX i la proteïna C4BP s'uneixen a la fibra adenoviral (Shayakhmetov *et al.*, 2005), mentre el factor X s'uneix a la regió hipervariable de l'hexó (Kalyuzhniy *et al.*, 2008; Waddington *et al.*, 2008). Aquests factors sanguinis promouen la infecció dels hepatòcits a través dels proteoglicans heparan sulfats. Més recentment, el nostre grup ha demostrat que els factors en sang també són determinants per a l'entrada de

l'adenovirus a la cèl·lula tumoral (Gimenez-Alejandre *et al.*, 2008). Aquests nous resultats indiquen que, per tal d'aconseguir un adenovirus que infecti les cèl·lules tumorals selectivament, caldrà combinar les mutacions que eliminin els punts d'unió de l'adenovirus als factors en sang (*liver detargeting*) amb lligands d'alta afinitat que compensin per la pèrdua d'infectivitat a les cèl·lules tumorals (*tumor retargeting*) (Gimenez-Alejandre *et al.*, 2008).

2.3.4. L'ICOVIR5

A l'inici d'aquest treball, el nostre grup estava treballant amb l'ICOVIR5, un adenovirus oncolític construït en el nostre laboratori. L'ICOVIR5 combina cinc modificacions genètiques diferents per assolir un efecte antitumoral potent i selectiu. Per tal d'inhibir la replicació d'ICOVIR5 en cèl·lules normals, l'expressió d'E1A està controlada pel promotor d'E2F-1, aïllat per l'aïllant de la distròfia muscular humana (DM). A més, l'ICOVIR5 presenta la deleció $\Delta 24$ en la regió conservada 2 d'E1A. Per tal d'augmentar els nivells d'expressió d'E1A en la cèl·lula tumoral, l'ICOVIR5 conté la seqüència kozac (CCACC) just abans del codó d'inici d'E1a. Aquesta seqüència és important per a l'optimització de la traducció de l'mRNA per part dels ribosomes eucariotes. Per altra banda, la infectivitat de l'adenovirus en la cèl·lula tumoral està incrementada mitjançant la inserció del pèptid RGD en el HI-loop del *knob* de la fibra.

La caracterització dels perfils de potència i toxicitat d'ICOVIR5 indicaven que, mentre l'adenovirus salvatge (Adwt) era capaç de replicar-se *in vitro* en fibroblasts humans, en cultius primaris d'hepatòcits i en biòpsies de fetge humà, la replicació d'ICOVIR5 estava altament atenuada. L'estudi de toxicitat *in vivo* en ratolins immunocompetens indicava que mentre l'administració de 5×10^{10} partícules virals (vp) d'Adwt per ratolí superava la LD₅₀ a dia 5 post-administració, l'administració de la mateixa dosi d'ICOVIR5 presentava una toxicitat molt moderada. A aquesta dosi, els ratolins injectats amb ICOVIR5 no presentaven disminució de pes corporal ni alteracions hematològiques. L'increment de transaminases provocat per l'administració d'ICOVIR5 era 10 vegades inferior al provocat per l'administració de l'adenovirus salvatge. Pel que fa a l'eficàcia, l'ICOVIR5 era capaç de replicar-se i matar les cèl·lules tumorals cultivades *in vitro* a nivells semblants als de l'adenovirus salvatge. L'administració sistèmica de l'ICOVIR5 en ratolins atímics amb tumors xenògrafs de diferents orígens va ser capaç d'induir una inhibició del creixement tumoral significativa respecte el grup control (PBS) en tots els models analitzats. Tot i que la presència d'ICOVIR5 es va detectar en els tumors tractats, 27 dies després de ser injectats, els tumors amb replicació activa d'ICOVIR5 no van ser capaços de regressar. L'anàlisi histològica dels tumors revelava que, les regions on es detectava el virus estaven envoltades per teixit fibròtic i elevades concentracions de col·lagen. Aquests resultats podrien indicar que les cèl·lules de l'estroma, d'origen no tumoral (i en aquest cas, murí),

juntament amb l'elevada concentració de matriu extracel·lular, podrien estar actuant com a barrera intra-tumoral per una correcta disseminació del virus, impedit així una resposta tumoral completa (Cascallo *et al.*, 2007).

En resum, la combinació de les modificacions genètiques realitzades en l'ICOVIR5 permeten un nivell elevat de potència i selectivitat. Tot i així, per tal de millorar la resposta antitumoral *in vivo*, caldrà explorar noves estratègies dirigides a augmentar la biodistribució i la dispersió intratumoral de l'adenovirus, així com la seva potència antitumoral.

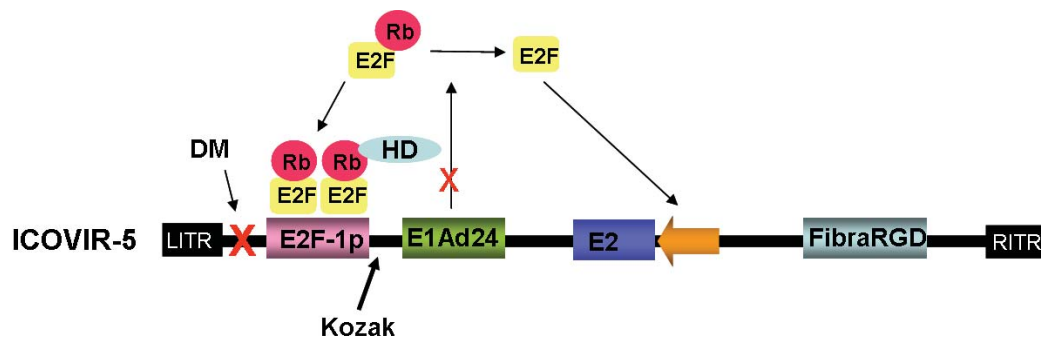


Figura 4. Mecanisme de selectivitat de l'ICOVIR5 en les cèl·lules normals. En les cèl·lules normals, el factor de transcripció E2F es troba unit a la proteïna Rb. El complex pRb/E2F inhibeix el promotor E2F-1 impedit la transcripció d'E1A i l'activació de la replicació viral. La DM aïlla el promotor per evitar l'activació de la transcripció pels llocs crítics d'inici de transcripció de l'ITR. Per altra banda, la delecció de 24 pb de la CR2 d'E1A evita que E1A segresti la proteïna pRb i alliberi E2F, inhibint així l'activació de la transcripció d'E1A i E2. Per altra banda, l'ICOVIR5 presenta dues modificacions que milloren la potència de l'adenovirus en les cèl·lules tumorals: per una banda, la seqüència kozac incrementa la traducció de la proteïna E1A, i per l'altre, el pèptid RGD millora la infectivitat del virus en les cèl·lules tumorals.

2.4. L'EXPERIÈNCIA CLÍNICA AMB ADENOVIRUS ONCOLÍTIQUES: LIMITACIONS I POSSIBLES OBSTACLES A SUPERAR.

Diferents adenovirus oncolítics, majoritàriament l'ONYX-015, però també altres virus de replicació controlada per promotors tumorals (CV706 i CV890), han estat administrats en diferents assajos clínics. La toxicitat i l'eficàcia de l'adenovirus ONYX-015 han estat extensivament avaluades en pacients amb tumors de cap i coll, càncer d'ovari, càncer colorectal, càncer de pròstata, carcinoma hepatocel·lular i càncer de pàncrees, entre d'altres. El perfil de seguretat d'aquest adenovirus, administrat per diferents vies, incloent la via intratumoral, intraperitoneal, intra-arterial i intravenosa, ha estat molt prometedora. Els efectes secundaris detectats, com alguns símptomes gripals, elevacions transitòries de les transaminases, i hiperbilirubinèmia reversible, van ser ben tolerats, inclús després de l'administració sistèmica d'altres dosis de virus.

En canvi, la resposta terapèutica al tractament amb ONYX-015 ha estat variable i depenent de la via d'administració. En general, tot i que l'activitat antitumoral va poder ser demostrada, l'eficàcia terapèutica en monoteràpia va ser insuficient. Ni tan sols l'administració intratumoral en tumors de cap i coll durant 5 dies consecutius de tractament, punxant el tumor de 4 a 8 vegades, i repetint l'administració cada tres setmanes va ser suficient per observar regressions tumorals completes. Les respostes antitumorals després d'una administració sistèmica (via d'administració necessària per arribar a zones no operables i a múltiples metàstasis) varen ser mínimes. L'administració conjunta d'ONYX-015 i quimioteràpia en pacients amb tumors de cap i coll (administració intratumoral) i en pacients amb metàstasis colorectals a fetge (administració a la artèria hepàtica) va ser més prometedora, demostrant una millora en l'eficàcia antitumoral sense augmentar la toxicitat del tractament.

La baixa eficàcia antitumoral de l'adenovirus ONYX-015 observada en aquests assajos clínics es pot atribuir a diferents factors. En primer lloc, tot i que els virus replicatius poden difondre fàcilment en la monocapa cel·lular, la distribució del virus en la massa tumoral està molt més limitada. La ineficiència del virus per distribuir-se pel tumor pot relacionar-se amb la grandària del virus (90 nm), molt més gran que les drogues quimioteràpiques, pèptids i anticossos. L'elevada pressió intersticial (més elevada al centre del tumor que a les afores), la presència de matriu extracel·lular en el tumor i el teixit fibròtic, compost per cèl·lules normals on l'adenovirus oncolític no es podria replicar, també dificulten la distribució viral dins la massa tumoral. Un altre factor que pot limitar l'eficàcia de la teràpia antitumoral és l'expressió insuficient de receptors virals (CAR) en les cèl·lules tumorals. Finalment, l'eficàcia antitumoral dels adenovirus replicatius es veu encara més limitada quan el virus s'administra sistèmicament (Fig. 5). Els adenovirus, que en la natura no entren a l'organisme via sistèmica, són ràpidament eliminats del torrent circulatori per les cèl·lules del fetge, limitant molt la quantitat de virus que arriba a tumor (Worgall *et al.*, 1997). A més, els adenovirus injectats directament al torrent sanguini poden ser inactivats pels anticossos neutralitzants molt més fàcilment que si són administrats via intratumoral, on la difusió d'anticossos neutralitzants es veu dificultada.

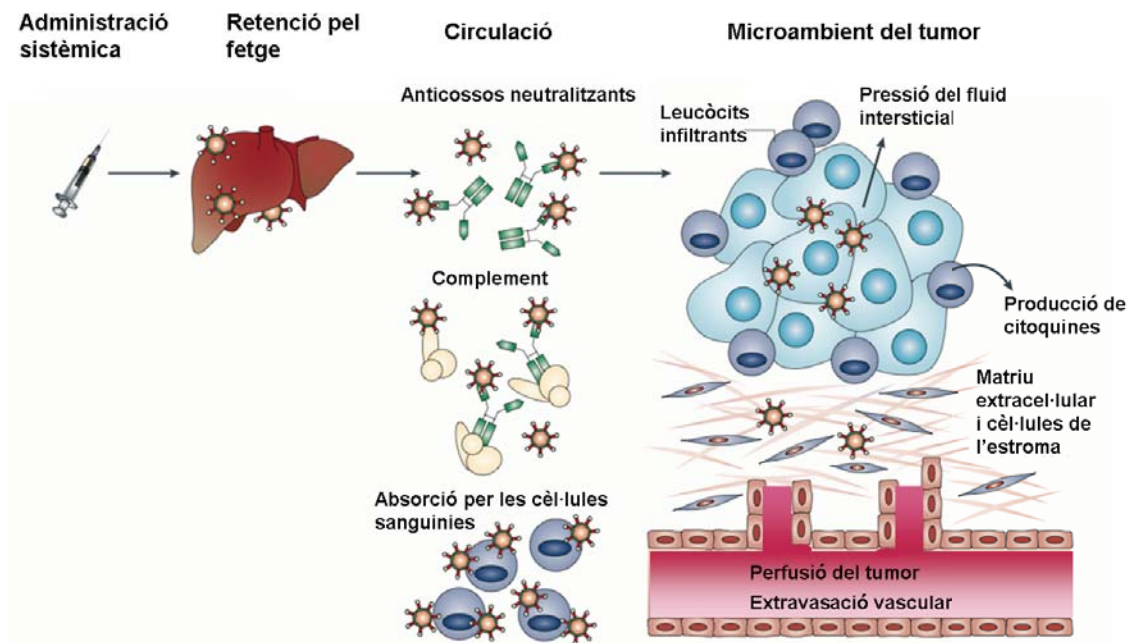


Figura 5. Barreres que dificulten la distribució dels adenovirus oncolítics en els tumors *in vivo*. Després de l'administració sistèmica d'un adenovirus en un pacient, hi ha diferents barreres que eviten que el virus arribi al tumor i infecti les cèl·lules tumorals. Durant els primers minuts, la majoria del virus administrat és retingut pel fetge. El poc virus que escapa d'aquest òrgan passa a la circulació sistèmica, on pot ser neutralitzat per absorció a les cèl·lules sanguínies, per la cascada del complement, o pels anticossos neutralitzants. Perquè el virus accedeixi al tumor ha de sortir del torrent circulatori travessant la paret de l'endoteli en contra del gradient de pressió present al fluid intersticial. Un cop al tumor, la dispersió del virus pot veure's perjudicada per la presència de matriu extracel·lular i cèl·lules de l'estroma. Finalment, els leucòcits infiltrants del tumor poden limitar la dispersió del virus cèl·lula-cèl·lula mitjançant la seva activitat antiviral, o de forma indirecta, mitjançant la secreció d'interferons i altres citocines (Parato *et al.*, 2005)

2.5. ESTRATÈGIES PER AUGMENTAR LA POTÈNCIA ONCOLÍTICA: ADENOVIRUS ONCOLÍTICS ARMATS

Els resultats obtinguts en assajos clínics mostren la necessitat de dissenyar nous adenovirus oncolítics amb una eficàcia antitumoral millorada. Una estratègia molt prometedora per tal d'augmentar la potència oncolítica dels adenovirus replicatius és la inserció de gens terapèutics en el genoma adenoviral per generar el que s'anomena "adenovirus oncolítics armats". La correcta expressió en el temps d'un transgèn terapèutic pot combinar els beneficis de la replicació i distribució viral amb l'efecte terapèutic del transgèn.

A l'hora d'inserir un transgèn en un adenovirus replicatiu s'han de tenir en compte dues consideracions importants. En primer lloc, és important que la replicació viral no es vegi afectada ni pel lloc d'inserció del transgèn, ni pel tipus d'activitat de la proteïna que expressarà l'adenovirus armat. En segon lloc, cal tenir en compte que els adenovirus oncolítics tenen una capacitat d'incorporació de DNA extern limitada. El genoma de l'adenovirus 5 salvatge té unes 36

kb i la llargada màxima del genoma adenoviral que pot ser encapsidada dins la càpsida viral és de 38 kb (un 105% del genoma salvatge) (Bett *et al.*, 1993). Així doncs, caldrà optimitzar molt bé l'espai disponible en el genoma adenoviral, no només a l'hora d'escollir el transgèn d'interès i l'estratègia per expressar-lo, sinó també a l'hora d'introduir en el genoma adenoviral les modificacions necessàries per conferir-li selectivitat tumoral.

2.5.1 Transgens terapèutics utilitzats per armar adenovirus replicatius

L'objectiu del transgèn inserit en el genoma de l'adenovirus oncolític no és el de matar la cèl·lula infectada, ja que aquesta cèl·lula morirà per efecte de la replicació viral, sinó eliminar les cèl·lules veïnes no infectades (efecte adjacent local), eliminar les cèl·lules tumorals situades en dipòsits llunyans al tumor (efecte adjacent sistèmic) o afavorir la distribució del virus pel tumor (Alemany 2007). Alguns exemples de transgens que s'han utilitzat en aquesta estratègia són: a) gens suïcides que codifiquen per enzims convertidors de prodrogues. La característica més rellevant dels gens suïcides és que presenten efecte adjacent local, segons el qual l'efecte tòxic del metabòlit activat difon de les cèl·lules que l'expressen a les cèl·lules veïnes. Alguns exemples de gens suïcides són la timidina quinasa (que activa el ganciclovir) (Cascante *et al.*, 2007; Lambright *et al.*, 2001; Morris and Wildner 2000; Wildner *et al.*, 1999a; Wildner *et al.*, 1999b) i la citosina deaminasa (que activa el 5-fluorocitosina) (Akbulut *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2006; Zhan *et al.*, 2005); b) gens que codifiquen per proteïnes que indueixen l'apoptosi i milloren l'alliberació viral, com el supressor tumoral p53 (Georger *et al.*, 2005; Georger *et al.*, 2004; van Beusechem *et al.*, 2002) o el TRAIL (Sova *et al.*, 2004; Wohlfahrt *et al.*, 2007); c) gens immunoestimuladors, que codifiquen per factors que atrauen les cèl·lules del sistema immune al lloc de la infecció, induint la seva proliferació i activació. Aquesta estratègia ens aporta un efecte adjacent sistèmic, permetent l'eliminació no només del tumor primari, sinó també de les metàstasis, i donant protecció enfront futures recaigudes. Alguns exemples d'aquests factors immunoestimuladors que han estat expressats en adenovirus replicatius són el GM-CSF, TNF- α , IL-4, IL-12, IL-24 i la proteïna de xoc tèrmic 70 (hsp-70) (Bristol *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2003; Kurihara *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2006; Post *et al.*, 2007; Ramesh *et al.*, 2006; Sarkar *et al.*, 2007; Sarkar *et al.*, 2005; Zhu *et al.*, 2005).

2.5.2 Control de l'expressió del transgèn terapèutic

A l'hora de controlar l'expressió del gen terapèutic en el genoma adenoviral s'han utilitzat bàsicament dues estratègies. La primera és la inserció de cassets d'expressió que continguin un promotor (que pot ser un promotor constitutiu o un promotor específic de tumor), un transgèn, i una seqüència de poliadenilació. En general, aquests cassets d'expressió han estat inserits en la

regió E3 (van Beusechem *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2006), o reemplaçant la proteïna E1B-55K (Freytag *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2003). En ambdós casos, els adenovirus oncolítics generats presenten la regió E3 parcial o totalment delecionada, per tal de proporcionar l'espai suficient en el genoma viral per acomodar la inserció dels cassets gènics.

La segona estratègia consisteix en controlar l'expressió del transgèn mitjançant elements de control gènic propis de l'adenovirus. Una aproximació en aquesta línia és la substitució de gens virals com *6.7k/gp19k*, *ADP* o *E3B* pel transgèn desitjat, aprofitant el promotor endogen d'E3 i els llocs de terminació (Hawkins and Hermiston 2001a; Hawkins and Hermiston 2001b; Hawkins *et al.*, 2001). Una altra opció consisteix en fusionar el transgèn d'interès a un gen viral mitjançant un IRES (internal ribosome entry site), que permet l'expressió dels dos gens en un sol transcrit. L'estratègia més comú en aquesta línia és la unió del transgèn d'interès al gen de la fibra adenoviral (Fuerer and Iggo 2004; Lukashev *et al.*, 2005; Sauthoff *et al.*, 2002). Finalment, l'expressió del transgèn es pot controlar mitjançant la incorporació de seqüències acceptores de tall i lligació (splicing acceptor, SA) addicionals en el genoma adenoviral (Carette *et al.*, 2005; Fuerer and Iggo 2004; Robinson *et al.*, 2008).

L'expressió del transgèn mitjançant els elements de control gènic propis de l'adenovirus té diversos avantatges respecte la inserció dels cassets d'expressió. En primer lloc, l'espai necessari per a la incorporació del transgèn és més reduït. En segon lloc, l'expressió del transgen serà molt semblant a la dels gens virals, tant en temps com en nivells d'expressió (Fuerer and Iggo 2004; Hawkins and Hermiston 2001a; Lukashev *et al.*, 2005; Sauthoff *et al.*, 2002; Sova *et al.*, 2004; Zhu *et al.*, 2005). Finalment, si el transgèn s'incerta sota el control del promotor principal tardà de l'adenovirus, el transgèn citotòxic només s'expressarà un cop acabada la replicació del DNA viral. En el cas d'adenovirus oncolítics, que es repliquen només en cèl·lules tumorals, l'expressió del transgèn quedarà restringida a la cèl·lula tumoral.

En aquesta tesi ens varem plantejar augmentar la potència dels adenovirus oncolítics dissenyats al nostre laboratori mitjançant l'expressió de dos tipus de transgens diferents. Per una banda, vam voler analitzar l'efecte de l'expressió de dues glicoproteïnes fusogèniques de membrana diferents en la citotoxicitat dels adenovirus oncolítics. Per altra banda, vam analitzar l'efecte de l'expressió d'un enzim que degrada la matriu extracel·lular, la hialuronidasa, sobre la dispersió intratumoral del virus. En els següents apartats s'introdueix l'ús de les glicoproteïnes fusogèniques de membrana com a possibles transgens citotòxics en la teràpia del càncer, i l'àcid hialurònic com a possible diana terapèutica per incrementar la difusió de les drogues anticancerígenes pel tumor.

3. LES GLICOPROTEÏNES FUSOGÈNIQUES DE MEMBRANA (FMG)

Les glicoproteïnes víriques fusogèniques de membrana han emergit recentment com una nova classe de potents transgens terapèutics amb potencial utilitat en la teràpia gènica del càncer.

Les glicoproteïnes fusogèniques de membrana són utilitzades pels virus embolcallats per poder entrar a la cèl·lula diana. Aquestes proteïnes interaccionen amb receptors de la cèl·lula diana produint la fusió del virus amb la membrana cel·lular, i permetent l'entrada del nucli viral dins del citoplasma de la cèl·lula. Una conseqüència important d'aquest tipus d'infecció és la capacitat de la cèl·lula infectada que expressa les glicoproteïnes fusogèniques del virus a la seva membrana de fusionar-se amb les cèl·lules veïnes no infectades. El resultat d'aquesta fusió és la formació de grans masses multinucleades o sincitis, la disseminació del virus cèl·lula-cèl·lula, i la conseqüent mort de les cèl·lules que integren el sinciti. D'aquesta manera molts virus es disseminen pel cos i eviten ser ràpidament neutralitzats pel sistema immunitari.

3.1. EL MECANISME DE FUSIÓ DE MEMBRANES

Perquè es doni la fusió de membranes cal que dues membranes lipídiques separades entrin en contacte íntim i es fusionin formant una única membrana. La fusió de l'envolta del virus i la membrana lipídica de la cèl·lula està mediada per una o més glicoproteïnes de la superfície de l'envolta lipídica del virus. Segons la família de virus, la fusió es pot donar a pH neutre, després de la unió a receptors específics de la cèl·lula (*Paramyxoviridae*, *Retroviridae*, *Coronaviridae*), o a pH àcid, després de l'entrada dins la cèl·lula diana per endocitosi (*Orthomyxoviridae*, *Togaviridae* i *Rhabdoviridae*). Per alguns virus, com els retrovirus, perquè es doni la fusió es necessita una sola proteïna de l'envolta lipídica. En canvi, per altres virus, com els paramixovirus o els hespervirus, calen proteïnes virals addicionals (Taula 3). Per exemple, per la majoria dels Paramixovirus és necessària l'expressió conjunta de la proteïna de fusió (F) i la proteïna HN perquè es doni la fusió. La proteïna HN s'uneix als receptors de membrana de la cèl·lula diana i confereix a la proteïna F l'energia necessària per passar a una conformació fusogènica activa. Per alguns Paramixovirus, com la soca W3A de l'SV5, s'ha demostrat que en certes condicions, la proteïna de fusió F podria ser biològicament activa sense la coexpressió amb la proteïna HN (Horvath *et al.*, 1992).

Família	Proteïnes necessàries	Proteïnes de fusió <u>Subunitat fusogènica</u>	pH de fusió
<i>Orthomyxoviridae</i>	HA	HA1-S-S- <u>HA2</u>	Àcid
<i>Retroviridae</i>	Env	SU-S-S- <u>TM</u> SU/ <u>TM</u> ¹	Neutre
<i>Paramyxoviridae</i>	F i HN	F2-S-S- <u>F1</u>	Neutre
<i>Coronaviridae</i>	S	S1/ <u>S2</u>	Neutre
<i>Filoviridae</i>	GP	GP1-S-S- <u>GP2</u>	Àcid
<i>Togaviridae</i>	E1/E2	<u>E1/E2</u>	Àcid
<i>Rhabdoviridae</i>	G	<u>G</u>	Àcid
<i>Herpesviridae</i>	gB, gD, gH/L	<u>gB</u> , gH/gL	Neutre

Taula 3. Proteïnes fusogèniques de diferents famílies de virus envoltats. Informació sobre 8 de les 17 famílies de virus fusogènics coneguts. Taula adaptada de White i col. (White *et al.*, 2008) 1) SU/TM, S1/S2, etc. Denota que les subunitats estan associades, però no unides per ponts disulfur.

La majoria de proteïnes fusogèniques de la família dels Paramyxovirus són homotrímerns sintetitzats com a precursors inactius (F₀). Durant el transport a través del complex de Golgi, aquesta forma precursora és processada per endonucleases de tipus furina per donar lloc a una forma metastable on la subunitat petita F₂ es troba unida per ponts disulfur a la subunitat gran F₁. La subunitat F₁ presenta els elements claus presents en les proteïnes fusogèniques de classe I: Un pèptid de fusió, dues unitats heptamèriques repetides (HRA i HRB), i un domini transmembrana (Fig 6A). La característica principal d'aquestes proteïnes és una extensa regió hidrofòbica, anomenada pèptid de fusió. En la forma inactiva de la proteïna, el pèptid de fusió es troba amagat. L'activació de la proteïna F permet alliberar el pèptid de fusió que podrà inserir-se a la cèl·lula diana, produint la desestabilització de la bicapa lipídica necessària perquè es doni la fusió.

Per una altra banda, les proteïnes de l'envolta dels retrovirus de tipus C estan formades per dos components, la unitat de superfície (SU) i el component de transmembrana (TM). La SU és la responsable de la unió al receptor de la cèl·lula diana, i determina l'espectre de la cèl·lula hoste (Hunter and Swanstrom 1990). La SU està unida a la TM, que permet la unió del complex a la membrana de la cèl·lula hoste. A més, el TM juga un paper important en els esdeveniments que ocorren després de la unió de la proteïna amb el receptor i, més en particular, en la fusió. A la cua citoplasmàtica del TM trobem el pèptid R, un pèptid curt, que durant la maduració del viriò és alliberat del TM per les proteases víriques (Green *et al.*, 1981). Abans que el pèptid R sigui alliberat, la proteïna de l'envolta és incapaç de dur a terme la fusió de membranes.

Els factors més importants que poden influir en la capacitat fusogènica de les glicoproteïnes de membrana virals són: a) la presència de la glicoproteïna d'unió (HN), b) el tipus de cèl·lula en el qual s'expressin, c) que les cèl·lules presentin les proteases adequades, d) la presència de receptors adequats per les glicoproteïnes fusogèniques, e) la concentració de les FMG a la membrana cel·lular, f) la composició de la bicapa lipídica de la cèl·lula diana i (g) la temperatura.

3.2. L'ÚS DE FMG EN LA TERÀPIA GÈNICA DEL CÀNCER

En els últims anys, Bateman i col. han demostrat que la transfecció de plasmidis que codifiquen per diferents FMG desencadena una marcada citotoxicitat en diferents línies cel·lulars tumorals (Bateman *et al.*, 2000). Aquesta citotoxicitat és deguda a la generació de sincitis que es dona quan una cèl·lula transduïda que expressa la FMG es fusiona amb les cèl·lules veïnes que expressen els receptors corresponents. Aquest procés de formació de sincitis provoca un efecte adjacent 10 vegades més potent que la teràpia convencional amb ganciclovir/timidina quinasa (Bateman *et al.*, 2000; Diaz *et al.*, 2000). L'efecte citotòxic induït és depenent de la densitat cel·lular, independent de la divisió cel·lular, i no requereix administració de droga. L'administració de la forma hiperfusogènica de la proteïna de l'envolta del virus de la leucèmia de gibó (GALV) i de la combinació de les proteïnes F i H del virus del xarampió mitjançant l'expressió en plasmidis i vectors virals, va demostrar una gran activitat terapèutica en tumors humans xenògrafs en ratolins immunodeficients, confirmant el seu ús com a agents citotòxics (Bateman *et al.*, 2000; Diaz *et al.*, 2000).

3.3. L'ÚS DE FMG A PER LA IMMUNOTERÀPIA DEL CÀNCER.

A part de la citotoxicitat local induïda per les FMG mitjançant la formació de sincitis, diferents grups han demostrat que les FMG poden induir una resposta immunològica contra les cèl·lules tumorals no transduïdes (Errington *et al.*, 2006; Linardakis *et al.*, 2002). Aquesta resposta immunològica es genera degut a què el mecanisme de mort del sinciti és altament immunogènic (Bateman *et al.*, 2000; Bateman *et al.*, 2002). L'activació del sistema immunològic per les FMG és una estratègia especialment prometedora perquè permetria l'eliminació, no només del tumor primari, sinó també de les metàstasis, i donaria protecció enfront futures recaigudes.

Degut a les diferències en els receptors cel·lulars on s'uneixen la GALV i F/H entre espècies, aquestes proteïnes no poden fusionar cèl·lules murines. Per això, els estudis *in vivo* amb aquestes proteïnes han estat restringits a models humans xenògrafs en ratolins immunodeficients. L'estudi del paper de les FMG en la generació de vacunes en models de

ratolins immunocompetents s'ha realitzat principalment per transfecció de les cèl·lules tumorals amb la proteïna fusogènica del virus de l'estomatitis vesicular (VSV-G).

3.3.1. Mecanismes de mort dels sincitis.

El mecanisme pel qual les cèl·lules tumorals moren és crític per a l'atracció de cèl·lules professionals presentadores d'antígens, com les cèl·lules dendrítiques (DC) i els macròfags, al lloc de la infecció (Gough *et al.*, 2001; Melcher *et al.*, 1999; Reiter *et al.*, 1999). L'apoptosi és un procés de mort cel·lular molt ordenat, pel qual els fragments cel·lulars són fagocitats pels macròfags, i escapen de la detecció del sistema immunològic (Gough *et al.*, 2001; Savill and Fadok 2000). En canvi, la mort per mecanismes no apoptòtics associada a l'activació de programes de resposta a l'estrès és proinflamatòria i pot induir una resposta antitumoral a nivell sistèmic (Basu *et al.*, 2000; Gallucci *et al.*, 1999; Melcher *et al.*, 1999; Melcher *et al.*, 1998).

La citotoxicitat generada per la transfecció de proteïnes fusogèniques de membrana no és immediata. Els sincitis multinucleats es generen durant les primeres 24 hores després de la transfecció, com a estructures molt ben organitzades. A partir de les 48 hores post-transfecció, els sincitis comencen a morir gradualment per un procés que no presenta les característiques morfològiques, citogenètiques ni els marcadors bioquímics característics de l'apoptosi clàssica (Bateman *et al.*, 2000). La mort del sinciti s'associa amb fusió nuclear, condensació prematura dels cromosomes i depleció d'ATP severa (Bateman *et al.*, 2002). La mort final del sinciti és ràpida, i es dona per un procés força semblant a l'autofàgia (Dunn 1994; Liang *et al.*, 1999). El gran volum del sinciti, els senyals associats amb el cicle cel·lular i la depleció del metabolisme són alguns dels factors que provoquen que un sinciti ordenat i viable comenci a morir (taula 4).

Una característica molt rellevant dels últims estadis de vida dels sincitis és l'alliberació d'unes vesícules molt semblants als exosomes, anomenades sincitiomes. Les cèl·lules tumorals fusionades alliberen més vesícules exosòmiques que les cèl·lules normals en cultiu, o que les cèl·lules que moren per irradiació, xoc osmòtic, congelació i descongelació, o per efecte del sistema HSV-TK/ganciclovir. A més, aquests sincitiomes són qualitativament millors als exosomes alliberats mitjançant altres morts cel·lulars en la seva capacitat de transferir antígens derivats de tumor a les cèl·lules dendrítiques immadures per a la presentació creuada a les cèl·lules T. Finalment, la mort del sinciti esta associada a l'expressió de proteïnes de xoc tèrmic, com la hsp70 i la gp96, que alerten al sistema immune de la mort cel·lular, millorant la immunogenicitat tumoral (Melcher *et al.*, 1998; Tamura *et al.*, 1997).

Taula 4. Característiques de la mort induïda per l'expressió de FMG

No apoptòtica per marcadors clàssics:
 TUNEL, EM, ZVAD, tall per PARP, activació de la procaspasa 3, alliberament de citocrom 3,
 RPA per gens proapoptòtics
 Associada a un increment del volum cel·lular
 Marcadors d'autofàgia
 Depleció metabòlica: depleció d'ATP, inhibició de la fructosa.
 Inducció de proteïnes de xoc tèrmic: hsp70
 Vacuoles: alliberació de vesícules semblants als exosomes

3.3.2. L'ús de FMG en la preparació de vacunes pel càncer.

L'objectiu de les vacunes contra el càncer és induir una resposta humoral o cel·lular activa contra els antígens tumorals, que permeti l'eliminació de les cèl·lules tumorals disseminades i indueixi una memòria immunològica que eviti recaigudes. La principal font d'antígens tumorals usada per l'elaboració de vacunes és la pròpia cèl·lula tumoral, ja sigui extreta del propi pacient (vacunes autòlogues) o provinent de línies tumorals establertes (vacunes al·logèniques). Les vacunes al·logèniques tenen l'avantatge d'estar ben caracteritzades i de ser més estables i fàcils d'emmagatzemar. Diferents vacunes al·logèniques formades per múltiples línies tumorals amb un ampli espectre d'antígens s'han construït i estan sent analitzades en assajos clínics .

Una possible estratègia per augmentar la immunogenicitat de les vacunes de cèl·lules tumorals és la transfecció d'aquestes cèl·lules amb proteïnes fusogèniques de membrana, per generar vacunes de cèl·lules fusionades. La primera aproximació en aquesta línia fusionava cèl·lules al·logèniques de melanoma de ratolí, les K1735, amb cèl·lules tumorals autòlogues dels ratolins a tractar, les cèl·lules B16 (Linardakis *et al.*, 2002). La fusió de les cèl·lules es va realitzar per transfecció de les cèl·lules tumorals amb la proteïna de fusió VSV-G. L'administració subcutània de les cèl·lules tumorals fusionades en ratolins immunocompetents va ser terapèutica tant en protocols de prevenció d'establiment de tumors com en el tractament de tumors preestablerts.

Una altra estratègia similar és la generació de vacunes híbrides per fusió de cèl·lules tumorals amb cèl·lules dendrítiques. Aquesta estratègia presenta l'avantatge de permetre la presentació de diferents antígens tumorals (provinents de les cèl·lules tumorals) en molècules de classe I i classe II (provinents de les cèl·lules dendrítiques) directament a les cèl·lules T, per induir una resposta antitumoral específica mediada per limfòcits T citotòxics (Stuhler *et al.*, 1998; Stuhler and Walden 1994). Un treball presentat per Phan i col. demostra que la transfecció de cèl·lules tumorals amb FMG i la posterior barreja amb cèl·lules dendrítiques genera una petita població d'híbrids de cèl·lula tumoral i cèl·lula dendrítica, amb capacitat de viatjar als nòduls limfàtics.

Aquestes vacunes híbrides presenten una elevada capacitat de presentació d'antígens a les cèl·lules T *in vitro*, i són altament immunogèniques *in vivo* (Phan *et al.*, 2003).

3.4. COMBINACIÓ DE VIRUS ONCOLÍTIKS I FMG PEL TRACTAMENT DEL CÀNCER.

En els darrers anys, s'ha demostrat que l'expressió d'una FMG per un virus replicatiu pot augmentar l'efecte citotòxic del virus i millorar la seva distribució per la massa tumoral. Els primers resultats en aquesta línia van ser presentats per Li i col., que va construir un adenovirus salvatge que expressava la glicoproteïna de fusió del virus de la immunodeficiència humana (HIV-1) (Li *et al.*, 2001a). En el seu treball, demostraven que la formació de sincitis no només era compatible amb la replicació adenoviral sinó que millorava la dispersió del virus pel tumor i accelerava l'alliberament dels virions al medi extracel·lular. Més recentment, s'ha aconseguit clonar la glicoproteïna GALV en un herpes simplex de tipus I de replicació selectiva (Fu *et al.*, 2003; Simpson *et al.*, 2006), i la proteïna de fusió del virus de Newcastle en el virus de l'estomatitis vesicular (Ebert *et al.*, 2004). En tots els casos la proteïna de fusió va augmentar la potència citotòxica del virus.

Tot i el gran interès dels adenovirus replicatius com a eina terapèutica pel tractament del càncer, només la proteïna de fusió de l'HIV ha pogut ser clonada en un adenovirus replicatiu (Li *et al.*, 2001a). Aquest virus, però, té una aplicació restringida al tractament de limfomes, ja que la proteïna de fusió de l'HIV-1 necessita els receptors CD4 per induir la fusió. Per altra banda, Ahmed i col. van demostrar que la coinjecció d'un adenovirus oncolític amb un plasmidi que expressava la proteïna GALV millorava la potència oncolítica del vector *in vivo* (Ahmed *et al.*, 2003). Tot i els esforços dirigits a clonar aquesta proteïna fusogènica en un adenovirus replicatiu, l'elevada citotoxicitat de la proteïna GALV va fer que les línies cel·lulars transfectades amb el genoma viral morissin abans de que el virus es pogués generar a títols elevats (Diaz *et al.*, 2000).

3.5. LA GLICOPROTEÏNA F DEL PARAMYXOVIRUS SV5

El virus de simi 5 (SV5) és un membre de la família dels Paramixovirus. La proteïna F és un component de l'envolta del virus involucrada en la fusió del virus amb la cèl·lula i l'entrada a la cèl·lula diana a pH neutre. La glicoproteïna de fusió del Paramixovirus SV5, de la soca W3A, podria ser una FMG especialment interessant per ser expressada per un adenovirus oncolític per tres motius principals. El primer, és la seva capacitat de produir la fusió de membranes a pH neutre, al contrari de la proteïna de fusió del VSV, que necessita un pH àcid per produir la fusió. El segon, és la seva capacitat fusogènica en absència de la seva homoproteïna d'unió (HN) (Horvath *et al.*, 1992; Paterson *et al.*, 1984), al contrari del què ocorre amb la majoria dels paramixovirus,

que necessiten la combinació dels gens F i HN perquè es doni la fusió. Entre els diferents paramixovirus que requereixen la proteïna HN per induir la fusió, hi ha la soca WR de l'SV5 (Ito *et al.*, 1997). La seqüència aminoacídica de les proteïnes F de les dues soques d'SV5 (WR i W3A) només difereix en tres posicions: 22, 443 i 516 (Fig 6b) (Ito *et al.*, 1997; Paterson *et al.*, 1984). S'ha demostrat que la prolina present a la posició 22 de la proteïna F de la soca W3A és la responsable de la inducció de la fusió en absència de la proteïna HN. La capacitat de la proteïna F d'induir la fusió en absència de la proteïna HN és especialment rellevant en el context d'un adenovirus replicatiu que, al no tenir la regió E1 delecionada, té molt poca capacitat per incorporar transgens. Finalment, el gen que codifica per la glicoproteïna F té una llargada relativament petita (1800 pb), que permet que pugui ser inserit el genoma adenoviral sense sobrepassar el límit d'encapsidació.

Recentment, el nostre grup va poder clonar el gen de la glicoproteïna de fusió del paramixovirus SV5 de la soca W3A en el vector adenoviral no replicatiu Ad-F. L'expressió de la proteïna F per aquest virus va demostrar una gran capacitat fusogènica i de formació de sincitis, així com un efecte adjacent tan potent com la convencional teràpia ganciclovir/timidina quinasa (Gomez-Trevino *et al.*, 2003).

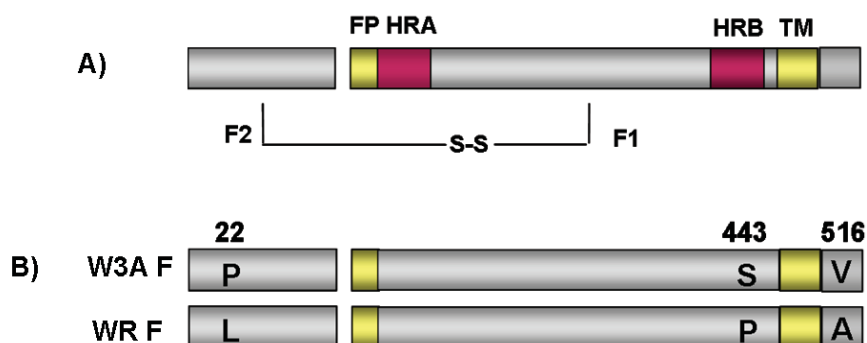


Figura 6. Representació esquemàtica de la proteïna F del paramixovirus SV5 (A) Proteïna F del paramixovirus SV5 després de l'activació del precursor F_0 a la forma biològicament activa F_1 - F_2 . Es mostra la posició del pèptid de fusió (FP), el domini transmembrana (TM), i les unitats HRA i HRB. **(B)** Diferències en la seqüència aminoacídica de la proteïna F de les soques W3A i WR del paramixovirus SV5. S'indica la posició i l'aminoàcid diferent per a cada soca. La fusió anòmala de la proteïna F de la soca W3A en absència de la proteïna HN recau en la prolina del residu 22.

3.6 LA GLICOPROTEÏNA DE L'ENVOLTA DEL VIRUS DE LA LEUCÈMIA DE GIBÓ

El virus de la leucèmia de gibó (GALV) pertany a la família dels retrovirus de tipus C. Aquest virus entra a la cèl·lula hoste per interacció amb el transportador de fosfat Pit-1, que es troba ubiquament expressat en les cèl·lules humanes. Diferents estudis han demostrat, prèviament a l'inici d'aquest treball, la capacitat d'una forma hiperfusogènica de la proteïna GALV de fusionar cèl·lules tumorals. En aquesta forma hiperfusogènica l'extrem C-terminal del pèptid R, del domini citoplasmàtic de la proteïna, ha estat deletat (Fielding *et al.*, 2000)(Fig. 7A)

La glicoproteïna GALV, a l'igual que la proteïna F del paramyxovirus SV5, és capaç d'induir la fusió de membranes a pH neutre. A més, la fusió mediada per les proteïnes de l'envolta dels retrovirus de tipus C no requereix la presència de la proteïna HN. Una de les desavantatges de la proteïna GALV per ser expressada per un adenovirus oncolític és que el gen que codifica per aquesta proteïna, és relativament llarg (2000 pb). Tot i així, la forma hiperfusogènica de la glicoproteïna GALV segueix sent interessant perquè està altament caracteritzada (Bateman *et al.*, 2000; Bateman *et al.*, 2002), per la seva elevada capacitat de fusionar cèl·lules tumorals humanes, formant sincitis de fins a 200 nuclis (Bateman *et al.*, 2000) (Fig. 7B), i pel seu demostrat augment de citotoxicitat al ser expressada per altres virus oncolítics (Ebert *et al.*, 2004; Fu *et al.*, 2003; Simpson *et al.*, 2006).

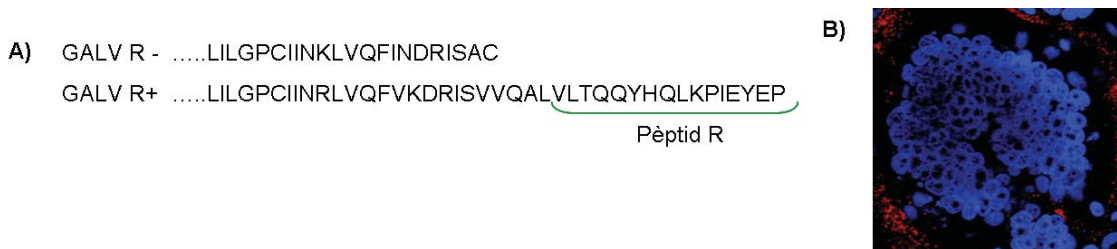


Figura 7. A) La seqüència aminoacídica de la regió C-terminal de la regió TM de la proteïna de l'envolta del retrovirus GALV. La seqüència GALV R+ correspon a la seqüència de la glicoproteïna amb el pèptid R, que no presenta capacitat fusogènica. En la seqüència GALV R- , el pèptid R i alguns aminoàcids de la cua plasmàtica TM han estat eliminats. **B)** La transfecció de cèl·lules tumorals amb la forma hiperfusogènica de la proteïna GALV induïx la formació de sincitis de fins a 200 nuclis (Bateman *et al.*, 2000).

4. LA MATRIU EXTRACEL·LULAR

4.1. EL TRANSPORT INTERSTICIAL EN ELS TUMORS SÒLIDS

El 85% dels càncers en humans són tumors sòlids. L'eficàcia de la teràpia anticancerígena en els tumors sòlids depèn de la correcta arribada i distribució de l'agent antitumoral al tumor. Perquè una droga pugui arribar a les cèl·lules tumorals després d'una administració sistèmica caldrà que la droga viatgi pels vasos sanguinis fins arribar al teixit tumoral, travessi la paret dels vasos i penetri a través de l'espai intersticial del tumor. L'èxit d'aquests processos dependrà de les propietats fisicoquímiques de la droga (grandària de la partícula, difusivitat, unió de la droga a macromolècules) i les propietats biològiques del tumor (vasculatura tumoral, components de la matriu extracel·lular, pressió intersticial, densitat de les cèl·lules tumorals, i estructura i composició del teixit) (Jang *et al.*, 2003).

L'espai intersticial dels tumors (delimitat per les parets dels vasos sanguinis, per un cantó, i les membranes de les cèl·lules tumorals, per l'altre) és significativament diferent a l'espai intersticial d'un teixit normal, i presenta unes característiques úniques. En primer lloc, en el teixit connectiu neoplàsic, la pressió intersticial es troba significativament incrementada, i el flux sanguini cap al centre del tumor es troba disminuït, dificultant l'arribada dels agents anticancerígens a les cèl·lules tumorals (Baumgartner *et al.*, 1998). Per una altra banda, el teixit tumoral presenta concentracions més elevades de matriu extracel·lular (ECM) que els teixits normals. Les cèl·lules tumorals i de l'estroma (principalment els fibroblasts) sintetitzen una matriu de col·làgens, fibres elàstiques, proteoglicans i àcid hialurònic que dificulten el transport de les macromolècules per l'espai intersticial. La matriu extracel·lular tumoral ha estat identificada com una causa important de resistència "fisiològica" al tractament per part de les cèl·lules tumorals. Alts nivells d'àcid hialurònic i glicosaminoglicans (GAG) s'associen amb una baixa conductivitat i una baixa convecció a l'espai intersticial, i són els principals causants de la resistència al transport de molècules en els tumors (Jang *et al.*, 2003). A més, alts nivells de col·lagen en la ECM també augmenten la resistència del tumor a les drogues, probablement mitjançant la unió i estabilització dels GAG de la ECM (Netti *et al.*, 2000).

La gran dificultat de les drogues anticancerígenes de penetrar per l'espai intersticial i arribar a la cèl·lula tumoral es pot veure incrementada en les noves teràpies anticancerígenes, com la teràpia gènica, la viroteràpia i la immunoteràpia, que es basen en l'ús d'agents terapèutics d'alt pes molecular (Netti *et al.*, 2000). Una possible estratègia per millorar la dispersió de les drogues pel tumor, i revertir la resistència de les cèl·lules tumorals als tractaments quimioteràpics és l'ús

d'enzims que degradin o disminueixin la producció de la matriu extracel·lular i disminueixin la pressió intersticial.

4.2. L'ÀCID HIALURÒNIC

L'àcid hialurònic (HA), un glicosaminoglicà (GAG) no sulfatat compost per unitats repetides de disacàrids, àcid D-glucorònic i N-acetil-D-glucosamina, és un dels principals components de la matriu extracel·lular (Fig. 8). En els animals vertebrats, l'HA és sintetitzat per tres hialuronan sintases diferents, però relacionades, HAS1, HAS2 i HAS3, i és degradat per uns enzims anomenats hialuronidases (Hyal) (Toole 2004). En els humans existeixen 6 gens que codifiquen per hialuronidases amb propietats i localitzacions diferents (Csoka *et al.*, 2001). Les isoformes Hyal1 i Hyal2 es troben en la majoria dels teixits, i la Hyal1 és la forma predominant en el plasma humà. La Hyal3 es localitza a la medul·la òssia i als testicles, però la seva funció no ha estat encara ben caracteritzada. Finalment, la hialuronidasa PH20 és troba altament expressada en els testicles, i està implicada en el procés de fertilització.

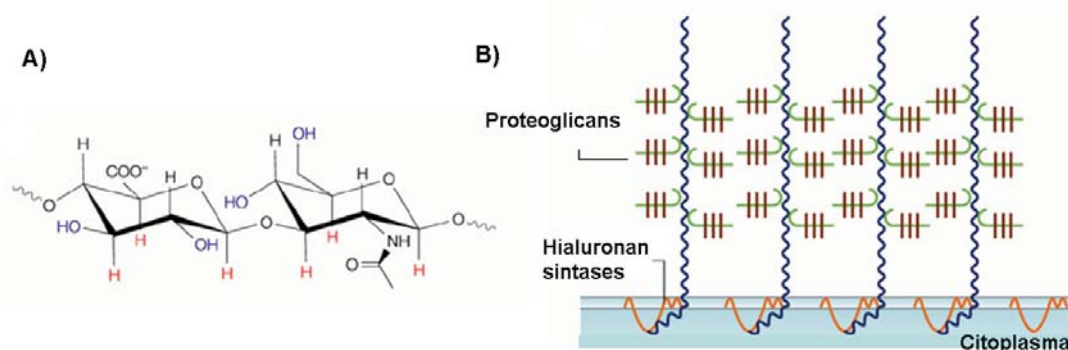


Figura 8. (A) Estructura de l'àcid hialurònic. L'HA està compost per repeticions de disacàrids d'àcid glucurònic i N-acetilglucosamina. (B) L'àcid hialurònic es mostra unit a la membrana plasmàtica retintut per les hialuronan sintases. L'HA és sintetitzat a la cara citoplàsmica de la membrana plasmàtica i projectat a través dels porus de la membrana cap a la superfície cel·lular. En l'espai extracel·lular, l'HA s'uneix a diferents molècules de proteoglicans que estan càrregades negativament i es repelen les unes a les altres. D'aquesta manera l'àcid hialurònic adquireix una configuració característica en forma de "raspall" (Toole 2004).

L'àcid hialurònic es troba ubiqüament expressat en els teixits dels animals vertebrats, tant en l'embrió com en l'adult, però les seves concentracions i funcions varien segons el teixit. En els teixits adults, com el teixit vitri, el fluid sinovial o la dermis, l'HA juga un paper clarament extracel·lular, gràcies a les seves propietats hidrodinàmiques úniques. En aquests teixits, l'HA du a terme diferents funcions fisiològiques com mantenir els teixits hidratats, el balanç hídric i la integritat dels cartílags. Per altra banda, durant alguns processos cel·lulars dinàmics, com la inflamació, la cicatrització, i la carcinogènesi, l'HA també interacciona amb les cèl·lules i influeix el seu comportament de diferents maneres (Toole 2001; Turley *et al.*, 2002). En aquest context, l'HA interacciona amb receptors de superfície cel·lulars, com el receptor CD44 i el receptor de la

motilitat mediada per àcid hialurònic (RHAMM) (Girish and Kemparaju 2007). Les interaccions de l'àcid hialurònic amb els receptors CD44 i RHAMM indueixen diferents respostes cel·lulars, incloent aquelles mediades per les tirosina quinases, la proteïna-quinasa C, la quinasa de les adhesions focals (FAK), la fosfatidil inositol 3 quinasa (PI3K), la proteïna quinasa activada per mitogens (MAP quinasa), el factor nuclear κ B i RAS (Ponta *et al.*, 2003; Thorne *et al.*, 2004; Turley *et al.*, 2002). A partir d'aquestes interaccions, l'HA regula processos com l'adhesió cel·lular, la migració i la proliferació. A més, les interaccions de l'HA amb els seus receptors, especialment amb el receptor CD44 regulen dos funcions cel·lulars que són especialment importants per la tumorigènesi: (a) la supervivència cel·lular, per activació de la via de senyalització de la PI3K-AKT i la inducció de la fosforilació de FAK i BAD (Hall *et al.*, 1994; Misra *et al.*, 2003; Sohara *et al.*, 2001) (b) la senyalització de la família ERBB, una família de proteïnes de transmembrana formada per quatre membres: ERBB1, ERBB2, ERBB3 i ERBB4, que presenten papers importants en la malignicitat de les cèl·lules tumorals (Bourguignon *et al.*, 2001; Wobus *et al.*, 2002). La inhibició de les interaccions de l'àcid hialurònic amb el receptor CD44 mitjançant l'ús d'oligòmers d'HA que desplacin l'HA dels seus receptors per competició, o mitjançant l'ús de proteïnes d'unió a l'HA (HABP), inhibeix la via de PI3K-AKT (constitutivament activada en les cèl·lules tumorals), i inhibeix la senyalització downstream d'ERBB2 (Fig. 9).

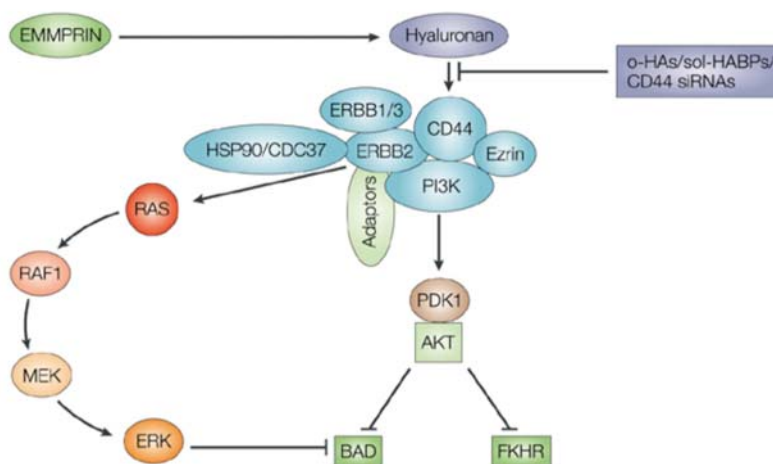


Figura 9. Senyalització induïda pel receptor CD44 i ERBB2. L'àcid hialurònic indueix la formació d'un complex que conté el receptor CD44, ERBB2, Ezrin, la PI3K i la proteïna de xoc tèrmic 90/CDC37 (una xaperona necessària per l'activitat d'ERBB2). La formació del complex activa ERBB2, que promou la supervivència cel·lular mitjançant l'activació de la PI3K/AKT i les vies de senyalització dependents de la proteïna quinasa activada per mitogen (MEK) i la quinasa regulada per senyals extracel·lulars ERK. Les dues vies fosforilen la proteïna proapoptòtica BAD i la inactiven. L'inductor de metaloproteïnases de la matriu extracel·lular (EMMPRIN) estimula la síntesi d'HA i per tant indueix aquestes mateixes senyals de transducció. En canvi, la inhibició de la interacció de l'HA amb el seu receptor, mitjançant oligòmers d'HA (o-HA), proteïnes d'unió a l'HA solubles (sol-HABP) o RNA's d'interferència (siRNAs) contra el receptor CD44 causen la dissociació d'aquest complex, i inhibeixen l'activació d'ERBB2.

4.2.1. Àcid hialurònic, hialuronidases i càncer.

L'àcid hialurònic es troba sobreexpressat en diferents tipus de càncer, com els de còlon, pit, pròstata, bufeta i pulmó, i els nivells d'HA sovint correlacionen amb comportaments invasius i metàstasis (Auvinen *et al.*, 2000; Hautmann *et al.*, 2001; Knudson 1996; Lokeshwar *et al.*, 2001; Pirinen *et al.*, 2001; Ropponen *et al.*, 1998; Setala *et al.*, 1999). L'expressió elevada d'HA en alguns tumors, com el de còlon i pit, és un factor pronòstic desfavorable (Auvinen *et al.*, 2000; Knudson 1996; Ropponen *et al.*, 1998; Setala *et al.*, 1999). Depenent del tipus de càncer l'HA pot ser sintetitzat per les cèl·lules de l'estroma, les cèl·lules tumorals, i per ambdós tipus cel·lulars (Franzmann *et al.*, 2003). En els teixits tumorals, l'HA afavoreix les metàstasis induint la migració i l'adhesió de les cèl·lules tumorals i oferint protecció contra la vigilància del sistema immunitari (Hayen *et al.*, 1999; Hobarth *et al.*, 1992; Itano *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2001b). Manipulacions de les concentracions d'HA o de les seves interaccions amb els receptors de membrana poden alterar significativament les vies de senyalització implicades en l'oncogènesi, i poden alterar el curs de la progressió de diferents tipus tumorals en models d'experimentació animal. Un increment de la producció d'HA per transfecció de cèl·lules tumorals amb cDNA que codifiquen per HAS1, HAS2 i HAS3 incrementa el creixement tumoral i les metàstasis en models xenògrafs de fibrosarcoma, i carcinomes de pròstata, còlon i mama (Itano *et al.*, 1999; Jacobson *et al.*, 2002; Kosaki *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2001a). Per altra banda, una reducció de la producció d'HA per inhibició de les hialuronan sintetases amb mRNA *antisense* inhibeix el creixement tumoral en un model de carcinoma de pròstata (Simpson *et al.*, 2002). En aquesta mateixa línia, la sobreexpressió experimental de hialuronidases o l'administració de hialuronidasa soluble a concentracions elevades inhibeix el creixement tumoral de carcinomes de còlon i mama en models xenògrafs (Jacobson *et al.*, 2002; Shuster *et al.*, 2002).

Per contra, alguns treballs indiquen que la sobreexpressió de hialuronidases, més que inhibir la progressió tumoral, la promou. La hialuronidasa Hyal1 es troba sobreexpressada en càncers de bufeta, pròstata i cap i coll (Franzmann *et al.*, 2003; Hautmann *et al.*, 2001; Lokeshwar *et al.*, 2001; Lokeshwar *et al.*, 1999) i en alguns tipus tumorals els nivells de Hyal1, juntament amb els nivells d'HA, són un indicador fiable de la malignicitat del tumor. Per una altra banda, en un treball presentat per Lokeshwar i col, la generació de transfectants estables de cèl·lules de càncer de pròstata que expressen nivells baixos, moderats o alts de Hyal1 suggereix un rol dual de la hialuronidasa durant la progressió tumoral, que depèn de la concentració de l'enzim (Lokeshwar *et al.*, 2005). Segons aquest treball, concentracions de Hyal1 similars a les que es troben en els teixits tumorals (14-40 miliunitats/10⁶ cèl·lules) correlacionen amb progressió del creixement tumoral, invasió i angiogènesi. En canvi, cèl·lules que expressen nivells de hialuronidasa superiors

a 100 miliunitats /10⁶ cèl·lules (nivells que no s'expressen de forma natural en teixits tumorals) presenten una inhibició del creixement tumoral deguda a una inducció de l'apoptosi.

Per altra banda, la degradació de l'HA d'alt pes molecular per les hialuronidases dóna lloc a productes de baix pes molecular que també es troben sobreexpressats en els pacients amb càncer (Kumar *et al.*, 1989). A diferència de l'HA d'alt pes molecular, que és antiangiogènica, aquests petits fragments d'HA estimulen la proliferació de les cèl·lules endotelials, i promouen la neovascularització en tumors. Els fragments d'HA a més, estimulen la producció de metaloproteïnases (MMP) i en algun tipus de cèl·lules tumorals promouen la migració cel·lular.

El gruix de dades que suporta el rol de l'HA en la progressió tumoral és molt convincent, i indica que aquesta molècula pot ser una diana terapèutica molt interessant (Toole 2004). Tot i així, la relació entre els nivells d'HA, els productes de degradació d'aquest, i els nivells de hialuronidases amb la progressió i malignicitat tumoral és complexa i varia segons el tipus de tumor.

4.3 LES HIALURONIDASES.

L'any 1928, Duran i Reynals va observar que els extractes dels testicles dels mamífers i altres teixits contenien un "factor de dispersió" que facilitava la difusió de colorants i vacunes antivirals injectades subcutàniament. Més tard, aquest "factor de dispersió" va ser caracteritzat com a enzim de degradació de l'àcid hialurònic i anomenat hialuronidasa. La hialuronidasa ha estat identificada com el factor de dispersió dels verins de serps, abelles, escorpins i aranyes (Girish and Kemparaju 2006; Markovic-Housley *et al.*, 2000; Morey *et al.*, 2006; Nagaraju *et al.*, 2006), i també és secretada per alguns bacteris patògens com els estreptococcus β -hemolítics. La hialuronidasa dels verins permet la difusió de les toxines des del punt d'injecció fins la circulació sistèmica, gràcies a la degradació de l'àcid hialurònic i la conseqüent pèrdua d'integritat de la ECM dels teixits connectius tous que envolten els vasos sanguinis.

Les hialuronidases poden classificar-se segons el pH que necessiten per dur a terme la seva activitat enzimàtica. En el grup de les hialuronidases actives a pH àcid (pH entre 3 i 4) trobem les hialuronidases humanes Hyal1, Hyal2 i Hyal3. Dins del grup de les hialuronidases que actuen a pH neutre (pH entre 5 i 8) trobem les hialuronidases dels verins de serp i abella, i la hialuronidasa dels testicles dels mamífers, la PH20.

4.3.1. La hialuronidasa dels testicles dels mamífers: la PH20

Dins del grup de les hialuronidases dels mamífers, la hialuronidasa dels testicles, la PH20, ha estat àmpliament estudiada i caracteritzada. La hialuronidasa PH20 (també anomenada SPAM-1) és una hialuronidasa testicular important durant la fertilització de l'oòcit per part de l'espermatozoide. La PH20 es troba ancorada a la membrana plasmàtica i a la membrana acrosomal interna dels espermatozoides i confereix a l'espermatozoide la capacitat per penetrar a través de la ECM de les cèl·lules del cúmulus (rica en HA) per arribar a la zona pel·lúcida de l'oòcit. Durant la reacció acrosomal, part de les hialuronidases ancorades a la membrana de l'espermatozoide són processades enzimàticament per donar lloc a una forma soluble de la proteïna, que presenta activitat hialuronidasa a pH àcid. La funció de la forma soluble de la hialuronidasa PH20 durant la fertilització és encara incerta (Cherr *et al.*, 2001).

La propietat de la hialuronidasa PH20 d'accelerar el transport de substàncies exògenes i endògenes dins d'un teixit ha estat àmpliament utilitzada a la clínica durant anys. Al principi, la hialuronidasa PH20 es va aplicar com a suplement en les infusions subcutànies per obtenir una absorció més ràpida de la infusió. També va ser administrada amb altres drogues, com antibiòtics i anestèsics locals per accelerar la seva reabsorció. Gràcies a la seva capacitat de liquidar secrecions viscoses la PH20 es va utilitzar per la infusió de grans abscessos i pel tractament d'edemes i hematomes post-traumàtics. A més, la hialuronidasa PH20 s'ha utilitzat per reduir l'extensió de teixit danyat després de l'extravasació involuntària de solucions parenterals, com antibiòtics, agents quimioterapèutics o nutricions parenterals (Baumgartner *et al.*, 1998; Girish and Kemparaju 2007).

Per una altra banda, la hialuronidasa testicular ha estat utilitzada per millorar l'eficiència de les drogues quimioteràpiques. El primer resultat en aquesta línia demostrava que l'administració de hialuronidasa aplicada a prop del tumor, en un model murí de carcinoma mamari, augmentava l'eficàcia de la doxorubicina (Beckenlehner *et al.*, 1992). Un segon estudi analitzava l'aplicació subcutània de vinblastina a prop d'un melanoma trasplantat amb i sense hialuronidasa. La teràpia amb vinblastina com a agent únic no va ser efectiva en el xenotrasplant, mentre la combinació de vinblastina i hialuronidasa va assolir resultats curatius (Spruss *et al.*, 1995). A més, la capacitat de la hialuronidasa de revertir la resistència de les cèl·lules tumorals a la quimioteràpia va ser testada en un model tridimensional d'esferoides de cèl·lules de tumors mamaris (EMT-6) *in vitro*. La dispersió dels esferoides amb hialuronidasa soluble va ser capaç de revertir la resistència adquirida d'aquests esferoides a la ciclofosfamida. Aquest efecte es va reproduir en ratolins immunocompetents amb tumors EMT-6 implantats intraperitoneals i tractats amb ciclofosfamida i hialuronidasa (Croix *et al.*, 1996).

En els darrers anys, la hialuronidasa s'ha administrat en diferents estudis clínics de fase I i fase II com adjuvant de la quimioteràpia. En aquests estudis, la hialuronidasa ha millorat els resultats clínics de diferents drogues anticancerígenes en pacients amb melanoma, sarcoma de kaposi, càncer de cap i coll i metàstasis colorectals a fetge (Civalleri *et al.*, 1997; Klocker *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 1997; Spruss *et al.*, 1995). L'administració de la hialuronidasa en pacients, per via intramuscular, intravenosa o intravesical, ha estat ben tolerada en general, i a excepció d'algunes reaccions al·lèrgiques reversibles, no s'han detectat efectes secundaris importants (Baumgartner *et al.*, 1998; Eikenes *et al.*, 2005). Segons les especificacions indicades en el prospecte d'una preparació clínica de la hialuronidasa (Wydase®), L'LD₅₀ de la hialuronidasa no va poder ser determinada ni en gats ni en gossos, tot i l'administració de dosis creixents via oral o via endovenosa. A més, l'ús de hialuronidasa com a complement a la quimioteràpia no s'ha relacionat amb l'aparició de metàstasis ni en ratolins ni en humans (Klocker *et al.*, 1995; Shuster *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 1997; Spruss *et al.*, 1995).

El mecanisme pel qual la hialuronidasa augmenta l'efecte terapèutic de les drogues quimioterapèutiques no se sap del cert, però en el seu moment es va atribuir principalment a la disminució de les barreres d'adhesió cel·lular (Croix *et al.*, 1996), la millora de la conductivitat hidràulica (Eikenes *et al.*, 2005), la disminució de la pressió intersticial (Brekken *et al.*, 2000a; Eikenes *et al.*, 2005) i una conseqüent millora en la penetració de la droga en el tumor (Baumgartner *et al.*, 1998). Més tard, l'observació que l'àcid hialurònic estimulava les vies de senyalització relacionades amb la supervivència cel·lular va portar a investigar més a fons el possible rol de l'àcid hialurònic en la resistència a múltiples drogues. La sobreproducció d'àcid hialurònic va resultar induir la resistència a drogues quimioteràpiques en cèl·lules inicialment quimiosensibles. A més, la inhibició de les vies de senyalització induïdes per l'HA van revertir la resistència a diferents agents quimioteràpics, com la doxorubicina, el taxol, la vincristina i el metotrexat (Misra *et al.*, 2003).

Tot i que diferents treballs suggereixen que la matriu extracel·lular impedeix la correcta distribució del virus pel tumor, a l'inici d'aquesta tesi no hi havia cap treball que analitzés l'efecte de la hialuronidasa sobre la dispersió intratumoral d'adenovirus replicatius.

Objectius

Els adenovirus de replicació condicionada són uns bons candidats pel tractament de tumors sòlids malignes. Els resultats a dia d'avui, demostren un bon perfil de seguretat després de l'administració a pacients per diferents vies. A més, l'administració intratumoral o intracavital d'adenovirus oncolítics ha demostrat efectes terapèutics, i el sinergisme amb la quimioteràpia, fa que el tractament amb adenovirus sigui encara més prometedor. De totes maners, l'eficàcia terapèutica després de l'administració sistèmica ha estat molt moderada. La inhabilitat dels virus de distribuir-se eficientment per la massa tumoral, i la baixa potència, són uns dels principals obstacles que cal superar perquè els adenovirus de replicació condicionada representin una opció terapèutica real.

L'objectiu general d'aquesta tesi és:

Desenvolupar adenovirus oncolítics que administrats via sistèmica siguin capaços de distribuir-se correctament per la massa tumoral, i que presentin la potència oncolítica necessària per eradicar la totalitat del tumor.

En base a aquest objectiu general s'han valorat dues aproximacions diferents: L'expressió de FMG com a estratègia per augmentar la potència oncolítica dels adenovirus, i l'expressió de la hialuronidasa PH20 com a estratègia per millorar la distribució dels adenovirus pel tumor.

Han estat objectius concrets d'aquesta tesi:

- Construir un adenovirus replicatiu que expressi el gen d'una FMG sota el promotor principal tardà de l'adenovirus, i confirmar si l'expressió de la FMG augmenta la capacitat citotòxica de l'adenovirus replicatiu, *in vitro* i *in vivo*.
- Construir un adenovirus replicatiu que expressi el gen de la hialuronidasa sota el promotor principal tardà de l'adenovirus, i confirmar si l'expressió de la hialuronidasa millora la distribució de l'adenovirus per la massa tumoral, i l'eficàcia antitumoral en general.
- Avaluar diferents estratègies per tal d'acomodar l'expressió dels anomenats transgens en el genoma d'adenovirus oncolítics, i valorar l'eficàcia antitumoral dels adenovirus oncolítics armats.

Materials i mètodes

1. TÈCNiques RELACIONADES AMB LA MANIPULACIÓ DE BACTERIS

L'amplificació de plasmidis per a obtenir grans quantitats de DNA requereix que aquests continguin un origen de replicació que els permeti replicar-se en una soca bacteriana. Per la selecció dels plasmidis d'interès, els plasmidis porten incorporat un gen de resistència a un antibiòtic (kanamicina o ampicil·lina), que permet el creixement de els bacteris que contenen el plasmidi en presència de l'antibiòtic. En aquest treball s'han utilitzat les soques bacterianes d'*Escherichia coli* BJ5183, DH5 α , SCC101 i HB101. Per a poder amplificar els diferents plasmidis d'interès, aquests es van introduir per transformació en una de les soques bacterianes, a les quals, s'havia induït prèviament, l'estat de competència.

1.1. PREPARACIÓ DE BACTÈRIES COMPETENTS

L'estoc mare de bacteris es troba conservat a -80°C en forma de glicerinat. Per la preparació de cèl·lules competents, es rasca el glicerinat mare amb una punta de pipeta i es deixa créixer tota la nit a 37°C en 10 ml de LB (1% Triptona, 0.5% d'extracte de llevat, 0.5% NaCl) en un falcon de 50 en agitació. El dia següent, els 10 ml de precultiu es fan créixer en 1 L de LB a 37°C en agitació fins a obtenir un cultiu amb una densitat òptica a 600 nm de 0,6-0,7. En aquest moment, la solució bacteriana es redistribueix en ampolles de 250 ml, aptes pel seu ús a la centrifuga SORVAL, que es submergeixen en un bany d'aigua i gel durant 40 min, per tal d'aturar el creixement bacterià. A partir d'aquest moment, la manipulació dels bacteris es realitza sempre a 4°C. A continuació, els bacteris es centrifuguen a 4000 g durant 15 min a 4 °C a la SORVALL. El sobrenedant es descarta, i el pelet bacterià es renta amb aigua miliQ refrigerada a 4°C. La centrifugació i el rentat amb aigua es repeteixen de la mateixa manera tres vegades més, però l'última resuspensió es fa amb 45 ml d'aigua amb un 10% de glicerol. Les cèl·lules es tornen a centrifugar, una quarta vegada, i el pelet final bacterià es resuspén amb 3 ml d'aigua amb un 10% de glicerol. A continuació es mira la OD de la suspensió final bacteriana a 600 nm, per dilució de 10 μ l de la suspensió en 990 μ l d'aigua. La OD de la dilució 1/100 ha de ser propera a 1 (OD=1 equival aproximadament a 2.5×10^8 cèl·lules/ml). Finalment, la suspensió bacteriana s'aliqota en neu carbònica en alíquotes de 50 μ l, que s'emmagatzemen al congelador de -80°C fins al moment del seu ús.

1.2. TRANSFORMACIÓ DE LES BACTERIES COMPETENTS

En aquest treball s'han utilitzat dos mètodes per transformar les cèl·lules competents, per xoc tèrmic i per electroporació. El mètode del xoc tèrmic s'ha utilitzat per transformar les lligacions en les cèl·lules bacterianes comercials, HB101 (Takara), degut a que es requeria una

alta eficiència de transformació. Per la transformació de la resta de soques bacterianes, preparades al laboratori, s'ha emprat el mètode de transformació per electroporació.

1.2.1. Transformació per xoc tèrmic.

Per a dur a terme la transformació, una alíquota de les cèl·lules comercials HB101 (100 µl) es descongelava en gel i s'hi afegien 2 µl d'una dilució 1/5 o 1/20 de la lligació en aigua. La barreja s'incubava 30 minuts en gel, i a continuació es realitzava el xoc tèrmic per incubació en un bany a 42°C durant 45 segons. Ràpidament, les cèl·lules es tornaven a posar en gel durant 5 minuts. Tot seguit, les cèl·lules es resuspenien en 300 µl de SOC (medi de cultiu comercial que s'adjuntava al comprar els bacteris comercials), i s'incubaven durant 1 h en agitació a 37°C. Finalment, la suspensió es plaquejava amb plaques de LB amb l'antibiòtic de selecció adequat per a cada plasmidi.

1.2.2. Transformació per electroporació.

Per a dur a terme la transformació per electroporació, les alíquotes de cèl·lules competents (50 µl) es descongelaven en gel i s'hi afegien de 10 pg a 25 ng de DNA plasmídic en un volum final de 2 µl. La barreja s'incubava 5 minuts en gel, i s'afegia a unes cubetes d'electroporació prèviament refrigerades en gel. A continuació es realitzava l'electroporació mitjançant l'ús d'un electroporador (Electro Cell Manipulator™ ECM 630), amb les següents condicions: 50 µF, 1500 V i 125 Ω. L'electroporació es donava com a bona quan el pols era superior a 5 mseg. Tot seguit, les cèl·lules es resuspenien en 300 µl de LB, i s'incubaven durant 1 h en agitació a 37°C. Finalment, la suspensió es plaquejava amb plaques de LB amb l'antibiòtic de selecció adequat per a cada plasmidi.

1.3. AÏLLAMENT DE DNA PLASMÍDIC

Els protocols emprats en aquest treball per l'aïllament de DNA plasmídic d'*E.coli* es basen en un mètode de lisis alcalina amb SDS. Es van realitzar a partir de cultius saturats crescuts en LB que contenia l'antibiòtic corresponent a la resistència del plasmidi. S'han realitzat preparacions de DNA a petita i a gran escala.

1.3.1. Preparacions de DNA plasmídic a petita escala

Les minipreparacions de DNA plasmídic es van realitzar seguint una adaptació del protocol descrit per H.C.Birnboim i J.Doly (Birnboim and Doly 1979). Aquest procediment permet

obtenir petites quantitats de DNA plasmídic (de 20-50 µg). El procediment a seguir es detalla a continuació.

Breument, s'inocula una colònia crescuda en una placa de LB amb antibiòtic en 2 ml de LB i es creix durant tota la nit. El dia següent, es pren una alíquota de 1,5 ml de cultiu bacterià saturat i es centrifuga a 13000 rpm durant 1 min. El pelet bacterià es resuspén, amb l'ajuda del vòrtex, amb 200 µl de la solució 1 (25 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA , 50 mM glucosa) refrigerada a 4°C. Tot seguit, s'afegeixen 200 µl de solució 2 (SDS 1%, NaOH 0.2 M), acabada de preparar, i la mescla es barreja per inversió. Finalment, s'afegeixen 200 µl de la solució 3 (3 M acetat de potassi, 11.5% àcid acètic) refrigerada i la mescla s'inverteix fins que el precipitat blanc que apareix sigui homogeni. La mescla s'incuba 5 minuts en gel i es centrifuga a 13000 rpm durant 15 min. A continuació, es recull el sobrenedant transparent, sense agafar el pelet blanc on es troba el DNA cel·lular, les proteïnes i l'SDS. El sobrenedant es barreja amb 2 V d'etanol, i la mescla es deixa reposar 15 minuts a temperatura ambient. A continuació, el DNA plasmídic es precipita per centrifugació durant 10 minuts a 13000 rpm. El sobrenedant es descarta, i el pelet es renta amb etanol al 70%. La barreja es centrifuga 5 minuts més a 13000 rpm, el sobrenedant es descarta i el pelet de DNA es deixa assecar durant 10 minuts. Finalment, el DNA plasmídic es resuspén amb 50 µl de TE amb RNasa (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 0.1mg/ml RNasa).

1.3.2. Preparacions de DNA plasmídic a gran escala

La maxipreparació de DNA permet l'obtenció de grans quantitats de DNA plasmídic (≤100 µg) de gran puresa. Les maxipreparacions es van preparar a partir de 200 ml de cultiu bacterià saturat, amb el quit comercial d'Invitrogen "PureLink™ HiPure Plasmid Filter Purification Kits", segons les indicacions del fabricant.

2. TÈCNiques RELACIONADES AMB LA MANIPULACIÓ DE LLEVATS

En aquest treball, la majoria de recombinacions homologues s'han realitzat en llevats, degut a l'elevada freqüència de recombinació que presenten aquests organismes. Per tal de poder amplificar els plasmidis en llevats, caldrà introduir en els plasmidis emprats els elements necessaris per la replicació en llevats, així com un marcador de selecció que estigui mutat o deletat en la soca de llevats emprada. En aquest treball, la seqüència CAU ha estat introduïda en tots els plasmidis que s'han requerit per la construcció d'adenovirus recombinants. La seqüència CAU consta d'un Centromer, un origen de replicació en llevats, o seqüència de recombinació autònoma (ARS), i el gen URA3 (gen deletat en la soca de llevats emprada), que codifica per l'enzim orotidina-5'-fosfat decarboxilasa, necessari per la biosíntesi d'uracil. Els plasmidis obtinguts per recombinació homòloga en llevats són de baixa còpia (1-3 còpies/cèl·lula) i per tant la seva amplificació s'haurà de dur a terme en soques bacterianes. Així doncs, aquests plasmidis, a part de contenir el gen CAU, hauran de contenir l'origen de replicació bacterià i el gen de resistència a antibiòtics.

Els llevats emprats en aquest treball pertanyen a la soca de *Saccharomyces cerevisiae* YPH857. Aquesta soca ha estat modificada genèticament, de manera que presenta mutacions o deletions de gens implicats en la síntesi de diferents aminoàcids (ura3-53, lys2-801, ade2-101, his3-Δ200, trp1-Δ63, leu2-Δ1cyh2R). Aquestes mutacions fan que els llevats de la soca YPH857 siguin incapaços de créixer en medis deficientes en uracil, lisina, adenina, histidina, triptòfan i leucina. La selecció dels llevats amb els plasmidis recombinants es farà en medis que continguin tots aquests aminoàcids, a excepció de l'uracil.

Per a poder realitzar les recombinacions homologues, els dos DNA's d'interès es van transformar linealitzats a les cèl·lules de llevat, a les quals, s'havia induït prèviament, l'estat de competència. L'homologia necessària perquè es doni la recombinació homòloga en llevats entre un plasmidi linealitzat i el fragment a inserir de forma eficient és de 40 pb a cada extrem.

2.1. PREPARACIÓ DE LLEVATS COMPETENTS

L'estoc mare de llevats de la soca YPH857 es conserva congelat a -80°C en forma de glicerinat. Quan es va necessitar fer recombinacions homologues en llevats, es va rascar el glicerinat amb una punta de pipeta i es va dibuixar una estria en una placa d'agar amb medi ric pel creixement de bacteries, el YPDA⁺⁺. Els llevats, es van deixar créixer a 30°C durant tres dies, i la placa amb el creixement de llevats es va guardar a 4°C. Cada dues setmanes, les plaques

s'eliminaven, i es feien créixer llevats de nou en una altra placa, per tal els llevats estiguessin sempre frescos.

A l'hora de fer els llevats competents, es picava una colònia de llevats de la placa de YPDA⁺⁺ i es feia créixer durant tota la nit en 5 ml de YPDA⁺⁺ líquid a 30°C en agitació, a 200 rpm. El dia següent es mesurava la OD d'una dilució 1/10 del cultiu ($OD_{600}=1$ equival a 1.5×10^7 cèl·lules/ml) i es preparava una suspensió de llevats que tingues una $OD=0.15$ en un volum de 50 ml ($OD_{600}=0.15$ equival a 2.25×10^6 cèl·lules/ml). La suspensió es deixava créixer a 30°C i 200 rpm fins obtenir una $OD_{600}=0.4$ to 0.9 (aprox. 5 h). A continuació, la suspensió de llevats es traspassava a un falcon de 50 i es centrifugava a 3000 g durant 5 minuts en una centrifuga HermleZ383k a temperatura ambient. El sobrenedant es descartava, i el pelet es rentava amb 25 ml d'aigua miliQ autoclavada. El rentat es tornava a centrifugar a 3000 g durant 5 min, el sobrenedant es descartava, i el pelet es resuspenia en 1 ml d'aigua. La suspensió es traspassava a un ependorf de 1.5 ml i es centrifugava 30 segons a 5000 rpm en una microcentrífuga. El sobrenedant es tornava a descartar, i el pelet es resuspenia amb aigua a un volum final de 1 ml. A partir d'aquesta suspensió, es feien alíquotes de 100 μ l (10^8 cèl·lules), que es centrifugaven durant 30 segons a 5000 rpm en una microcentrífuga. El sobrenedant es descartava, i el pelet de llevats ja estava disponible per ser transformat amb el DNA.

2.2. TRANSFORMACIÓ DE LLEVATS PEL MÈTODE LIAC/SS-CARRIER DNA/PEG.

Per tal de transformar els llevats competents, s'ha utilitzat el mètode del LiAc/SS-carrier DNA/PEG descrit per Daniel Gietz i Robin A. Woods (Gietz and Woods 2002). Aquest mètode es basa en l'ús de l'acetat de liti per a desestabilitzar les membranes del llevat, l'ús d'un DNA de cadena simple (ss-carrier DNA) per a bloquejar possibles zones repetides on es podria unir de forma inespecífica el DNA a transformar, i en la introducció del DNA mitjançant un xoc tèrmic.

Breument, abans de tot, es bull el DNA de cadena simple (DNA de l'esperma de salmó), durant 5 min a 95°C. A continuació, per cada transformació, es prepara una barreja que contingui:

PEG (50%, w/v)	240 μ l
Acetat de liti (1M)	36 μ l
DNA de salmó (10mg/ml)	10 μ l
Plasmidis de DNA + H ₂ O (miliQ)	74 μ l

La barreja s'afegeix al pelet de llevats competents acabats de preparar, es barreja amb l'ajuda del vòrtex, i s'incuba durant 40 minuts a 42°C. Passat aquest temps, la barreja es centrifuga 30 s a 5000 rpm i s'elimina el sobrenedant. El pelet de llevats es resuspén amb 100 μ l d'aigua i es plaqueja en una placa d'agar amb medi SC Ura-. Les plaques s'incuben a 30°C

durant dos dies, passats els quals apareixeran a la placa unes colònies petites i blanques que correspondran als plasmidis recombinants.

2.3. AÏLLAMENT DE DNA PLASMÍDIC

L'aïllament del DNA plasmídic es va realitzar a partir de cultius de llevats crescuts a partir d'una colònia durant 20 h a 30°C i 200 rpm en 2ml del medi de selecció líquid SC Ura-. Breument, es traspassen 1,5 ml del cultiu a un ependorf de 1,5 ml i es centrifuguen durant 5 segons a màxima velocitat. El sobrenedant es descarta, i el pelet de llevats es resuspén amb 400 µl d'una solució que conté: 2% Tritó-X100, 1% SDS, 0,1 M NaCl, 10mM TrisHCl pH 8.0, 1mM EDTA. A continuació, s'hi afegeixen 400 µl d'una solució fenol-cloroform i 0,3g de boles de vidre (glass beads, unwashed, Sigma). La mescla es barreja durant 2 minuts en un vòrtex vertical a 4°C i es centrifuga 5 min a 12000 rpm. El sobrenedant es traspassa a un ependorf nou i el DNA plasmídic es precipita amb 2 V d'etanol al 2% d'acetat sòdic, durant 30 min a -20°C. Passat aquest temps, el DNA plasmídic es centrifuga durant 20 min a 13000 rpm a temperatura ambient. El sobrenedant es descarta, i el pelet es renta amb etanol al 70%. Finalment, el pelet de llevats es resuspén en 40 µl d'aigua.

Per tal d'amplificar el DNA plasmídic, es transformen 2 µl de la minipreparació de plasmidi en llevats en la soca bacteriana DH5α pel mètode de l'electroporació.

3. TÈCNiques RELACIONADES AMB LA MANIPULACIÓ D'RNA

L'extrema fragilitat de l'RNA, així com la presència d'RNases endògenes i exògenes en el medi ambient, ha fet necessari prendre una sèrie de mesures per tal d'evitar la degradació o contaminació de l'RNA. La manipulació de les mostres d'RNA s'ha dut a terme amb guants i material lliure d'RNases. El material de vidre utilitzat s'ha netejat amb un agent degradador d'RNases (RNasa^{OFF}, Takara), i s'ha esclarit amb aigua tractada amb DEPC (Dietilpirocarbonat, Sigma). Totes les solucions usades per la manipulació d'RNA s'han preparat a partir d'aigua tractada amb DEPC i de reactius lliures d'RNases.

3.1. EXTRACCIÓ D'RNA TOTAL

L'obtenció de l'RNA viral es va realitzar per infecció d'una placa de 100 mm³ de cèl·lules SKMel-28 o A549, al 80% de confluència, amb 20 multiplicitats d'infecció (m.o.i) dels virus a analitzar, per a cada condició. L'obtenció d'RNA es va fer a les a diferents hores post-infecció (8h, 24h, 48h, 72h) seguint el protocol descrit per Chomczynski i Sacchi (Chomczynski and Sacchi 1987). Aquest mètode es basa en un primer pas de lisi cel·lular que utilitza les propietats disruptives i protectores del tiocianat de guanidina i el β -mercaptoetanol per a inactivar les ribonucleases presents en els extractes cel·lulars. L'RNA es separa del DNA mitjançant l'extracció en una solució àcida que conté tiocianat de guanosina, acetat sòdic, fenol i cloroform. Després de la centrifugació, l'RNA total es troba a la fase aquosa superior, mentre el DNA i les proteïnes es troben a la interfase o a la fase orgànica inferior. Finalment, l'RNA es precipita amb isopropanol i es resuspèn en aigua tractada amb DEPC (Dietilpirocarbonat, Sigma).

3.2. QUALITAT DE L'RNA

L'anàlisi de la qualitat i la concentració de les mostres d'RNA es va realitzar mitjançant la valoració espectrofotomètrica i l'electroforesi en gel d'agarosa.

3.2.1. Valoració espectrofotomètrica de l'RNA

La quantificació de les mostres d'RNA es va realitzar per espectrofotometria a una longitud d'ona de 260 nm. Aquesta mesura es va realitzar a partir d'1 μ l de solució d'RNA amb el nanodrop (NanoDrop technologies). Aquest aparell calcula automàticament la concentració de l'àcid nucleic que té la mostra i la relació entre les diferents densitats òptiques (DO).

L'RNA presenta un màxim d'absorció a 260 nm, mentre que les proteïnes, possibles contaminants de les mostres d'RNA, presenten un màxim d'absorció a 280 nm. La relació entre les absorbàncies a les dues longituds d'ona proporciona informació tan de la integritat com de la puresa de la mostra. La relació òptima DO_{260}/DO_{280} es troba entre 1.7 i 2.0. En aquest treball, totes les mostres d'RNA utilitzades han presentat una relació DO_{260}/DO_{280} que es trobava entre 1.7 i 2.0.

3.2.2. Electroforesi en gel d'agarosa.

L'electroforesi en gel d'agarosa ens permet comprovar la qualitat de les mostres d'RNA. L'RNA total està format per l'RNA ribosomal (80-85%), l'RNA de transferència (10-15%) i l'RNA missatger (1-5%). L'RNA ribosòmic, que és el majoritari, està format per les subunitats 28s, 18s i 5s. L'electroforesi en gel d'agarosa ens permet visualitzar les bandes 28s, 18s i 5s de l'RNA ribosòmic. Idealment, la banda corresponent a l'RNA de la subunitat 28s ha de ser el doble de gruixuda que la de la subunitat 18s. Relacions diferents entre aquestes bandes o un marcatge difús indica una degradació de les mostres d'RNA.

El protocol d'electroforesi en gel d'agarosa es basa en la separació de les bandes d'RNA de mida molecular diferent en un gel d'agarosa a l'1% en tampó TBE (Tris-borat, EDTA 1mM). La visualització dels fragments de DNA s'aconsegueix mitjançant la incorporació al gel del colorant bromur d'etidi (0,5 µg/ml). Les mostres (1-2 µl) es barregen amb el tampó de càrrega 10x (glicerol 50%, EDTA 1mM, blau de bromofenol 0.25%, cianol xilè 0.25%), es carreguen en el gel d'agarosa i es corren durant 45 minuts a 70 volts.

3.3. ANÀLISI DE L'RNA

En aquest treball s'han utilitzat dues tècniques per analitzar l'RNA: La tècnica de l'RT-PCR i l'anàlisi per Northern blot. L'RT-PCR converteix l'RNA en una cadena simple de cDNA, que es pot analitzar posteriorment per PCR. És una tècnica fàcil, ràpida i sensible per analitzar l'RNA, però no es pot usar com a tècnica quantitativa. L'anàlisi per Northern Blot, en canvi, requereix molt temps i concentracions elevades d'RNA, però es pot utilitzar per quantificar els nivells d'expressió gènica. La combinació de les dues tècniques, permet anàlisis acurades de l'expressió d'RNA.

3.3.1. Retrotranscripció a cDNA

L'RNA cel·lular total va ser transcrit a cDNA mitjançant la tècnica de l'RT-PCR. Per dur a terme la reacció es van utilitzar 500 ng d'RNA en un volum final de 2 µl, i es van barrejar amb 10 µl d'una mescla que contenia 5 µl d'oligonucleotids 2 µM (Sigma), 1µl d'oligo-dT (Amersham Pharmacia) i 4 µl d'aigua miliQ. Aquesta barreja s'escalfava 5 min a 65°C i es refredava durant 5 min en gel. A continuació, s'hi afegien 8 µl d'una segona mescla que contenia 1 µl de la transcriptasa inversa M-MLV (200 U/ µl, Invitrogen), 2 µl de 0,1M DTT (Invitrogen), 1 µl de RNasa OUT (Invitrogen) i 5 µl de 5x First Strand Buffer (Invitrogen). La reacció de transcripció inversa es va realitzar en un termociclador durant 1h a 37°C, seguit de 15 min a 70°C.

L'anàlisi del cDNA retrotranscrit es va realitzar per amplificació de la regió a analitzar amb encebadors específics. Una quantitat de cDNA equivalent a 50 ng d'RNA total va ser amplificada per PCR, i els productes resultants van ser analitzats en gels d'agarosa a l'1%. Com a control, es van utilitzar plasmidis de DNA que contenien la regió d'interès. Els plasmidis control, els encebadors i les mides dels fragments d'interès amplificats per a cada cDNA es detallen en la Taula 1.

Taula 1. Fragments i encebadors usats en la RT-PCR.

	Plasmidi control	Encebadors (Seqüència 5'-3')	Mida
Proteïna F	pNKFiberRGDF	HIFV-1: CCTTCTCGAGATGGGTACTATAATTCAATTTCTGG HIFV-2: GAAAGGTACCTTTATGATAAACAAAATTCTCCATT	1572 pb
E1a	pVK50	Ad670F: ATCTTCCACCTCCTAGCCAT E1a973: CTCGTGGCAGGTAAGATCGAT	937 pb
Fibra	pNKFiberRGDF	FiberUp2: GAACAGTTCAAAGTGCTCAT FiberDown: GTGTAAGAGGATGTGGCAAAT	379 pb

3.3.2 Northern Blot

- Marcatge de Sondes

Les sondes utilitzades per realitzar el northern blot es van marcar amb biotina utilitzant el quit "BrightStar® Psoralen-Biotin nonisotopic labeling Kit (Ambion)". Aquest kit permet el marcatge de qualsevol fragment de DNA (generat per PCR o per digestió d'un plasmidi o un fragment de DNA) d'una mida superior a 100 bp. L'obtenció dels diferents fragments de DNA que van ser marcats i utilitzats com a sondes es detalla a la taula 2.

Taula 2. Obtenció dels fragments utilitzats com a sondes per la realització del Northern blot.

	Plasmidi d'origen	Enzims de restricció	Encebadors	Mida
E1a	pAdwtGALV	-	<i>Ad670F</i> : ATCTTCCACCTCCTAGCCAT <i>Ad1482R</i> : GCTCGTTAAGCAAGTCCTCG	831 pb
Fibra	pAdwtGALV	-	<i>FiberUp6</i> : GGAAAACCTAGGACTAAAGTA <i>FiberDown</i> : GTGTAAGAGGATGTGGCAAAT	1127 pb
Proteïna F	pNKFiberRGDF	HindIII	-	638 pb
GALV	pNKFiberGALV	BspEI	-	931 pb

- Northern blot

Per tal d'analitzar els temps i els nivells d'expressió dels diferents RNA's d'una forma més quantitativa que la retrotranscripció a cDNA i el posterior anàlisi per PCR, es va realitzar un Northern Blot. Breument, les mostres d'RNA (10 µg d'RNA en un volum de 2 µl) es van barrejar amb 2 volums de formamida 100%, 1 volum de formaldehid 37%, ½ volum de tampó MOPS 10X i ¼ de volum de bromur d'etidi 200 µg/ml, i es van incubar 30 min a 55°C. A continuació, es van refredar 10 minuts en gel i se'ls hi va afegir ½ volum de tampó de carrega 10x. Les mostres es van córrer en tampó MOPS 1x durant 4-5 h a 40 V en un gel a l'1,5% d'agarosa i al 6% de formaldehid en el tampó Tris-Borat-EDTA (TBE). A continuació, l'RNA va ser transferit a una membrana de niló (Nitran ®Plus. Schleicher & Schuell) mitjançant un sistema de transferència en SSC 10x durant tota la nit. Un cop transferit, l'RNA va ser fixat a la membrana de niló per exposició a la llum ultravioleta (irradiació durant 1,5 minuts a 254 nm; Stratalinker oven), i prehibridat durant 2 h a 42°C en un forn orbital amb 10 ml de solució de prehibidació (5X SSC, 50% formamida, 5x solució de Denhardt's, 0,5% SDS). La hibridació es va realitzar per incubació de la membrana amb la solució d'hibridació (obtinguda per addició de la sonda, prèviament desnaturalitzada durant 5 minuts a 95°C, a la solució de prehibidació) a 42°C en el forn orbital durant tota la nit. La detecció de l'RNA marcat amb la sonda d'hibridació es va realitzar amb el quit BrightStar® BioDetect Non-isotopic Detection kit (Ambion, cat# 1930). Finalment, la membrana es va exposar al film durant 2 hores. Posteriors exposicions es van realitzar durant diferents períodes de temps (de 15 minuts a tota la nit).

4. ADENOVIRUS RECOMBINANTS

Tots els adenovirus emprats en aquest treball deriven de l'adenovirus humà tipus 5 (Ad5). Les característiques i l'origen de cadascun d'ells es mostren en la Taula 3.

En aquest apartat dels materials i mètodes es descriuen les tècniques més rellevants emprades per la construcció dels diferents adenovirus recombinants i per a la obtenció i caracterització de l'estoc de virus purificat.

4.1. CONSTRUCCIÓ DELS ADENOVIRUS RECOMBINANTS

La generació dels diferents vectors adenovirals s'ha realitzat en tres passos principals. El primer, el clonatge del gen o modificació d'interès en un plasmidi llançadora que conté unes regions d'homologia amb el genoma de l'adenovirus. El segon, la generació del plasmidi adenoviral recombinant per mitjà de la recombinació homòloga que es produeix entre el genoma sencer de l'adenovirus linealitzat i el plasmidi llançadora. Aquesta recombinació té lloc gràcies als braços d'homologia que comparteixen aquests dos elements i es produeix després de la seva cotransformació en la soca rec A positiva d'*E.Coli* BJ5183, o en la soca de llevats YPH857. El pas final consisteix en l'alliberació del genoma viral del DNA de suport que ens permet la manipulació en els bacteris i els llevats mitjançant una digestió amb l'enzim PacI i la introducció per transfecció en les cèl·lules empaquetadores per a la seva generació.

A continuació, es descriuen els passos seguits per la construcció de cadascun dels vectors que han estat generats en el marc d'aquest treball (Figura1).

4.1.1. Construcció dels adenovirus AdwtRGD-F, AdwtRGD-GALV i AdwtRGD-PH20.

Clonatge dels transgens d'interès en el plasmidi llançadora pNKFiberRGD

Els cDNA de les glicoproteïnes fusogèniques F i GALV, així com la hialuronidasa PH20 van ser clonades per amplificació del cDNA amb encebadors específics que contenen la diana dels enzims de restricció necessaris per la seva lligació en el vector llançadora, el pNKFiberRGD. Aquest vector conté la fibra adenoviral amb la seqüència peptídica RGD a l'*HI loop* seguida d'una diana de restricció per l'enzim MfeI i flanquejada per regions d'homologia amb el genoma de l'adenovirus. El plasmidi pNKFiberRGD és especialment útil pel clonatge de transgens darrera la fibra. En tots els clonatges realitzats en aquesta tesi, el pNKFiberRGD es va obrir per digestió amb l'enzim de restricció MfeI i posteriorment es va defosforilar per tal d'impedir la seva religació.

Taula 3. Descripció dels adenovirus recombinants emprats en aquest treball.

Nom	Aïllant	Promotor E1	E1A	Fibra	Transgèn a L6	E4	Origen
Adwt	-	wt	wt	wt	-	-	
AdwtRGD	-	wt	wt	RGD en HI loop	-	-	
AdwtRGD-F	-	wt	wt	RGD en HI loop	Proteïna F SV5	-	En aquest treball
AdwtRGD-GALV	-	wt	wt	RGD en HI loop	Kozac/GALV	-	(Guedan et al., 2008)
AdwtRGD-PH20	-	wt	wt	RGD en HI loop	Kozac/PH20	-	En aquest treball
Adwtorf12	-	wt	wt	wt	-	Deleció ORF1 i 2	En aquest treball
Adwtorf123	-	wt	wt	wt	-	Deleció ORF 1, 2, 3	En aquest treball
ICOVIR5	poliA + DM	Promotor E2F-1	Kozac/ Δ 24	RGD en HI loop	-	-	(Cascalló et al., 2007)
ICOVIR8dE4	poliA + DM	Promotor E2F-1	Kozac/ Δ 24	RGD en HI loop	Kozac/PH20	Deleció ORF 1 i 2	En aquest treball
ICOVIR9dE4	poliA + DM	Promotor E2F-1	Kozac/ Δ 24	RGD en HI loop	Kozac/GALV	Deleció ORF 1, 2, 3	En aquest treball
ICOVIR15	-	Promotor endogen E1A + 4 llocs d'unió a E2F + 1 lloc d'unió Sp1	Kozac/ Δ 24	RGD en HI loop	-	-	(Tesi doctoral Rojas)
ICOVIR16	-	Promotor d'ICOVIR15	Kozac/ Δ 24	RGD en HI loop	Kozac/GALV	-	En aquest treball
ICOVIR17	-	Promotor d'ICOVIR15	Kozac/ Δ 24	RGD en HI loop	Kozac/PH20	-	En aquest treball

En els encebadors forward que es van utilitzar per l'amplificació dels tres transgens es va introduir la seqüència acceptora de tall i lligació (*splicing*) de l'adenovirus IIIA. En els encebadors forward utilitzats per l'amplificació de la proteïna GALV i la hialuronidasa PH20 es va introduir la seqüència kozac just abans del codó d'inici de la proteïna. En els encebadors *reverse* utilitzats per l'amplificació dels tres transgens es va introduir la seqüència de poliadenilació d'E4. Les seqüències i característiques més importants dels encebadors utilitzats per l'amplificació dels tres transgens es detallen en la taula 4.

El cDNA de la glicoproteïna F del virus SV5 va ser amablement cedit pel Dr. Robert A. Lamb, del Departament de Bioquímica, Biologia Molecular i Cel·lular de la Universitat de Northwestern, IL, E.E.U.U. L'anomenat cDNA, de 1800 pb, va ser subministrat inserit en el plasmidi pGEM-2X. A partir d'aquest plasmidi, el cDNA de la proteïna F va ser amplificat per PCR amb els encebadors IIIaFup i IIIaFdown. En tots dos encebadors es va introduir la diana de tall per MfeI. El fragment de PCR va ser digerit amb MfeI i clonat en el vector pNKFiberRGD, darrera del gen de la fibra adenoviral.

El cDNA de la glicoproteïna fusogènica de membrana GALV va ser amablement cedit pel Dr. Richard Vile, del Programa de medicina molecular de la Clínica Mayo de Rochester, MN, E.E.U.U. L'anomenat cDNA, de 2004 pb va ser subministrat inserit en el plasmidi pCR3.1GALV. El cDNA de la proteïna GALV conté una diana PacI en la posició 1588. Aquesta diana va haver de ser eliminada per amplificació del cDNA amb els encebadors GALVPacF i GALVPacR, que canviaven l'última adenina del codó TTA per una guanosina TTG. Aquest canvi de nucleòtid permet eliminar la diana PacI sense canviar l'aminoàcid de la proteïna. Així doncs, l'amplificació del cDNA de la proteïna GALV es va realitzar en 2 passos: primer l'amplificació del cDNA de la proteïna GALV de la posició 1 a la 1588 amb els encebadors IIIaGALV2 i GALVPacR, i de la posició 1588 a la 2000 amb els encebadors GALVPacF i GALVR2, i segon l'obtenció del fragment final per amplificació dels dos fragments anteriors amb els encebadors externs IIIaGALV2 i GALVR2. En tots dos encebadors es va introduir la diana de tall per EcoRI, doncs el cDNA de la proteïna GALV conté una diana MfeI en la posició 991. El fragment de PCR va ser digerit amb EcoRI i clonat en el vector pNKFiberRGD, darrera del gen de la fibra adenoviral. Aquesta lligació es va poder realitzar sense problemes, degut a que els extrems creats per les dianes EcoRI i MfeI són complementaris.

Taula 4. Característiques principals dels encebadors utilitzats pels clonatges dels transgens F; GALV i PH20 en el plasmidi pNKFiberRGD

Nom	nt	Proteïna	Seqüència (5' - 3')	Regions d'homologia	Inserció
IIIaFup	50	Prot.F	GCAGAATTCTACTAAGCGGTGATGTTTCTGATCAGATGGGTACTATAATT	Seqüència 5' proteïna F	SA IIIa Diana Mfel
IIIaFdown	34	Prot.F	CGTGAATTCAAAAATAAATTTATTTATGATAAAC	Seqüència 3' proteïna F	Seqüència poliaA d'E4 Diana Mfel
IIIaPH20	60	PH20	CGTCAATTGTACTAAGCGGTGATGTTTCTGATCAGCCACCATGGGAGTGCTAAAATTCAA	Seqüència 5' PH20	SA IIIa Seqüència Kozac Diana Mfel
PH20F1	23	PH20	ATGGGAGTGCTAAAATTCAAGC	23 nt de la regió 5' de l'exó II	-
PH20R1	22	PH20	TTGAGAAAGGAATTTCAAAC	22 nt de la regió 3' de l'exó II	-
PH20F2	68	PH20	GAAATTCCTTTCTCAAGATGAACTTGTGTATACATTTGGCGAACTGTTGCTCTGGGTGCTTCTGGAA	15 nt regió 3' exó II 52 nt regió 5'exó III	-
PH20R2	68	PH20	GAGCAAGCAAGATTTCACTTCGCATTATACTGAGGGTCCCATATTACAATTCCAGAAGCACCCA	52 nt regió 5'exó III 15 nt regió 5' exó IV	-
PH20F3	20	PH20	AAATCTTGCTTGCTCCTAGA	20 nt regió 5' exó IV	-
PH20R5	44	PH20	CAGCAATTGAAAAATAAAGTTTATTAAGATAGTGTGGAGGGTGA	21 nt regió 3' exó IV	Seqüència poliaA d'E4 Diana Mfel
IIIaGALV2	63	GALV	CGTGAATTCTACTAAGCGGTGATGTTTCTGATCAGCCACCATGGTATTGCTGCCTGGGTCCAT		SA IIIa Seqüència Kozac Diana EcoRI
GALVR2	43	GALV	CAGGAATTCAAAAATAAAGTTTATTAACATGCACTTATCCTA		Seqüència poliaA d'E4 Diana EcoRI
GALVPacF	36	GALV	CTGGTTCAACTGCCTTGATTAAAGGACCTATAGACC	Complementari a GALVPacF	Eliminació diana PacI
GALVPacR	36	GALV	GGTCTATAGGTCCTTTAATCAAGGCAGTTGAACCAG	Complementari a GALVPacF	Eliminació diana PacI

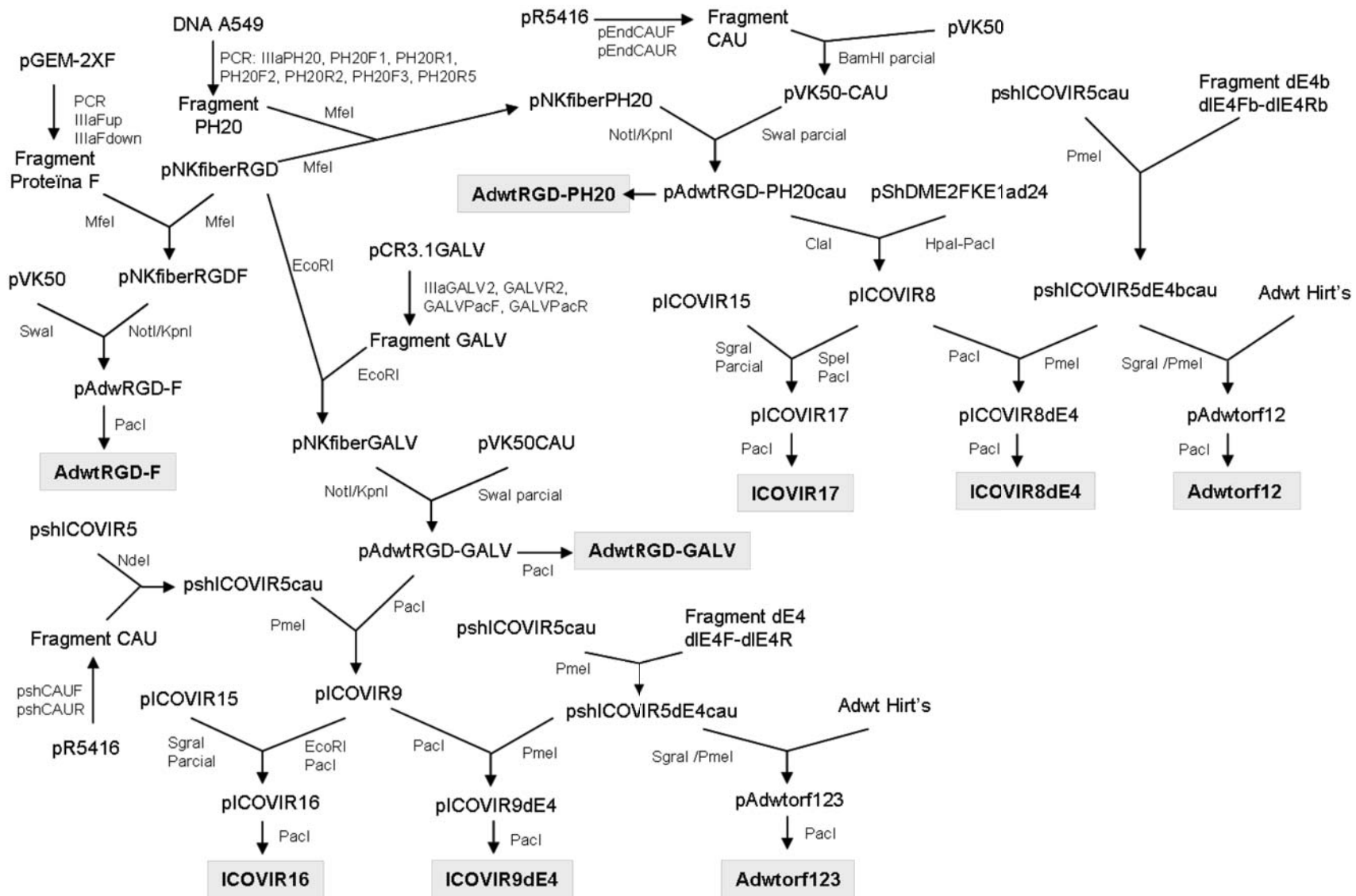


Figura 1. Esquema simplificat de les estratègies de clonatge utilitzades per a la construcció dels adenovirus recombinants generats en el marc d'aquesta tesi.

El cDNA de la hialuronidasa PH20 va ser obtingut mitjançant l'amplificació per PCR dels diferents exons de la proteïna a partir del genoma de la línia cel·lular A549 amb encebadors específics. A continuació, els fragments de PCR que contenien els diferents exons es van unir per PCR amb encebadors específics que contenen la diana de l'enzim de restricció MfeI necessària per la seva lligació al vector llançadora. L'exó II va ser amplificat des del codó d'inici de transcripció, ATG, fins al seu extrem 3' amb els encebadors PH20F1 i PH20R1. L'exó III, de només 90 pb, es va demanar sintetitzat en forma d'encebadors (PH20F2 i PH20R2). Aquests encebadors es van usar directament a la PCR final per l'obtenció del cDNA de la proteïna PH20. L'exó IV va ser amplificat des del seu inici 5' fins a l'inici de la seqüència de nucleòtids que codifica per la cua hidrofòbica de la proteïna. Els encebadors usats per aquesta reacció d'amplificació van ser PH20F3 i PH20R5. L'encebador PH20R5 duia incorporat el codó de stop de la proteïna i la seqüència de poliadenilació. Aquestes seqüències no van poder ser amplificades a partir de l'exó IV perquè quedaven a l'extrem 3' de la cua hidrofòbica, que va ser eliminada. En la reacció de PCR final es van incloure 10 ng dels productes de PCR corresponents a l'exó II i IV i els encebadors PH20F2 i PH20R2, i 100 ng dels encebadors externs, el IIIAPH20 i el PH20R5. El fragment final de PCR, de 1471 pb, va ser digerit amb MfeI i clonat per lligació en el vector pNKFiberRGD, darrera del gen de la fibra adenoviral.

Obtenció dels plasmidis adenovirals pAdwtRGD-F, pAdwtRGD-GALV i pAdwtRGD-PH20

Per l'obtenció del plasmidi adenoviral pAdwtRGD-F, que conté el gen de la proteïna F darrera la fibra es va utilitzar el plasmidi pVK50. Aquest plasmidi conté les 36 kb del genoma de l'Ad5 flanquejat per dianes de restricció PacI, i una diana Swal en el gen de la fibra única en tot el genoma de l'Ad5. Aquest plasmidi és especialment útil per introduir modificacions a la fibra adenoviral o bé pel clonatge de transgens darrera la fibra adenoviral.

Per tal de poder utilitzar el pVK50 per recombinació homòloga en llevats, varem introduir el fragment CAU en l'esquelet del pVK50. El fragment CAU es va obtenir a partir del plasmidi pRS416 per PCR amb els encebadors pEndCAUF i pEndCAUR (Taula 5). Aquests encebadors presenten una regió d'homologia amb el fragment CAU del plasmidi pRS416 i una regió d'homologia amb el l'esquelet del pVK50. La recombinació homòloga en llevats entre el pVK50 digerit amb BamHI (parcial) i el fragment CAU va donar lloc al pVK50cau, que va ser utilitzat per la construcció dels plasmidis adenovirals pAdwtRGD-GALV i pAdwtRGD-PH20. Degut a que el DNA del CAU conté una diana Swal, la diana Swal de la fibra del pVK50 va deixar de ser única, de manera que les digestions amb Swal per introduir el gen d'interès darrera la fibra del pVK50cau van haver de ser parcials.

Taula 5. Seqüències dels encebadors utilitzats pel clonatge del fragment CAU en el pVK50.

	Seqüència nucleotídica
pEndCAUF (66 pb)	CTATAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCGTCTTCAAGTTCGAACCTGGGTCCTTTTCATCAC
pEndCAUR (71 pb)	CAAATAAGGTATATTATTGATGATGTTAATTAAGAATTCGGATCTTCGAACATCTGTGCGGTATTTTCA

Per tal d'obtenir el plasmidi pAdwtRGD-F, el gen de la fibra del plasmidi pVK50 vas ser reemplaçat per recombinació homologa en bactèries competents BJ5183 pel gen de la fibra seguit del gen de la proteïna F del plasmidi pNKFiberRGDF digerit amb NotI/KpnI.

Per tal d'obtenir el plasmidi pAdwtRGD-GALV el gen de la fibra del plasmidi pVK50cau vas ser reemplaçat per recombinació homologa en llevats competents pel gen de la fibra seguit del gen de la glicoproteïna GALV del plasmidi pNKFiberGALV digerit amb NotI/KpnI.

Per tal d'obtenir els plasmidis pAdwtRGD-PH20 el gen de la fibra del plasmidi pVK50cau vas ser reemplaçat per recombinació homologa en llevats competents pel gen de la fibra seguit del gen de la hialuronidasa PH20 del plasmidi pNKFiberpPH20 digerit amb NotI/KpnI.

4.1.2. Construcció dels adenovirus Adwtorf12 i Adwtorf123.

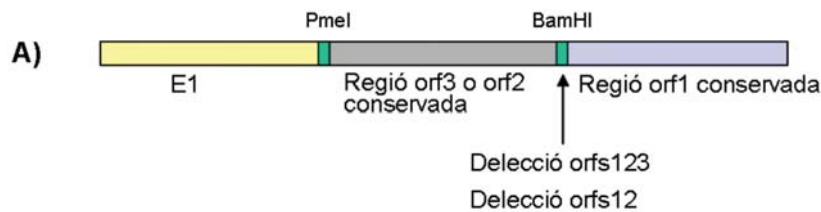
La deleció dels ORF123 i els ORF12 es va realitzar en el plasmidi pshICOVIR5cau, obtingut prèviament per digestió del pshICOVIR5 amb NdeI i recombinació homologa amb el fragment CAU. El fragment CAU es va obtenir per PCR a partir del plasmidi pRS416 amb els encebadors pshCAUF i pshCAUR (Taula 6).

Taula 6. Seqüències dels encebadors utilitzats pel clonatge del fragment CAU en el pshICOVIR5.

	Seqüència nucleotídica
pshCAUF (65nt)	5'-GGTATATTATTGATGATGTTAATTAACATGCATGGATCCATTTCGAACCTGGGTCCTTTTCATCAC-3'
pshCAUR (69 nt)	5'-GTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCGCATATTTCGAACATCTGTGCGGTATTTTCA-3'

Per la deleció dels ORF1,2,3 i dels ORF1,2 es van dissenyar els fragment de DNA dIE4 (ORF123) i dIE4b (ORF12) que contenen una regió d'homologia amb la regió E1 del pshICOVIR5cau, una regió d'homologia amb el final de la seqüència per l'ORF3/ORF2 (segons deleció), la deleció dels ORF123 o dels ORF12 (segons el fragment) substituïdes per una diana de tall per l'enzim BamHI, i finalment una regió d'homologia per l'inici de l'ORF1 del pshICOVIR5cau (Fig. 2A). El fragment dIE4, de 131 pb, es va obtenir a partir de dos encebadors comercials, dIE4F i dIE4R, de 73 nucleòtids cadascun, que es van unir i amplificar per PCR. De

la mateixa manera, El fragment dIE4b (deleció orfs12), també de 131 pb, es va obtenir a partir de dos encebadors, dIE4Fb i dIE4Rb, de 73 nucleòtids cada ú, que es van unir i amplificar per PCR (Fig. 2B).



B)

	Seqüència nucleotídica
dIE4F	GGCTGTCCGTGTCCCCGTATACAGACTTGAGAGGGA GTTTAAACGTTGCACAATGGCTTCCAAAAGGCCAAACG
dIE4R	GTTTTTTAATAGGTTTTCTTTTTACTGGTAAGGCTGACT GGATCCGACGTGAGGGCCGTTTGCCTTTTGA
dIE4Fb	GGCTGTCCGTGTCCCCGTATACAGACTTGAGAGGGA GTTTAAACGATTCAAAGCGGAACATTAACAAAATA
dIE4Rb	GTTTTTTAATAGGTTTTCTTTTTACTGGTAAGGCTGACT GGATCCGGGATCGCGGTATTTTTGTTAATGT

Figura 2. (A) Fragment de PCR dissenyat per obtenir la delecció dels ORF123 o dels ORF12 en el pshICOVIR5. (B) Seqüència nucleotídica dels encebadors utilitzats per l'obtenció del fragment per la delecció dels ORF123 (dIE4F i dIE4R) i per la delecció dels ORF12 (dIE4Fb i dIE4Rb). En groc, es ressalta el fragment d'homologia amb la regió E1, i en blau la regió d'homologia pels primers nucleòtids de l'orf1 (on es troba el donador de tall i lligació, D1). Subratllats es troben les dianes per PmeI (en els encebadors F) i per BamHI (en els encebadors R). En gris, es remarca la regió d'homologia amb el final de l'orf3 (per la delecció dels orfs123) o amb el final de l'orf2 (per la delecció dels orfs12).

Per tal d'obtenir els plasmidis pshICOVIR5dE4cau (delecció ORF123) i pshICOVIR5dE4bcau (delecció ORF12), el pshICOVIR5cau es va digerir amb PmeI i es va recombinar amb els fragments dIE4 o dIE4b per recombinació homologa en llevats. La incorporació de la delecció en els nous plasmidis es va comprovar per digestió amb l'enzim BamHI.

Els plasmidis pAdwtorf123 i pAdwtorf12 es van obtenir per recombinació homologa en llevats del pshICOVIRdE4cau o del pshICOVIR5dE4bcau digerits amb Sgral/PmeI amb el DNA viral de l'adenovirus salvatge (Adwt) obtingut pel mètode Hirt's (apartat 4.6.1).

4.1.3. Construcció dels adenovirus ICOVIR8dE4 i ICOVIR9dE4

L'obtenció del plasmidi pICOVIR9dE4 es va fer en dos passos. En un primer pas, es va obtenir el plasmidi pICOVIR9 mitjançant la recombinació homologa del pAdwtGALV digerit amb Pacl amb el pshICOVIR5cau digerit amb PmeI. En un segon pas, el plasmidi pICOVIR9 digerit

amb *PacI* es va recombinar amb el *pshICOVIR5dE4cau* digerit amb *PmeI*, per obtenir finalment el plasmidi *pICOVIR9dE4*.

L'obtenció del plasmidi *pICOVIR8dE4* es va fer mitjançant una aproximació similar. En un primer pas, es va recombinar el plasmidi *pshICOVIR5* digerit amb *HpaI* i *PacI* amb el plasmidi *pAdwtRGD-PH20* digerit amb *Clal*, per tal de generar el plasmidi *pICOVIR8*. Com que l'enzim *Clal* no talla DNA metilat, prèviament a la digestió, el plasmidi *pAdwtPH20* es va amplificar en la soca bacteriana lliure de metilases *SCS101*. En una segona recombinació homòloga en llevats, el plasmidi *pICOVIR8cau* digerit amb *PacI* es va recombinar amb el *pshICOVIR5dE4b* digerit amb *PmeI* per donar lloc al plasmidi adenoviral *pICOVIR8dE4*.

4.1.4. Construcció dels adenovirus ICOVIR16 i ICOVIR17

La construcció del plasmidi *pICOVIR16* es va fer per recombinació homòloga en llevats entre el plasmidi *pICOVIR15cau* (cedit per Juanjo Rojas) digerit amb *SpeI* i el fragment provinent de la digestió del *pICOVIR9* amb els enzims de restricció *EcoRI* i *PacI*.

La construcció del plasmidi *pICOVIR17* es va fer per recombinació homòloga en llevats entre el plasmidi *pICOVIR15cau* digerit amb *SpeI* i el fragment provinent de la digestió del *pICOVIR8* amb els enzims de restricció *SpeI* i *PacI*.

4.2. GENERACIÓ DELS ADENOVIRUS RECOMBINANTS PER TRANSFECCIÓ. MÈTODE DEL FOSFAT CÀLCIC.

Després d'haver incorporat les modificacions desitjades en el genoma viral clonat en el plasmidi, cal introduir únicament el DNA viral recombinant en les cèl·lules especialitzades per a que inici el seu cicle viral i es generi l'adenovirus. Un cop a l'interior de la cèl·lula empaquetadora, el DNA viral recombinant activarà la replicació del DNA viral i la transcripció de les proteïnes de la càpside. El DNA viral fruit de la replicació s'encapsidarà per donar lloc a la progènie viral, que s'allibera al medi extracel·lular, on infectarà noves cèl·lules. Un cop generat, l'adenovirus recombinant s'amplificarà per successives rondes de propagació en les cèl·lules i en les condicions adequades. A continuació es descriu en detall el procediment a seguir per a la generació dels adenovirus recombinants a partir dels genomes virals continguts en els plasmidis.

El genoma viral recombinant s'allibera per digestió amb *PacI* de la construcció plasmídica i es transfecta en les cèl·lules 293 pel mètode del fosfat de calci. Aquest mètode és l'òptim quan es fan servir les cèl·lules 293, o derivades d'aquestes, per a la introducció del DNA. Els

precipitats formats pel DNA i el fosfat càlcic es generen lentament durant les 16 h d'incubació en el medi de cultiu a pH 6.96.

Breument, les cèl·lules es sembren per a que estiguin a una confluència del 60 % en el moment de la transfecció. Per a cada pou de cèl·lules a transfectar, es prepara una mescla que conté:

- 19,5 µl de CaCl₂ 2 M
- 3 µg de DNA
- H₂O bidestil·lada filtrada, fins a un volum final de 162 µl

La mescla es barreja amb la pipeta, pujant i baixant el volum un parell de vegades. En un altre tub de 1.5 ml tipus ependorf, s'afegeixen 162 µl de la solució HBS 2X (NaCl 274 mM, HEPES 50 mM, Na₂HPO₄ 1.5 mM en H₂O pH ajustat a 6,95 amb NaOH) i s'aireja fent bombolles, primer durant 2 minuts i després, mentre es continua airejant la solució HBS, es va afegint la mescla que conté el DNA gota a gota. Es continua airejant 5 segons més per garantir que s'ha mesclat bé. Ens esperem 1 minut per a que reposi i la mescla s'addiciona a les cèl·lules mentre la placa s'agita suaument per a una millor distribució de la solució que conté el DNA. Els precipitats són visibles a les 4h després de la transfecció. A les 16 hores es canvia el medi de cultiu, prèvia confirmació de la presència dels precipitats.

La generació de l'adenovirus recombinant s'observa per l'aparició de l'efecte citopàtic: les cèl·lules estan arrodonides, refringents i es desenganxen amb facilitat. L'efecte citopàtic es dona, aproximadament, entre els 6 i els 7 dies després de la transfecció. En aquest moment es recullen conjuntament les cèl·lules infectades i el sobrenedant. Per tal d'alliberar les partícules virals de l'interior de la cèl·lula es llisen les cèl·lules fent 3 cicles de congelació (en neu carbònica) i descongelació (en un bany a 37°C). D'aquesta manera s'obté el llisat inicial (passatge 0) a partir del qual es procedeix a amplificar l'adenovirus per successives rondes de propagació.

4.3. SELECCIÓ DE CLONS D'ADENOVIRUS RECOMBINANTS PER L'ASSAIG DE FORMACIÓ DE CALBES.

Per tal de disposar d'un estoc homogeni del cada un dels virus recombinants, es va procedir a l'obtenció de clons aïllats d'adenovirus recombinants mitjançant l'assaig de formació de calbes. L'assaig de formació de calbes es va realitzar en les cèl·lules A549, que a diferència de les 293, no contenen la seqüència que codifica per *E1a*, evitant així la recombinació homòloga entre la regió E1 modificada del virus i la regió E1 salvatge de les cèl·lules empaquetadors. Un

cop aïllats, els clons es van caracteritzar, i els clons correctes van ser amplificats per tal d'usarlos en els assajos *in vitro* i *in vivo*.

L'assaig de formació de calbes es basa en la infecció d'una monocapa cel·lular amb un banc de dilucions del llisat inicial de l'adenovirus. A continuació, es cobreix la monocapa de les cèl·lules infectades amb una matriu d'agarosa, que en permet el bescanvi de gasos i de nutrients amb el medi, però que no permet la difusió de la progènie viral, de manera que els virions alliberats de la primera infecció només arriben a infectar les cèl·lules veïnes. Les calbes es formen després de successives rondes de replicació dels adenovirus.

Breument, es prepara un banc de dilucions seriades (10^{-4} i 10^{-9}) a partir del llisat inicial en medi DMEM al 5% de sèrum fetal boví desactivat (FBS). Amb 1ml de la dilució s'infecta un pou d'una placa de 6 pous (6 mm de diàmetre) de cèl·lules A549 al 80-90% de confluència. Un cop donada la infecció (4-6 hores) es retira el medi d'infecció i s'afegeixen 2 ml d'una solució estèril d'agarosa i medi en relació 1:1 prèviament preparada (a partir d'una solució d'agarosa a l'1 % a 56 °C i de medi DMEM complementat amb un 10 % FBS a 37 °C). El medi amb l'agarosa es deixa solidificar durant 30 minuts a temperatura ambient, i a continuació s'afegeixen 2 ml de medi DMEM al 5 % de FBS sobre la matriu d'agarosa. Les plaques es deixen a l'incubador fins que al cap de 5-7 dies es comencen a veure's les primeres calbes virals, cadascuna corresponent a un clon diferent. Per tal de obtenir les calbes, es retira el medi líquid de sobre l'agarosa, i l'agarosa es perfora amb la punta d'una pipeta de 200 µl. Les calbes s'aspiren amb la pipeta i es resuspenen en 500 µl de DMEM.

Per a la comprovació de la identitat de l'adenovirus recombinant, les calbes es van amplificar com es detalla a continuació. El DNA viral es va obtenir per infecció d'una placa de 100 mm de les cèl·lules A549 seguint el mètode de Hirt's. Posteriorment, el DNA es va caracteritzar, tal i com es detalla més endavant.

4.4. AMPLIFICACIÓ I PURIFICACIÓ DELS ADENOVIRUS

L'amplificació i la purificació dels adenovirus permet l'obtenció del vector viral en una quantitat suficientment gran i en una formulació adient per a ser emprat en tots els assajos *in vitro* i *in vivo*.

L'amplificació de l'adenovirus es basa en la propagació del vector viral en plaques de cultiu cada vegada més grans i en més quantitat.

La purificació de l'adenovirus es basa en la separació dels adenovirus produïts de les restes del cultiu cel·lular per ultracentrifugació en gradient de clorur de cesi. A continuació es descriuen ambdós procediments.

4.4.1. Amplificació dels adenovirus

Donat que les cèl·lules 293 tenen clonat en el seu genoma el gen d'E1 amb el corresponent promotor, i per tal d'evitar la possible recombinació homòloga entre el gen d'E1 del genoma de les 293 i el de l'adenovirus recombinant amb la regió d'E1 modificada, tots els virus de replicació condicionada, amb la regió E1 modificada van ser amplificats en la línia tumoral A549. La resta d'adenovirus, de replicació no condicionada, van ser amplificats en la línia 293. Els títols virals obtinguts després de l'amplificació del virus en A549 són molts similars als títols obtinguts en l'amplificació en 293.

En l'amplificació dels adenovirus recombinants, es parteix del clon aïllat en l'assaig de formació de calbes, i aquest es va amplificant per successives infeccions de plaques cada vegada més grans. En condicions normals de propagació, el llisat cel·lular pot infectar 10 plaques de la mateixa mida del qual prové. Un cop obtenim dues plaques de 150 mm de diàmetre infectades amb l'adenovirus recombinant, ja tenim un extracte cel·lular amb suficient quantitat de virus per fer tots els experiments *in vitro*. Per fer els experiments *in vivo* continuarem l'amplificació fins a obtenir de 20-30 plaques de 150 mm infectades. L'extracte cel·lular final serà purificat mitjançant gradients de clorur de cesi.

Breument; quan les cèl·lules estan a una confluència del 80 % s'infecten, ja sigui a partir de virus purificat, o partir del llisat cel·lular. Després d'una incubació de 36 a 72 hores (segons l'adenovirus) a 37 °C al 5 % CO₂, l'efecte citopàtic es fa evident en el 95-100 % de les cèl·lules. Una vegada estiguin desenganxades el 80% de les cèl·lules, es recull tot el virus produït, i l'extracte cel·lular s'emmagatzema a -80°C.

En l'amplificació final, prèvia a la purificació del virus, el virus es recull en el moment que l'efecte citopàtic es evident en el 90-100 % de les cèl·lules en cultiu, però només un 10-30 % d'elles estan desenganxades. En aquest moment, es recullen les cèl·lules i el sobrenedant de cadascuna de les plaques i es centrifuguen en tubs de 50ml, tipus falcon, durant 5 minuts a 1250 rpm. El sobrenedant s'elimina i els pelets cel·lulars de les diferents plaques s'ajunten en un sol falcon, en un volum aproximat de 20 ml i es guarden congelats a -80 °C fins al moment de la seva purificació.

4.4.2. Purificació dels adenovirus

Els adenovirus es purifiquen amb la finalitat d'obtenir un estoc de virus purificat en una formulació de medi i de concentració adient per a ser administrat a ratolins per via sistèmica.

El mètode emprat per a la purificació dels adenovirus d'aquest treball es basa en la ultracentrifugació d'un gradient de densitats fet amb diferents concentracions de clorur de cesi. Aquest mètode permet la separació de les partícules virals de la resta dels elements presents en el llisat cel·lular (càpsides virals buides, restes cel·lulars...) i concentrar les partícules virals. El canvi de medi es fa a continuació per diàlisi contra el tampó desitjat (Fig. 3).

Breument: per tal d'alliberar les partícules virals de l'interior de la cèl·lula, els pelets cel·lulars provinents de l'amplificació viral es llisen duent a terme tres cicles de congelació i descongelació. L'extracte viral llisat es centrifuga durant 5 minuts a 1250 rpm per a precipitar les restes cel·lulars. El sobrenedant serà el que anomenem extracte cel·lular clarificat (CEC, *Cell Extract Clarified*). El CEC conté els adenovirus a purificar i serà carregat en els gradients de clorur de cesi per a la separació de les partícules adenovirals de les restes del cultiu cel·lular.

Els gradients de clorur de cesi es preparen en els tubs de la ultracentrífuga (Beckman). Primer s'afegeixen 0,5 ml d'una solució de clorur de cesi de densitat 1,5 mg/ml. La segona i la tercera fase, que consisteixen en 2,5 ml de solucions de clorur de cesi a 1,35 mg/ml i 1,25 mg/ml respectivament, s'afegeixen gota a gota, amb cura de no malmetre el gradient de densitats. A sobre de la tercera fase s'afegeix la suspensió viral (CEC) i finalment els tubs s'ajusten amb PBS fins a un volum final de 12,5 ml per tub. Quan es prové del llisat cel·lular de 20 a 40 plaques, es preparen entre 4 i 6 tubs d'ultracentrífuga.

Els tubs es centrifuguen una hora a 10 °C a 35000 rpm (rotor SW41, Beckman). En aquestes condicions les partícules virals es separen de les restes cel·lulars i es concentren en el

punt del gradient de densitat corresponent a la densitat de la partícula viral (1,32 g/ml). Normalment apareixen dues bandes blanquinoses que corresponen als virus. La banda superior correspon a les càpsides buides i es descarta, juntament amb les restes cel·lulars, per aspiració. La banda inferior, que correspon a les càpsides plenes, es retira amb una pipeta i es sotmet a una segona ultracentrifugació. En aquest cas el gradient de clorur de cesi es continu. Els tubs de la ultracentrifuga s'omplen amb les bandes de virus mesclades amb la solució 1,35 mg/ml de clorur de cesi i es centrifuguen 16 hores a 10°C a 35000 rpm.

Al final de la segona centrifuga s'obté una banda blanquinososa que correspon a l'adenovirus. La banda es retira amb una pipeta i s'introdueix en una membrana de diàlisi. La diàlisi es realitza enfront de 500 ml del tampó PBS⁺⁺ a 4°C en agitació durant 2 hores. Es renova el tampó de la diàlisi i es deixa dues hores més en les mateixes condicions. El tercer i darrer canvi es fa enfront del tampó PBS⁺⁺ complementat amb glicerol a una concentració final del 5%, per conservar el virus al·liquotat a -80°C. Finalment el virus s'aliquota en al·liquotes de diferents volums.

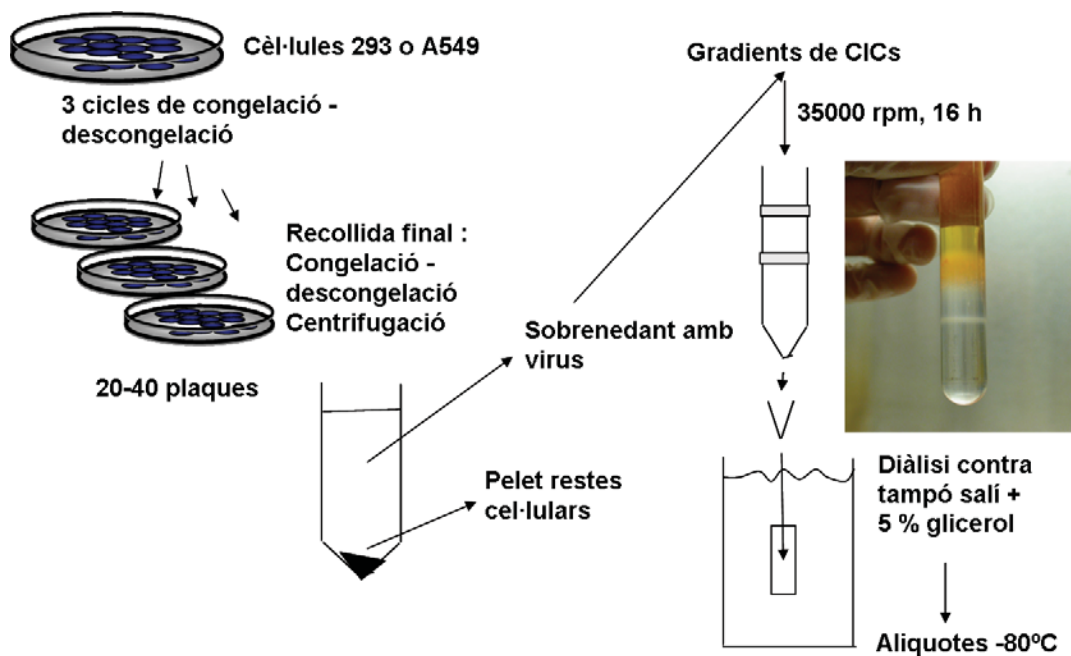


Figura 3. Esquema del procés de purificació viral. La fotografia mostra un tub d'ultracentrifuga amb el gradient de clorur de cesi discontinu i l'extracte cel·lular clarificat (CEC) després de la primera ultracentrifugació. La banda blanca correspon a les càpsides virals plenes.

4.5. TÈCNiques EMPRADES PER TITULAR ELS ADENOVIRUS

4.5.1 Determinació de les partícules víriques per espectrofotometria (vp/ml)

Aquest protocol es basa en determinar l'absorbància del DNA viral a una longitud d'ona de 260 nm. Ens permet determinar el nombre de partícules virals (vp) totals d'un estoc viral purificat, sense discriminar entre partícules infectives i defectives.

Es prepara una dilució de l'estoc viral purificat en un tampó de lisi (Tris 10mM, EDTA 1mM, 0,1% SDS, pH 8.0). La mescla s'incuba durant 5 minuts a 56°C i es mesura la densitat òptica a l'espectrofotòmetre a les longituds d'ona de 260 nm i 280 nm. La concentració final es pot calcular tenint en compte que el coeficient d'extinció del virus es $1,1 \cdot 10^{12}$ per cada unitat de D.O.

$$\text{vp/ml} = \text{D.O.}_{260} \times \text{dilució mostra} \times 1,1 \cdot 10^{12}$$

La ràtio entre l'absorbància de la mostra a 260 i 280 ens dóna idea de la integritat de la mostra purificada. Òptimament ha d'estar al voltant de 1,4.

4.5.2. Determinació de les partícules víriques per PCR a temps real (vp/ml)

Aquest protocol es basa en la determinació del número de genomes virals en una mostra per amplificació del DNA per PCR a temps real. El número de còpies de DNA viral es va quantificar en relació a una corba patró, realitzada a partir de dilucions 1/10 d'un estoc d'adenovirus purificat (AdwtRGD) en DMEM 5% FBS, des d'una concentració de $1 \cdot 10^{11}$ vp/ml a una concentració de $1 \cdot 10^5$ vp/ml.

Preparació de les mostres

La determinació de les partícules víriques per PCR a temps real es va utilitzar per quantificar extractes cel·lulars infectats amb adenovirus, i els seus corresponents sobrenedant. Degut a que aquestes mostres, a part de les partícules virals, contenen genomes virals no encapsidats, àcids nucleics provinents de les cèl·lules, i proteïnes cel·lulars i virals, abans de dur a terme la RT-PCR va ser necessari realitzar una sèrie de pretractaments de les mostres. Aquests pretractaments es basen en la digestió dels genomes virals no encapsidats i el DNA cel·lular per incubació de la mostra amb DNasa, i en l'alliberació del DNA viral encapsidat per digestió de les proteïnes de la càpsida amb proteïnasa K. El protocol a seguir, basat en el protocol descrit per Ma i col. (Ma *et al.*, 2001), es descriu a continuació:

Es van barrejar 5 µl de mostra amb 2 µg de DNasa, en un volum final de 20 µl, i la mescla es va incubar 30 min a 37°C. La DNasa es va inactivar per addició d'EGTA (20mM) i incubació durant 10 min a 37°C, seguit d'un procés d'inactivació per calor, durant 10 min a 90°C. A continuació, les proteïnes de la càpside es van digerir per incubació durant 45 min a 56°C en presència de 1 µg/µl proteïnasa K i 0.1% SDS. Finalment, la proteïnasa es va inactivar per incubació a 90°C durant 10 minuts. La RT-PCR es va dur a terme a partir de 2 µl de mostra diluïda 500 vegades amb aigua. Aquest tractament es va dur a terme per igual per totes les mostres, incloent les mostres de la recta patró.

RT-PCR

La tècnica de la PRC a temps real es basa en una cinètica de quantificació que permet determinar i enregistrar la formació de productes de PCR en temps real. Consisteix en quantificar, durant la fase exponencial de la reacció, els productes de PCR amplificats i marcats amb un fluorocrom. En aquest treball s'ha realitzat una quantificació absoluta d'un fragment de la regió viral L3 (proteïna de l'hexó) per PCR a temps real mitjançant una sonda taqman específica per l'hexó.

Per a la realització de la RT-PCR es va preparar una mix que contenia 2 µl de mostra (DNA a quantificar diluït 500 vegades), 5 µl de Premier Extaq 2X (Takara), 0,30 µl de cadascun dels encebadors (Ad18852 i Ad18919), 0.1 µl de sonda Taqman i 2.3 µl d'aigua. La seqüència dels encebadors i de la sonda utilitzats havien estat descrits prèviament (Smith *et al.*, 2002), i es detallen a la taula 7.

Les condicions d'amplificació que es van emprar eren:

- Un cicle de desnaturalització: 10 min a 95°C
- 40 cicles d'amplificació: 15 s a 95°C, 1 min a 60°C

Taula 7. Seqüències nucleotídiques dels encebadors i la sonda utilitzades per la quantificació de partícules virals per RT-PCR.

	Seqüència nucleotídica
Ad18852F	5'- CTTGATGATGCCGCAGTG - 3'
Ad18918R	5'- GGGCTCAGGTACTCCGAGG-3'
Sonda TaqMan	FAM-TTACATGCACATCTCGGGCCAGGAC-TAMRA

4.5.3. Determinació de les partícules virals funcionals (TU/ml) per tinció d'hexó

Aquest protocol es basa en contar el número de cèl·lules positives per a la immunotinció de la proteïna viral de l'hexó en una monocapa de cèl·lules infectada amb dilucions seriades del virus. Ens permet determinar el número de partícules funcionals, o unitats de transducció (TU), d'estocs virals purificats i d'extractes cel·lulars.

Es prepara un banc de dilucions de l'estoc viral, per triplicat, utilitzant 100 µl de medi de cultiu com a diluent en una placa de 96 pous. A continuació s'afegeix una suspensió cel·lular de 293 a raó de 100000 cèl·lules per pou. Després de 36 h d'incubació a 37 °C es procedeix a la immunodetecció. El medi de cultiu s'elimina i les cèl·lules es deixen assecar durant 10 minuts. A continuació es fixen amb metanol fred durant 10 minuts a -20 °C. El metanol es retira, i es fan tres rentats amb PBS⁺⁺ 1 % BSA. Seguidament, les cèl·lules s'incuben amb un anticòs primari anti-hexó (dil 1:5) durant 1 h a 37 °C. Es fan tres rentats més i s'incuba amb l'anticòs secundari conjugat al fluorocom Alexa 488. Després de tres rentats més, es determina el títol viral mitjançant el recompte de cèl·lules positives amb l'ajut d'un microscopi invertit de fluorescència. Per calcular el nombre d'unitats de transducció per ml⁻¹, s'usa la següent fórmula:

$$tu/ml = \frac{\text{mitjana del recompte de les cèl·lules positives} \times \text{factor de dilució} \times 1000 \mu l}{100 \mu l}$$

4.6. TÈCNiques EMPRADES PER LA CARACTERITZACIÓ DELS ADENOVIRUS

4.6.1. Mètodes per a l'obtenció del DNA de l'adenovirus

El DNA viral s'ha obtingut a partir de tres materials de partida diferents: a partir del sobrenedant de cèl·lules infectades, a partir de les cèl·lules infectades i finalment a partir dels virus purificats. A continuació es descriuen els tres procediments emprats i les indicacions d'ús per a cadascun d'ells.

Obtenció del DNA de l'adenovirus a partir del sobrenedant de cèl·lules infectades

Es parteix de 340µl del sobrenedant de cèl·lules infectades als quals s'afegeixen per a un volum final de 400µl:

- 16 µl EDTA 0.5M pH 8.0 (20 mM final)
- 20 µl SDS 10% (0.5% final)
- 8 µl proteïnasa K 10 mg/ml (0.2 µg/µl final)

La mescla s'incuba durant 2 hores a 56 °C. La proteïnasa K amb l'ajuda de l'SDS degrada la càpside proteica i l'EDTA intervé d'agent protector del DNA alliberat. La mescla es deixa temperar, el DNA s'extreu amb fenol:cloroform i es precipita amb etanol al 2 % d'acetat sòdic. Finalment, el pelet de DNA es resuspén en 25 µl d'aigua bidestil·lada.

Per aquest procediment s'obté molt poca quantitat de DNA i es fa servir quan no és possible obtenir el DNA a partir de les cèl·lules infectades ni del virus purificat.

Obtenció del DNA de l'adenovirus a partir de les cèl·lules infectades (Hirt's)

Aquest procediment s'ha fet servir per al cribratge dels clons aïllats a partir de l'assaig de formació de calbes. No cal disposar del vector purificat i permet l'obtenció de la quantitat de DNA suficient per a fer-ne un anàlisi de restricció i de seqüenciació.

Breument, s'infecten les cèl·lules 293 o A549 sembrades en una placa de 100 mm de diàmetre al 80% de confluència amb 1/10 part del llisat cel·lular. Quan l'efecte citopàtic es complert, l'extracte cel·lular total es recull i es centrifuga 5 minuts a 1250 rpm. Es retira el sobrenedant i el pelet cel·lular es dissol en 1.5ml de PBS i es passa a un tub tipus ependorf. Les cèl·lules es centrifuguen 5 minuts a 6000 rpm. El sobrenedant es retira i el pelet cel·lular es dissol en 350µl d'aigua bidestil·lada, als quals s'hi afegeixen 350 µl de la solució Hirt's 2X (10 mM Tris pH 8,0; 20 mM EDTA; 1,2% SDS i 200 µg/ml de proteïnasa K) i s'incuba a 56 °C durant una hora. A continuació, s'afegeixen 200µl de NaCl 5M (final 1M) gota a gota en agitació contínua emprant el vòrtex, i es deixa a 4°C entre 8 i 16 hores, fins que apareix un núvol blanc, que correspon al DNA cel·lular. Per tal d'eliminar el DNA cel·lular, la suspensió es centrifuga durant 30 minuts a 13000 rpm a 4 °C. El sobrenedant es recull i s'incuba a 37 °C amb RNAsa a concentració final de 100 µg/µl durant 1 hora. Es fa una extracció del DNA amb fenol:cloroform i es precipita amb etanol al 2% en acetat sòdic. Finalment, el DNA es dissol en 25 µl d'aigua bidestil·lada o Tris-EDTA (TE) pH 8.0.

Obtenció del DNA de l'adenovirus a partir del virus purificat

Aquest procediment s'ha fet per a comprovar la identitat de tots els adenovirus que han estat purificats en el marc d'aquest treball. El material de partida són els virus purificats. Normalment es prenen 2×10^{10} partícules virals, que es corresponen a 1 µg de DNA, al qual s'hi afegeix:

- EDTA pH 8.0 (16 µl 0.5M)
- SDS (20 µl 10%)
- Proteïnasa k (8 µl, 10 mg/ml)
- TE pH 8,0 fins a un volum final de 400 µl

La mescla s'incuba a 56 °C durant dues hores. A continuació, es fa una extracció amb fenol:cloroform del DNA i es precipita amb etanol al 2% en acetat sòdic. El pelet de DNA es dissol en 25 µl d'aigua bidestil·lada o TE pH 8.0.

4.6.2. Digestió amb enzims de restricció i seqüenciació del DNA de l'adenovirus

Ambdues tècniques s'han emprat per a la comprovació de la identitat dels adenovirus recombinants a partir del DNA viral, tant si ha estat obtingut a partir de les cèl·lules infectades o a partir dels virus purificats.

Digestió amb enzims de restricció

Es parteix aproximadament de 500-800 ng de DNA viral obtingut a partir de les cèl·lules infectades o del virus purificat i s'hi afegeix: 1 unitat d'enzim, el tampó adient a l'enzim proporcionat per la mateixa casa comercial 10X i aigua bidestil·lada (normalment les digestions s'han fet en un volum final de 40 µl). Per a la majoria dels enzims de restricció es deixa que la reacció de digestió tingui lloc durant 2h, a 37°C. Els fragments de la digestió es resolen juntament amb el DNA del vector no modificat com a control i amb un marcador de pes molecular comercial en gels d'agarosa preparada l'1 % en Tris Acetate-EDTA (TAE).

Els enzims de restricció emprats han estat: *HindIII* i *EcoRV*. El patró de digestió del DNA viral amb aquests enzims ens permet fer una valoració de la integritat del genoma viral.

Reacció de seqüenciació

Per a la seqüenciació del DNA viral es parteix de 100 ng del DNA viral, i s'hi afegeixen 5 µl de la mix de seqüenciació 3.1 de la casa comercial Applied Biosystems, 5 µl del tampó de seqüenciació 2X (conté els dNTPs i ddNTPs, cadascun d'ells marcat amb un fluorocrom diferent) i 3.2 pmols de l'encebador, i s'afegeix aigua bidestil·lada fins a un volum final de 10µl. Les condicions de la reacció de seqüenciació són 24 cicles de 30 segons a 96 °C, 15 segons a 50 °C i 4 minuts a 60 °C.

Les reaccions de seqüència es van analitzar amb un seqüenciador automàtic al Servei de Seqüenciació i Genòmica dels Serveis Científics de la Universitat de Barcelona.

4.6.3. Electroforesi de les proteïnes majoritàries de la càpside de l'adenovirus

Es parteix de 5×10^{10} partícules virals purificades de cada vector que es vulgui analitzar, en un tub d'1.5ml tipus ependorf. Per desnaturalitzar les proteïnes adenovirals les mostres es dilueixen 1/5 en tampó de càrrega que les desnaturalitza (50% de glicerol; 5% SDS; 0,5% blau de bromofenol; 5% β -mercaptoetanol en Tris 630mM pH 6.8), i es bullen durant 5 minuts a 95°C. Les mostres es deixen temperar i es resolen en un gel d'acrilamida-SDS al 10%.

Per a la visualització de les proteïnes es fa una tinció amb nitrat de plata i es fa un revelat amb carbonat. A continuació es descriu breument el procediment a seguir per a la tinció i el revelat de les proteïnes:

Les proteïnes resoltes en el gel es fixen durant 30 min en agitació en 100ml de la solució de fixació (40% EtOH i 10% àcid acètic). A continuació, el gel s'incuba durant un mínim de 30 min amb 100 ml de la solució de pretractament (0.02% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, 30% EtOH, 6,8% acetat de sodi). El gel es renta tres vegades amb aigua ultrapura, miliQ i les proteïnes es tenyeixen durant 20 minuts a temperatura, protegint el gel de la llum, amb 100 ml de la solució de tinció (0,2% AgNO_3 ; 0,015 % formaldehid). A continuació, es fan tres rentats de 20 segons amb aigua ultrapura, miliQ i el gel es revela durant 1 a 10 minuts amb 100ml de la solució de revelat (2.5% NaCO_3 , 0.007% formaldehid) fins que es visualitzin les proteïnes desitjades. Per aturar la reacció, es fan dos rentats opcionals, de dos minuts amb aigua ultrapura, miliQ i el gel es submergeix durant 10 minuts en 100ml de la solució de parada (40 mM EDTA). Per tal de conservar el gel, es renta tres vegades durant 5 minuts amb aigua miliQ i es conserva amb una solució de preservació (30% EOH, 4% glicerol).

5. ASSAJOS *IN VITRO* AMB ELS ADENOVIRUS RECOMBINANTS

5.1. CARACTERÍSTIQUES DE LES LÍNIES CEL·LULARS

En aquest treball s'ha utilitzat una línia cel·lular especial per al treball amb adenovirus i unes altres línies cel·lulars tumorals que han estat emprades per l'estudi *in vitro* i *in vivo* de les propietats transduccionals dels adenovirus recombinants. Les línies cel·lulars utilitzades, així com els seus orígens, es resumeixen a en la Taula 8. A continuació es descriuen breument les característiques de les línies cel·lulars emprades en aquest estudi.

Taula 8. Línies cel·lulars utilitzades en aquest treball.

Línia cel·lular	Origen
293	Ronyó embrionari humà, E1A E1B
A549	Carcinoma de pulmó humà
NP9	Adenocarcinoma pancreàtic humà
NP18	Adenocarcinoma pancreàtic humà
PC3	Carcinoma de pròstata humà
SKMe128	Melanoma humà

5.1.1. Cèl·lules HEK 293

Les cèl·lules 293 (HEK293), deriven de cèl·lules primàries de ronyó embrionari humà que han estat transformades amb l'11% de l'extrem esquerra del genoma de l'adenovirus, incloent el gen E1A (Graham et. al, 1997). Les cèl·lules 293 són altament permissives a la infecció i al creixement dels adenovirus, i són fàcilment transfectables pel mètode del clorur càlcic. Són cèl·lules empaquetadores, i s'empren per a la generació, l'amplificació i la titulació dels adenovirus.

5.1.2. Línies tumorals humanes

Les línies cel·lulars tumorals humanes NP9 i NP18 han estat establertes en el Servei de Digestiu del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona i han estat cedides pel Laboratori d'Investigació Gastrointestinal del mateix hospital (Villanueva *et al.*, 1998). Aquestes dues línies cel·lulars deriven d'adenocarcinomes pancreàtics humans implantats en el pàncrees de ratolins atímics i que van ser perpetuats en ratolins com a xenoempelts. La resta de les línies cel·lulars han estat obtingudes de la ATCC (*American Type Cell Culture*).

5.2. CONDICIONS DE CULTIU DE LES LÍNIES CEL·LULARS

Totes les línies cel·lulars emprades en aquest estudi creixen formant una monocapa cel·lular amb morfologia epitelial adherida al suport sòlid en el qual es cultiven. Totes les línies cel·lulars es mantenen amb DMEM (*Dulbecco's Modification of Eagle's Medium* Gibco BRL) complementat amb un 5% de sèrum fetal boví (FBS, Gibco BRL) prèviament inactivat en un bany humit durant 30 minuts a 56°C. Als medis de cultiu s'ha afegit una mescla dels antibiòtics penicil·lina i estreptomicina; 100U/ml i 100µg/ml, respectivament, en una proporció 1:100 (Gibco BRL). En tots els casos, el medi es renova cada 2-3 dies per aspiració del medi vell i addició del medi nou i les cèl·lules es mantenen en un incubador humidificat a 37°C en una atmosfera al 5% en CO₂.

5.3. CONTATGE CEL·LULAR

Per determinar el nombre de cèl·lules d'un cultiu i sembrar-ne la quantitat desitjada, les cèl·lules es tripsinitzen (Trypsina-EDTA de Gibco BRL) i es resuspenen en DMEM al 5% FBS. De la suspensió cel·lular es pren una alíquota i se'n fa una dilució amb el colorant blau de tripà, de manera que es puguin comptar entre 10 i 100 cèl·lules per quadrant de la cambra de Neubauer o hemocitòmetre. El blau de tripà penetra en l'interior de la cèl·lula únicament quan la membrana cel·lular està deteriorada. Per recompte de cèl·lules viables en una solució cel·lular, es conten les cèl·lules viables presents a cadascun dels 4 o 8 quadrants de la cambra de Neubauer i es fa una mitjana. El càlcul de cèl·lules per ml es realitza segons la següent fórmula:

$$\text{N}^\circ \text{ cèl·lules / ml} = \text{Mitjana del n}^\circ \text{ de cèl·lules viables per quadrant} \times \text{dilució} \times 10^4$$

Aquest fet permet determinar la concentració i el percentatge de viabilitat del cultiu cel·lular. Finalment, les cèl·lules es resuspenen amb el medi que sigui necessari per a portar les cèl·lules del cultiu a la concentració desitjada.

5.4. CONGELACIÓ I DESCONGELACIÓ DE LES LÍNIES CEL·LULARS

Per a la congelació de les cèl·lules, es tripsinitzen les cèl·lules, es renten dues vegades amb PBS, i es compten tal i com s'ha indicat en l'apartat anterior. Les cèl·lules es porten a una concentració d'entre 5 i 20 milions de cèl·lules per ml en medi de congelació. El medi de congelació conté un 90% FBS inactivat i un 10% de l'agent crioprotector, DMSO (Di-metil-sulfòxid, Sigma).

La suspensió cel·lular es distribueix a raó de 0.5 ml per criotub i els vials es congelen en un tanc d'alcohol isoamílic, que col·locat a -80°C disminueix la temperatura progressivament. A partir de les 4h les alíquotes ja es poden passar als tancs de nitrogen líquid per a ser emmagatzemades.

Per a la descongelació, es passen les cèl·lules del tanc de nitrogen líquid a un bany a 37°C , per a que la descongelació sigui ràpida. La suspensió cel·lular es passa a un tub de 15 ml tipus falcon i es fa una centrifugació suau de 5 minuts a 1250 rpm. El medi de congelació es canvia per aspiració i les cèl·lules es suspenen amb el medi de cultiu que es correspongui per a cadascuna de les línies cel·lulars, temperat a 37°C . A les 16h les cèl·lules estan majoritàriament adherides i es fa un canvi de medi per a eliminar les cèl·lules mortes.

5.5. CONTROL DE MICOPLASMA EN LES LÍNIES CEL·LULARS EN CULTIU

La contaminació per micoplasma passa visualment desapercibuda en els cultius i en pot afectar els resultats experimentals. El test de micoplasma s'ha realitzat de forma rutinària en totes les línies cel·lulars en cultiu. Aquest test està basat en la detecció del microorganisme per PCR amb els encebadors MICO-1 i MICO-2 (Taula 9).

Taula 9. Seqüència aminoacídica dels encebadors utilitzats per la detecció de micoplasma.

	Seqüència aminoacídica
MICO-1	5'- GGCGAATGGGTGAGTAACACG-3'
MICO-2	5'-CGGATAACGCTTGCGACTATG-3'

Breument: per a la realització de la PCR es parteix del medi de les cèl·lules quan hagin passat 5 dies de cultiu en situació de confluència i en absència d'antibiòtics. Si per PCR es detecta la presència de micoplasma, aleshores el test es dóna per positiu i es procedeix a la desmicoplasmatització de les cèl·lules. El tractament es fa amb plasmosina (Plamocin TM) i després del tractament es realitza de nou el test per confirmar-ne l'eliminació.

5.6. ANÀLISI DE L'EXPRESSIÓ D'ÀCID HIALURÒNIC DE LES LÍNIES CEL·LULARS EN CULTIU.

La concentració d'HA es va mesurar mitjançant un assaig similar a l'ELISA descrit originàriament per Underhill i col. (Underhill *et al.*, 1993) amb algunes modificacions (Serra *et al.*, 2004).

5.6.1. Obtenció de les mostres.

Per a l'obtenció de les mostres, es van sembrar les diferents línies cel·lulars en plaques de cultiu de 100 mm amb 10 ml de DMEM al 5% FBS. Quan les cèl·lules van arribar a un 60 % de confluència, es va retirar el medi de cultiu de les cèl·lules, i s'hi va afegir 4 ml de DMEM fresc, sense FBS. Les cèl·lules es van incubar 24 h més, i a continuació el medi es va retirar, es va aliquotar i es va conservar a -20°C fins al moment de l'anàlisi. Les cèl·lules presents a la placa es van tripsinitzar i es van contar segons protocol descrit a l'apartat 5.3.

Abans de la quantificació de l'àcid hialurònic, 600 µl de les mostres es van incubar amb pronasa, a una concentració final de 0,1 mg/ml a 37°C durant tota la nit.

5.6.2. Quantificació de l'àcid hialurònic (HA)

Per a la quantificació l'àcid hialurònic present a les mostres, l'HA de les mostres es va incubar amb una proteïna d'unió a l'àcid hialurònic marcada amb biotina (HABP-B, Seidagaku Amèrica, 400763-1A). La proteïna HABP-B sobrant es va incubar amb l'HA immobilitzat a la placa, i es va determinar mitjançant un sistema de detecció avidina-biotina-peroxidasa. La concentració d'àcid hialurònic es va determinar mitjançant una recta patró. El protocol que es va seguir es detalla a continuació:

Una solució de 20 µg/ml d'HA es va immobilitzar en una placa de 96 pous (Nunc) per incubació durant 2 h a 4°C. A continuació les plaques es van rentar amb PBS i es van bloquejar amb PBS amb un 10 % de sèrum de vedell durant 3 h a 4°C.

Per una altra banda, es va preparar unes solucions estàndard d'HA a concentracions de 50 a 1000 ng/ml. A continuació es van barrejar 130 µl de les solucions estàndard i de les mostres de sobrenedant amb 130 µl d'una solució d'HABP-B a 5 µg/ml en PBS al 10% de sèrum de vedell. Les mesclades es van incubar durant 3-6 h a 4°C.

A continuació, es va eliminar la solució de bloqueig de la placa de 96 pous amb l'HA immobilitzat i es va afegir 80 µl de cada una de les mostres o solucions patró per triplicat. La placa es va incubar tota la nit a 4°C. El dia següent, les solucions es van retirar, i els pous es van rentar amb PBS. A continuació es van afegir 100 µl del complex ABC (Avidina-Biotina-Peroxidasa; ABC KIT PK-4000; Vectastain) a cada pou i es va incubar a temperatura ambient durant 30 minuts. Passat aquest temps, es va retirar la solució ABC, els pous es van rentar amb PBS, i es va afegir 70 µl de solució substrat a cada pou. La solució substrat es va usar acabada de preparar per dissolució de 15 mg AEBT (Sigma) en 30 ml de tampó citrat 0,1 M i addició de 30 µl d'aigua oxigenada (H₂O₂). Els pous es van incubar amb la solució substrat durant 30 minuts a temperatura ambient. Els pous positius es van tornar de color blau pàl·lid, i la reacció colorimètrica es va aturar per addició de 100 µl d'àcid sulfúric (H₂SO₄) 1M a cada pou. La lectura de l'absorbància es va realitzar a una longitud d'ona de 450 nm. Les concentracions d'àcid hialurònic (ng / ml) es van determinar per extrapolació a partir de la recta patró. Finalment, la concentració d'àcid hialurònic es va expressar com a ng d'HA/10⁶ cèl·lules.

5.7. ASSAJOS DE PRODUCCIÓ VIRAL DELS ADENOVIRUS RECOMBINANTS

Per tal de realitzar els assajos de producció viral, es sembla un número conegut de cèl·lules en plaques de 24 pous en un volum de 1 ml de medi, per a que en el moment de la infecció estiguin a una confluència del 80%. Per a la infecció de les cèl·lules, es retira el medi de cultiu per aspiració i les cèl·lules s'infecten per triplicat amb 500 µl de les dilucions virals, prèviament preparades. Les dilucions virals es preparen en unitats de transducció per cèl·lula (TU/cèl·lula o m.o.i), de manera que s'infectin el 80% de les cèl·lules en cultiu. El número de m.o.i necessari per assolir la infecció del 80% de les cèl·lules en cultiu depèn de cada línia cel·lular emprada: les A549 i les PC3 es van infectar amb 10-20 m.o.i de virus, mentre les SKMe128 i les NP9 es van infectar amb 30-40 m.o.i.

Les cèl·lules es mantenen en contacte amb les dilucions virals durant quatre hores a 37°C. Passat aquest temps, es retira el medi d'infecció per aspiració, es renten les cèl·lules tres vegades amb PBS, per tal d'eliminar el virus romanent i s'addiciona medi fresc. El sobrenedant i l'extracte cel·lular total (sobrenedant més cèl·lules) es recullen a diferents hores post-infecció, depenent del tipus d'experiment. En general, es pren una mostra a temps curts (de 4 a 12 hores) i una mostra a temps final (quan totes les cèl·lules en cultiu han estat eliminades pels virus, i l'efecte citopàtic és total). A temps curts, el virus present en la mostra correspon al virus romanent de la infecció. Les mostres recollides a temps final ens permeten quantificar la totalitat del virus produït i el tan per cent de virus eliminat al sobrenedant. En els experiments que s'ha

volgut obtenir informació sobre la cinètica de producció viral, les mostres s'han recollit, a més a més, cada 24 hores.

Un cop recollides les mostres, es fan tres cicles de congelació i descongelació dels extractes cel·lulars, per tal de lliurar les cèl·lules i alliberar el virus al medi de cultiu. Els extractes cel·lulars es centrifuguen 5 minuts a 6000 rpm i els sobrenedants lliures de cèl·lules es titulen pel mètode de la tinció d'hexó, o es preparen per la titulació per PCR a temps real. Les mostres de sobrenedant es titulen directament sense necessitat de fer els cicles de congelació i descongelació i sense necessitat de centrifugar-los.

5.8. ASSAIG DE COMPETICIÓ

En l'assaig de competició, es van coinfectar les cèl·lules A549 i les cèl·lules PC3, sembrades en plaques de 100 mm³ amb 20 m.o.i dels adenovirus Adwt i Adwtorf123. Quan l'efecte citopàtic era complert, es recollien 500 µl de sobrenedant i es congelaven a -80°C. Aquest primer sobrenedant s'anomenava passatge 1 (p1). La resta de sobrenedant, juntament amb l'extracte cel·lular total, es recollia, i els virus s'alliberaven de les cèl·lules mitjançant tres cicles de congelació i descongelació. Els extractes cel·lulars es centrifugaven 5 min a 1250 rpm i 2 ml de sobrenedant s'utilitzaven per la infecció d'una nova placa de 100 mm³ amb cèl·lules A549 o PC3. Aquest procediment es repetia fins a 5 vegades. Un cop finalitzat l'assaig de competició, s'extreia el DNA viral dels sobrenedants dels diferents passatges (p1-p5) segons el protocol descrit a l'apartat 4.6.1.

L'anàlisi del DNA dels sobrenedants es va fer per amplificació per PCR amb encebadors específics per la regió E4 (Ad33832 i Ad35825) descrits a la taula 10. L'amplificació de la regió E4 de l'adenovirus salvatge Adwt amb aquests encebadors donava un fragment de 1993 pb, mentre l'amplificació de la regió E4 de l'Adwtorf123 amb els mateixos encebadors donava un fragment de 977 pb. La resolució dels fragments obtinguts per PCR es va realitzar en un gel d'agarosa a l'1% en tris-acetat-EDTA (TAE). Com a marcador es va utilitzar el marcador d'1kb (1kb ladder, Invitrogene). Degut a que la PCR del fragment de 997 pb es veu afavorida respecte el fragment de 1993 pb, concentracions similars dels virus Adwt i Adwtorf123 en els sobrenedants cel·lulars no corresponen a fragments de PCR d'intensitats similars en el gel d'agarosa. Per tal d'analitzar la relació entre la intensitat de les bandes en el gel d'agarosa i les proporcions d'Adwt i Adwtorf123 es va realitzar una recta patró a partir de barreges dels plasmidis p3602 (que conté el genoma de l'adenovirus salvatge) i pAdwtorf123. La recta patró, també es va analitzar per PCR amb els mateixos encebadors.

Taula 10. Seqüència nucleotídica dels encebadors utilitzats per l'anàlisi de la regió E4 en l'assaig de competició.

	Seqüència nucleotídica
Ad33832F	5'- GCGTTAGAACCATATCCCA - 3'
Ad35825R	5'- GGGCGGAGTAACTTGTATG – 3'

5.9. ANÀLISI DE LA CITOTOXICITAT

L'anàlisi de la citotoxicitat dels diferents adenovirus replicatius es basa en la mesura de la viabilitat cel·lular després de l'exposició de les cèl·lules tumorals al virus. En aquest treball s'han utilitzat tres mètodes per mesurar la viabilitat cel·lular: l'anàlisi de la proteïna total, el comptatge cel·lular, i l'anàlisi de l'activitat metabòlica mitocondrial.

5.9.1. Anàlisi de la proteïna total

Per l'anàlisi de la viabilitat cel·lular mitjançant la quantificació de la proteïna total, es va utilitzar l'assaig de l'àcid bicinconínic (BCA) (Pierce Biotechnology, Rockford, IL). Aquesta tècnica combina la reducció d'ions Cu^{2+} a Cu^{1+} per part de les proteïnes quan es troben en un medi alcalí (que es coneix com la reacció de Biuret), junt amb l'elevada sensibilitat i selectivitat que tenen aquests ions (Cu^{1+}) de ser detectats utilitzant l'àcid bicinconínic. La reacció de dos molècules de BCA amb un Cu^{1+} genera un producte de color violeta, l'absorbància del qual es pot llegir a una longitud d'ona de 562 nm.

Per realitzar l'assaig de citotoxicitat, es van preparar unes dilucions seriades dels estocs virals, per quadruplicat, utilitzant medi de cultiu com a diluent en plaques de 96 pous. Les dilucions virals es van preparar perquè el volum final per pou fos de 50 μl . La concentració viral al primer pou va ser de 180 a 250 m.o.i, segons la línia cel·lular. Les dilucions seriades realitzades van ser 1/5, en el cas de les cèl·lules A549 i les cèl·lules PC3, o 1/3, per les SKMel-28 i les NP9. A continuació es va afegir 100 μl d'una suspensió cel·lular a raó de 2×10^4 (A549) o 1×10^4 (PC3, SKMel-28 i NP9) cèl·lules per pou. Entre els dies 5 i 8 després de la infecció, depenent de la línia cel·lular, es va procedir a la determinació de la viabilitat cel·lular per tinció del contingut proteic per pou. Breument, el medi d'infecció es va retirar, i les cèl·lules es van rentar amb PBS per tal d'eliminar el FBS romanent del medi de cultiu. A continuació, les cèl·lules es van resuspendre amb 200 μl de la solució BCA, i es van incubar a 37 °C durant 30 minuts. Finalment, l'absorbància es va quantificar a 540 nm.

Pels assajos de citotoxicitat realitzats en presència d'anticossos neutralitzants antiadenovirals, el procediment va ser el mateix, però 2 hores després de la infecció cel·lular, i cada 48 hores, es van afegir els anticossos neutralitzants. Aquests anticossos van ser obtinguts en ous de gallina, després d'inocular la gallina amb tres dosis d'un adenovirus serotip 5 purificat.

Les corbes dosi-resposta es presenten com la viabilitat relativa prenent com a 100% de supervivència cel·lular els pous de cèl·lules no infectades. La determinació de la IC50 (quantitat de virus necessari per llisar el 50% de les cèl·lules en cultiu) va ser estimada a partir d'unes corbes dosi-resposta per regressió estàndard no lineal (GraFit; Erithacus Software Ltd., Surrey, United Kingdom) utilitzant una adaptació de l'equació de Hill.

5.9.2. Recompte cel·lular

L'anàlisi de la viabilitat cel·lular mitjançant el recompte de cèl·lules viables es va utilitzar per analitzar la citotoxicitat dels virus replicatius armats amb la glicoproteïna GALV. El procediment a seguir per la infecció cel·lular va ser el mateix que el ja explicat en l'apartat anterior (5.9.1). La determinació de la viabilitat cel·lular es va realitzar a punt final de l'experiment (entre dia 5 i dia 8, depenent de la línia cel·lular), o en diferents temps al llarg de l'experiment (després de 72h, 96h, dia 5, 6 o 7 després de la infecció), depenent del tipus d'assaig. En aquests punts, es va retirar el medi d'infecció dels pous a contar, i les cèl·lules es van tripsinitzar i resuspendre en DMEM al 5% de FBS. La suspensió cel·lular es va diluir amb el colorant blau de tripà, i les cèl·lules viables es van contar en una cambra de Neubauer. El tant per cent de supervivència cel·lular es va determinar dividint el número de cèl·lules viables dels pous infectats pel número de cèl·lules viables dels pous controls no infectats.

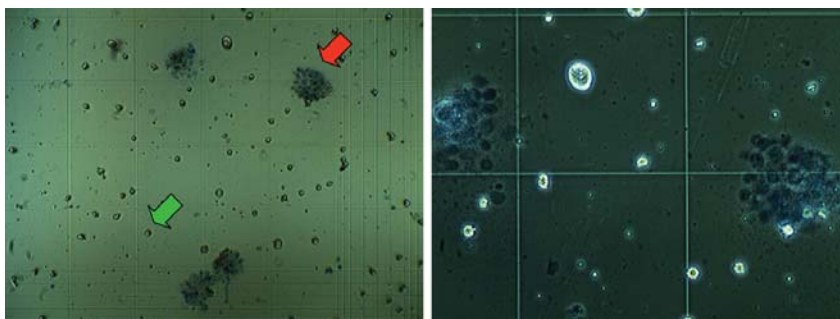


Figura 4. Anàlisi de la citotoxicitat per recompte cel·lular. Després de la tinció amb blau de tripà, les cèl·lules mortes queden tenyides de color blau, mentre les cèl·lules vives són capaces d'excloure el colorant, i es veuen transparents i refringents. La fletxa vermella indica un sinciti, on les cèl·lules fusionades, amb la membrana danyada queden tenyides pel colorant blau de tripà. La fletxa verda assenyala una cèl·lula viable. El recompte de cèl·lules viables es realitza segons el protocol explicat a l'apartat 5.3.

5.9.3 Anàlisi de l'activitat metabòlica mitocondrial.

Per l'anàlisi de la viabilitat cel·lular mitjançant l'anàlisi de l'activitat metabòlica mitocondrial, es va utilitzar l'assaig MTT [bromur de 3-(4,5-dimetietiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium] (Sigma, St.Louis, Mo).. Aquest és un assaig colorimètric que es basa en la transformació, per part de les deshidrogenases de les mitocòndries de les cèl·lules metabòlicament actives, d'unes sals de tetrazole grogues (MTT) a uns cristalls de formazan de color violeta. Aquests cristalls es solubilitzen amb dimetilsulfòxid (DMSO) de manera que es pot quantificar l'absorbància de la mostra.

Per a realitzar aquest assaig, les cèl·lules es van sembrar en plaques de 24 pous, i es van realitzar els tractaments corresponents. Un cop finalitzat l'experiment, el medi d'infecció es va retirar, es va afegir medi fresc amb 0,75 mg/ml de MTT, i es va incubar a 37°C durant 1h per permetre la formació dels cristalls. Els cristalls es van dissoldre amb DMSO, i una alíquota de cada pou es va traspasar a una placa de 96 pous per tal de mesurar la densitat òptica dels cristalls dissolts en un lector d'ELISA, a 550 nm. El valor d'absorbància obtingut correlaciona amb el número de cèl·lules metabòlicament actives presents en el cultiu cel·lular.

5.10. DETECCIÓ DE L'EXPRESSIÓ DE LA PROTEÏNA F PER IMMUNOFLUORESCÈNCIA

Per analitzar l'expressió de la glicoproteïna F, es van fer créixer cèl·lules NP9 sobre cobreobjectes de vidre en plaques de 24 pous a raó de 2×10^4 cèl·lules per pou. 24 h després de la sembra, les cèl·lules van ser infectades amb els virus AdwtRGD-F, AdwtRGD i AdF a una multiplicitat d'infecció de 5 m.o.i. A les 4 hores post-infecció, el virus va ser retirat, les cèl·lules van ser rentades amb PBS i cultivades amb medi fresc lliure de virus. A les 96 hores post-infecció, les cèl·lules van ser fixades amb paraformaldehid al 3% i permeabilitzades amb tritó X-100 al 0,05%. Seguidament es va procedir al bloqueig amb BSA al 3% en PBS i a la incubació durant 1 hora amb un anticòs monoclonal generat contra la proteïna F, que va ser facilitat pel Dr. Richard Randall del Departament de Bioquímica i Microbiologia de la Universitat de St. Andrews (Randall *et al.*, 1987). Passat aquest temps, les cèl·lules es van rentar i es van exposar a un anticòs secundari conjugat amb la cianina 2 (IgG Goat anti-mouse Cy2, Amersham) durant 1 hora més. Finalment, els nuclis van ser tenyits amb iodur de propidi, i els cristalls es van muntar sobre portaobjectes. Les mostres van ser analitzades per microscopia de fluorescència (Leica DMRB) i microscopia confocal (Leica SP2).

5.11. AVALUACIÓ DE L'EFECTE DE LA TEMPERATURA, LA TRIPSINA I LA PROTEÏNA HN SOBRE LA PROTEÏNA F.

Per la realització d'aquest assaig, les cèl·lules SKMel28 es van sembrar en plaques de 24 pous a confluència. 24 hores després de la sembra les cèl·lules SKMel28 es van infectar amb 2 m.o.i d'AdwtRGD-F i AdwtRGD o PBS. Un cop infectades, les cèl·lules van rebre un dels tractaments explicats a continuació:

Per tal de realitzar l'assaig en presència de la proteïna HN, en el moment de la infecció amb els adenovirus d'AdwtRGD-F i AdwtRGD o PBS, les cèl·lules es van coinfectar amb 20 m.o.i del virus Ad-HN, un vector adenoviral no replicatiu prèviament construït al nostre laboratori, que expressa la proteïna homotípica HN sota el promotor CMV. La infecció a 20 m.o.i permet un 100% d'infecció i per tant l'expressió de la proteïna HN per totes les cèl·lules del cultiu.

Per realitzar l'assaig en presència de temperatures elevades, 48 hores després de la infecció, i cada 24 hores es va procedir a incubar les cèl·lules durant 30 minuts a 42 °C.

Per realitzar l'assaig en presència d'una proteasa, 48 hores després de la infecció, i cada 48 hores, es va afegir al medi tripsina-TPCK (Sigma, St.Louis, Mo) a una concentració de 5 µg/ml.

L'aparició dels sincitis es va monitoritzar diàriament. Als 6 dies post-infecció, es va procedir a la determinació de la viabilitat cel·lular segons el mètode MTT (Sigma, St.Louis, Mo).

5.12. HIBRIDACIÓ *IN SITU* PER FLUORESCÈNCIA (FISH)

La hibridació *in situ* per fluorescència (FISH) es va utilitzar per a la detecció del DNA viral en el nucli de les cèl·lules tumorals infectades. Com a sonda es va utilitzar el DNA del virus AdwtRGD-GALV marcat per nick-translation. El protocol que es va seguir és una modificació del protocol descrit anteriorment per Nadal i col. (Nadal *et al.*, 2007).

5.12.1. Preparació de les mostres.

Les cèl·lules SKMel28 es van sembrar en pous de 24 sobre un cobreobjectes circular situat al fons del pou. Quan les cèl·lules van arribar a un 80-100 % de confluència es van infectar amb 0.5 m.o.i del virus AdwtRGD-GALV. Tres dies després de la infecció, es va retirar el medi dels pous i les cèl·lules es van fixar per incubació amb 1 ml de metanol fred durant 6 min a -20°C. A continuació, es va eliminar el metanol, i les mostres es van fixar durant 15 minuts a temperatura

ambient amb paraformaldehid a l'1%. Passat aquest temps, les cèl·lules es van rentar tres vegades amb PBS i l'RNA de les mostres es va eliminar per digestió amb una solució de RNasa 50 µg/ml en PBS amb clorur magnèsic (MgCl₂) 5mM pH7, durant 30 minuts a 37 °C. Finalment, es van rentar les cèl·lules tres vegades amb PBS i els cobreobjectes amb les cèl·lules es van deixar eixugant-se durant 5 minuts.

5.12.2. Preparació de la sonda.

Per la preparació de la sonda, el DNA de l'AdwtRGD-GALV, obtingut pel mètode Hirt's (apartat 5.6.1) es va marcar mitjançant la tècnica de la *nick translation*. Aquesta tècnica es basa en la digestió del DNA a marcar mitjançant la DNasa I, i la incorporació de nous nucleòtids no marcats (dATP, dTTP, dGTP i dCTP) i també de nucleòtids marcats (dUTP) amb fluorescència mitjançant la DNA polimerasa I. En aquesta tesi, els nucleòtids dUTP usats estaven marcats amb espectre verd (FITC). El marcatge de les sondes es va realitzar amb el *Nick translation* Kit, de Vysis, en un volum final de 50 µl segons les instruccions del fabricant. Una vegada acabat el marcatge, la concentració i la qualitat de la sonda es comproven corrent 6 µl de la sonda en un gel d'agarosa al 2%. La sonda apareix com una pinzellada de DNA en el gel d'agarosa observat sota la llum ultraviolada.

A continuació, es van precipitar les sondes per tal d'eliminar els dNTP's sobrants. Per la precipitació, es barreja una part de la sonda marcada amb 0.1 V d'acetat sòdic 3M (pH5,5) i 2,5 V d'etanol absolut fred, i es deixa precipitar a -20°C durant un mínim de 15 minuts. A continuació, la mescla es centrifuga a 12000 rpm durant 30 minuts. El sobrenedant s'elimina, i la sonda es resuspén amb 20 µl de formamida desionitzada. A continuació, s'afegeixen 20 µl d'una solució desnaturalitzant que conté dextrà sulfats al 20% i SSC al 12% en aigua.

5.12.3. Hibridació fluorescent in situ.

Per la hibridació fluorescent *in situ*, 3 µl de la sonda precipitada i resuspensa en la solució desnaturalitzant es diposita sobre un portaobjectes. Els cobreobjectes amb les cèl·lules infectades i fixades es dipositen sobre la gota amb la sonda, i es segellen amb cola perquè la solució no s'evapori. A continuació, els portes es deixen durant 4 min en una estufa a 80°C per desnaturalitzar la sonda i les cadenes de DNA. Les mostres es deixen hibridant tota la nit a 37°C en una cambra humida.

Després de la hibridació, els cobreobjectes es desenganxen dels portaobjectes amb cura, i els cobreobjectes es renten en una solució de 0,4x SSC calenta a 74°C, agitant varies vegades. A

continuació es fa un rentat de 2 min a temperatura ambient amb una altra solució de 2x SSC amb tween 20 (0,1%). Aquests rentats permeten eliminar les cadenes de DNA que no han hibridat bé. Finalment, els cobreobjectes es deshidraten en una bateria d'etanols, i es munten amb un medi de muntatge amb DAPI per tal de tenyir els nuclis cel·lulars. Els portaobjectes es desen a 4°C en la foscor fins al moment de la seva observació.

5.13. ANÀLISI DE L'ACTIVITAT HIALURONIDASA

L'anàlisi de l'activitat hialuronidasa es va realitzar mitjançant l'anàlisi dels oligosacàrids d'àcid hialurònic generats després de posar en contacte el sobrenedant de cèl·lules infectades amb virus que expressen la PH20 i l'àcid hialurònic d'alt pes molecular. Aquest mètode, descrit per Ikegami-Kawai (Ikegami-Kawai and Takahashi 2002), es basa en l'electroforesi dels oligosacàrids, resultants de la digestió, en un gel de poliacrilamida, i la posterior detecció mitjançant un protocol de tinció combinat, amb blau d'alcià i nitrat de plata. A continuació es detallen els processos d'obtenció de les mostres, de digestió de l'àcid hialurònic amb la hialuronidasa PH20, i d'anàlisi dels oligosacàrids.

5.13.1 Obtenció de les mostres

Per a l'obtenció de les mostres, es van infectar cultius cel·lulars de la línia A549 amb els diferents virus a una multiplicitat d'infecció que permetés la infecció del 80% de les cèl·lules en cultiu (m.o.i de 20). Després de 24 h, el medi d'infecció es va retirar i es van afegir 4 ml de DMEM 1% P/S fresc (sense FBS). Passades 24 h més, el sobrenedant es va recollir i es va concentrar per filtració en una columna de Amicon Ultra-4 (Millipore, Billerica, USA), segons les instruccions del fabricant. Les mostres concentrades (2.5 µl) es van incubar a 37°C durant tota la nit amb 62.5 µl d'una solució d'àcid hialurònic (1.5 mg/ml)(Sigma) en un tampó fosfat (pH=6) que contenia 0.1 M NaCl i 0.05% BSA. En aquestes condicions, la hialuronidasa PH20 alliberada al sobrenedant de les cèl·lules en cultiu, hauria de digerir l'àcid hialurònic d'alt pes molecular en petits fragments, d'entre 10 i més de 50 oligosacàrids.

5.13.2. Microanàlisi dels oligosacàrids d'àcid hialurònic per electroforesi en gel d'acrilamida.

Per l'anàlisi dels oligosacàrids d'àcid hialurònic, les mostres d'HA digerides es van barrejar amb 1/5 volum de tampó TBE 2M sucrosa, i es van carregar en un gel petit (8x9x0.1) de poliacrilamida al 15% en TBE (15% poliacrilamida; 0,5% N,N'-metilenbisacrilamida; 0,1M Tris-borat-1mM EDTA, pH 8.3). Les mostres es van córrer a la cambra freda (4°C) amb les següents

condicions: 20 min a 250V, 10 min a 580 V i 15 min a 450 V. A continuació, les mostres es van fixar submergint el gel durant 30 minuts en una solució al 0,05% de blau alcià en aigua, protegint el gel de la llum. El gel es va destenyir per submersió en aigua miliQ autoclavada durant 30 minuts, i els oligosacàrids es van revelar per tinció amb nitrat de plata, segons el protocol descrit a l'apartat 4.6.3, començant directament aplicant la solució de pretractament.

6. TÈCNiques EMPRADES EN ELS ASSAJOS *IN VIVO* EN RATOLINS AMB ADENOVIRUS RECOMBINANTS

6.1. SOQUES DE RATOLINS EMPRADES I CONDICIONS D'ESTABULACIÓ.

Per a la realització d'aquest treball s'han utilitzat ratolins immunocompetents de la soca Balb/C, per als assajos de toxicitat i ratolins atímics Balb/C nu/nu per als assajos d'eficàcia. En tots els casos els animals eren mascles de 4-8 setmanes d'edat, amb un pes de 20-30 grams. Els animals es mantenien estabulats a una temperatura controlada d'entre 22-24°C amb un cicle de llum/foscor de 12 h i una dieta estàndard amb aigua i menjar *ad libitum*.

La manipulació i la estabulació dels animals s'ha realitzat a les instal·lacions de l'IDIBELL (AAALAC, unitat 105) d'acord amb les recomanacions de la federació FELASA (*Federation of European Laboratory Animal Science Associations*) per al correcte tractament i ús dels animals de laboratori i sota l'aprovació del comitè ètic d'experimentació animal de l'Institut de Recerca Oncològica-IDIBELL.

6.2. IMPLANTACIÓ SUBCUTÀNIA DE CÈL·LULES TUMORALS

Les cèl·lules tumorals es sembren en plaques de cultiu de 150 mm de diàmetre i es mantenen en les condicions habituals de cultiu *in vitro*. En el moment de la implantació, les cèl·lules es tripsinitzen, es conten, es renten amb PBS i es dilueixen en el volum de PBS necessari per a la implantació del número de tumors desitjats en un volum final de 200 µl per tumor. El número de cèl·lules implantades per tumor va variar de 3×10^6 a 1×10^7 en funció de la línia cel·lular emprada.

La implantació dels tumors es va realitzar mitjançant l'administració subcutània de 0,2 ml de suspensió cel·lular en els flancs posteriors del ratolí, generant així, dos tumors per animal. La injecció subcutània es va realitzar amb una xeringa hipodèrmica amb agulla de 29G. Després de la implantació, es va fer un seguiment del creixement tumoral per palpació. Les dues dimensions

palpables dels nòduls tumorals es varen mesurar amb un peu de rei, i el volum de cada tumor es va calcular mitjançant la fórmula:

$$\text{Volum (mm}^3\text{)} = A \times B^2 \times (\pi/6)$$

(On A és la dimensió major i B la dimensió menor, ambdues en mm³)

Quan els nòduls tumorals van arribar a un volum d'entre 60-150mm³, depenent del tipus tumoral, els ratolins es van distribuir a l'atzar en grups experimentals.

6.3. ADMINISTRACIÓ DELS ADENOVIRUS

Les solucions virals administrades *in vivo* corresponen a dilucions fetes a partir dels estocs de virus purificats en PBS.

6.3.1. Injecció intratumoral d'adenovirus

Per a la injecció intratumoral d'adenovirus es van preparar estocs virals a una concentració de 1×10^9 partícules virals per tumor, o a 1×10^8 tu per tumor, segons l'experiment, en un volum de 20 µl. L'administració es va realitzar amb una xeringa Hamilton, amb una agulla de 25 mm de llargària i 33G, per injecció en un sol punt del tumor.

6.3.2. Administració sistèmica d'adenovirus

Per a la administració sistèmica d'adenovirus es van preparar estocs virals a una concentració de 5×10^{10} partícules virals per ratolí, en un volum de 0.2ml. La injecció es va realitzar amb agulles hipodèrmiques de 29G. L'administració endovenosa es va realitzar per la dilatació de les venes laterals de la cua mitjançant fregues amb alcohol i la inserció de l'agulla per qualsevol de les dues venes laterals.

6.4. OBTENCIÓ DE MOSTRES

6.4.1. Obtenció de sèrum i anàlisis de transaminases

L'extracció de sang per a l'obtenció de sèrum es va realitzar per punció intracardiaca, després de sacrificar l'animal en una cambra de CO₂, i sempre com a procediment terminal. L'obtenció de sang es va fer amb una agulla hipodèrmica de 25G. L'anàlisi de les transaminases ALT i AST es va dur a terme al Servei de Bioquímica Clínica Veterinària de la Facultat de Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona.

6.4.2. Obtenció de tumors

Per a l'obtenció de tumors, els animals es van sacrificar en la cambra de CO₂, i els tumors es van separar del teixit connectiu amb l'ajut de material quirúrgic. Un cop extrets, i depenent de l'experiment, es pesaven en balança de precisió. A continuació es rentaven amb solució salina i es partien per la meitat amb una fulla de bisturí. Una meitat es fixava en paraformaldehid al 4% durant 16 hores, per la seva posterior inclusió en parafina, i l'altre s'inclouïa en OCT.

- *Inclusió de teixits en parafina*

La fixació i inclusió de teixits en parafina permet conservar la morfologia dels teixits, i els hi dóna la consistència necessària per permetre la seva secció a talls suficientment prims per ser examinats al microscopi. Per permetre que la parafina penetri els teixits, caldrà, primer de tot, deshidratar-los mitjançant una bateria d'alcohols etílics de graduació creixent.

Breument, els teixits es renten amb solució salina per eliminar el fixador, i es submergeixen durant 1h en etanol al 70%, durant 2 h en etanol al 96%, i tota la nit en etanol al 96% renovat. El dia següent, es passen per una bateria de 3 etanols al 100% (1h 30 min en cada etanol) i finalment, es submergeixen en xilol durant 1h i 30 min. Un cop deshidratats, es submergeixen durant tota la nit en parafina líquida en una estufa a 65°C, i el dia següent s'inclouen en els blocs. Per a fer els blocs, s'utilitza un aparell que manté la parafina líquida a 60°C i té un dosificador que permet omplir els motlles, junt amb una placa que està a una temperatura de 4°C i que permet la solidificació homogènia dels blocs.

- *Inclusió de teixits en OCT*

La inclusió de teixits en OCT es realitza en el mateix moment de l'obtenció de la mostra. Els tumors es col·loquen en motlles Criomold (Tissue Tek Sakura) on prèviament s'hi ha afegit una capa de matriu crioprotectora OCT (Tissue Tek Sakura) i es congelen ràpidament en neu carbònica. Les mostres es guarden a -80 °C fins al moment del seu processament.

7. TÈCNiques HISTOLÒGIQUES

7.1. OBTENCIÓ DE TALLS HISTOLÒGICS

En aquest treball s'han realitzat dos tipus de talls histològics: a partir de blocs de parafina, i a partir de blocs d'OCT. En tots els casos, els talls s'han dipositat de en portaobjectes prèviament tractats amb poly-L-lisina (Sigma), per tal d'augmentar l'adherència de les mostres. Aquest tractament consisteix en submergir els portaobjectes 5 minuts a TA en una solució de poly-L-lisina al 0,05% en aigua destil·lada. En tots els portaobjectes, es varen dipositar dos seccions de la mateixa mostra per tal de tenir duplicats.

7.1.1 Talls histològics parafinats.

A partir dels blocs de parafina, prèviament refredats a -20°C , es van obtenir talls de $4\ \mu\text{m}$ de gruix amb un micròtom de rotació. Un cop tallades, les seccions s'estenen en un bany d'aigua destil·lada calenta (42°C) per aconseguir la seva màxima extensió. Els talls es recullen del bany amb un portaobjectes poly-L-lisinat, i s'eixuguen a 37°C durant 30 minuts.

7.1.2. Talls histològics congelats.

En aquest cas, partim de les mostres preservades en OCT. Els blocs es tallen en seccions de $4\ \mu\text{m}$ de gruix amb l'ajuda d'un criòstat, que manté les mostres congelades a -20°C . A mesura que fem els talls, els col·loquem en un portaobjectes a TA. La diferència de temperatura entre la mostra congelada i el portaobjectes a TA permet l'adhesió ràpida de la mostra. Les crioseccions es guarden a -80°C fins al moment del seu processament.

7.2. IMMUNOHISTOQUÍMIQUES EN TALLS PARAFINATS

En aquest treball, l'estudi de la distribució de l'àcid hialurònic pels tumors es va realitzar per immunohistoquímica en talls parafinats de tumor. Per la detecció de l'àcid hialurònic es va utilitzar una proteïna d'unió a l'àcid hialurònic marcada amb biotina (B-HABP, Seidagaku America). En tots els casos, les incubacions es van realitzar en cambres humides, sense permetre mai que els teixits s'assequessin, i totes les solucions es van preparar en el moment del seu ús. Els passos que es van seguir, es detallen a continuació:

- *Desparafinat de les mostres:* Les mostres es van desparafinar per incubació de les seccions durant tota la nit a 37°C o durant 2 h a l'estufa de 65 °C i la posterior submerció durant 5 minuts en una bateria de quatre xilols, i durant 5 minuts en una bateria de dos etanols 100%.

- *Inhibició de les peroxidases endògenes i rehidratació de les mostres:* Les peroxidases endògenes s'inhibien per submersió de les mostres en peròxid d'hidrogen al 0,3% en metanol durant 30 minuts. A continuació, les mostres es rehidrataven per submersió durant 5 minuts en una bateria de tres etanols al 96%, i un etanol al 70%, i es rentaven per submersió en PBS durant 10 minuts.

- *Digestió dels controls negatius amb hialuronidasa:* Per tal de tenir un control negatiu de la prova, una de les dues seccions de cada portaobjectes es va cobrir amb una solució d'un enzim que degrada l'àcid hialurònic, la hialuronidasa dels testicles bovins (Sigma H3631), a una concentració de 20 U/ml en PBS. L'altre secció es va cobrir amb PBS, i les mostres es van incubar en una cambra humida durant 1 h a 37°C.

- *Bloqueig:* A continuació les mostres es rentaven tres vegades, durant 5 minuts, amb PBS. Els portes s'eixugaven i els teixits es cobrien amb una solució al 10% de sèrum de cabra o de cavall en PBS. La incubació es realitzava en una cambra humida durant 1 h a temperatura ambient.

- *Immunodetecció:* Per tal de procedir a la immunodetecció, la solució de bloqueig es retirava, i les seccions es cobrien amb una solució de HABP-B (Seidagaku America, 400763-1A) a 5 µg/ml en PBS-0,1% BSA. La incubació es realitzava durant tota la nit a 4 °C. El dia següent, les mostres s'atemperaven durant 30 minuts, i es rentaven tres vegades amb PBS, durant 5 min. A continuació es cobrien amb el complex ABC (Avidina-Biotina-Peroxidasa; ABC KIT PK-4000) de la marca comercial Vectastain, segons les instruccions del fabricant.

- *Revelat:* Les mostres es rentaven 3 vegades més amb PBS, durant 5 min, i es submergien 5 minuts més en TBS (Tampó salí tris 0,05M; pH 7,4). A continuació, les seccions es cobrien amb el substrat cromogènic DAB+ (Dako Cytomation K3468), durant aproximadament 15 segons, fins que apareixia un precipitat marró. Aleshores, la reacció es parava submergint les mostres en TBS, i rentant-les durant 10 minuts amb aigua de l'aixeta. A continuació, les mostres es contratenyien amb el colorant de nuclis hematoxilina durant 1-2 min. Les mostres es rentaven durant 10 minuts amb aigua de l'aixeta, i es deshidrataven en una bateria d'etanols de graduacions creixents: 2 min en etanol al 70%, tres vegades durant 2 minuts en etanol al 96 %, tres vegades durant 2 minuts en etanol al 100%, i quatre vegades durant 5 minuts en xilol.

Finalment, les mostres es muntaven amb medi de muntatge DPX (VWR Internation Ltd. Prod 360294H).

7.3. IMMUNOHISTOQUÍMIQUES EN TALLS CONGELATS

En aquest treball s'han realitzat dos tipus d'immunohistoquímiques en talls congelats de tumors: per detectar els adenovirus, i per detectar els vasos sanguinis. La detecció d'adenovirus en talls congelats és més fàcil, més ràpida i més sensible que la immunodetecció en talls parafinats, però té l'inconvenient que l'estructura i morfologia del tumor es conserva pitjor. El protocol utilitzat per la detecció d'adenovirus i de vasos sanguinis ha estat el mateix, variant només els anticossos primaris i secundaris usats (Taula 11). En tots els casos, les incubacions es van realitzar en cambres humides, i totes les solucions es van preparar en el moment del seu ús.

Breument, les seccions es deixen temperar durant 30 minuts, i a continuació es fixen per immersió en una solució de formaldehid al 4% durant 10 minuts a temperatura ambient. Després de fer un rentat de 2 minuts en aigua destil·lada, i un de 10 minuts en PBS + 0,05% Tween 20, les seccions es cobreixen amb la solució de bloqueig (20% serum de cabra o de cavall en PBS) i s'incuben durant 30 minuts a TA en una cambra humida. A continuació, la solució de bloqueig es retira, i les seccions es cobreixen amb una dilució 1/100 de l'anticòs primari en PBS+ 0.05% Tween 20. Per tal d'obtenir un control negatiu, una de les dues seccions que contenien els portaobjectes s'incubava amb PBS o amb un anticòs inespecífic del mateix origen que l'anticòs primari diluït 1/100 en PBS. La incubació amb l'anticòs primari es realitzava durant 1h a TA o durant tota la nit a 4°C, segons l'anticòs primari utilitzat.

A continuació, les seccions es rentaven tres vegades amb PBS + 0.05% Tween 20 i s'incubaven durant 1 h amb l'anticòs secundari diluït en PBS + 0,05% Tween 20. Passat aquest temps, les seccions es rentaven novament amb PBS + 0,05% Tween 20 i els nuclis es tenyien amb topro (en cas que les seccions s'haguessin d'observar al microscopi confocal) o amb DAPI (per la seva observació al microscopi de fluorescència). La tinció amb topro es realitzava per incubació durant 10 minuts de les seccions amb topro. A continuació les seccions es rentaven tres vegades més amb PBS + 0.05% Tween 20 i es muntaven amb medi de muntatge. La tinció amb DAPI es realitzava directament muntant les seccions amb medi de muntatge que contenia el colorant DAPI (DAKO).

Taula 11. Anticossos primaris i secundaris utilitzats en les immunohistoquímiques en talls congelats.

Anticòs	Antigen	Origen	Dilució	Casa Comercial
Ab6982	Proteïnes càpside viral	Policlonal de conill	1/100	Abcam
Purified antimouse CD31	CD31de ratolí	Monoclonal de rata	1/50	BD Pharmigen
Alexa488 antirabbit	Anticòs de conill	Monoclonal de cabra	1/100	Invitrogen
Alexa546 antirat	Anticòs de rata	Monoclonal de cabra	1/300	Invitrogen

Les imatges de les immunohistoquímiques per detectar la presència d'adenovirus en tumor es van prendre amb un microscopi de fluorescència Olympus BX60 i una càmera digital en color (Olympus U-RFL-T), utilitzant el programa SPOT Advanced 3.2.4 (Diagnostic Instruments).

Les imatges de les immunohistoquímiques per detectar la presència d'endoteli vascular en tumor es van prendre amb un microscopi confocal Leica TCS SL. Per la quantificació de l'angiogènesi tumoral, es van prendre 5 fotografies per tumor, de zones de teixit viable a una ampliació 400 x. La quantificació es va realitzar per contacte dels vasos per fotografia, o per quantificació de la intensitat de senyal amb el software ImageJ.

Resultats

1. EXPRESSIÓ DE GLICOPROTEÏNES FUSOGÈNIQUES DE MEMBRANA (FMG) COM ESTRATÈGIA PER AUGMENTAR LA POTÈNCIA D'ADENOVIRUS REPLICATIUS.

Un possible mètode per augmentar la potència dels adenovirus replicatius és l'ús de glicoproteïnes fusogèniques de membrana (FMG) de virus fusogènics. En aquest treball, s'ha analitzat la capacitat de dues FMG diferents, la glicoproteïna F del paramixovirus SV5 i la glicoproteïna GALV del virus de la leucèmia de gibó, d'augmentar la potència citotòxica d'adenovirus replicatius.

A l'hora d'expressar un transgèn citotòxic en un adenovirus replicatiu, és millor expressar el transgèn durant la fase tardana de la replicació. L'expressió tardana del transgèn evita una mort prematura de la cèl·lula, que podria anar en detriment d'una replicació viral correcta. Per altra banda, en el context d'un adenovirus de replicació condicionada, l'expressió del transgèn es restringeix a les cèl·lules on el virus s'estigui replicant, evitant la citotoxicitat del transgèn en cèl·lules normals. En aquest treball, els gens que codifiquen per la glicoproteïna F i la glicoproteïna GALV han estat inserits dins del genoma d'adenovirus replicatiu darrera el gen de la fibra adenoviral, sota el control del promotor principal tardà (MLP) de l'adenovirus.

1.1. GENERACIÓ D'UN ADENOVIRUS REPLICATIU ARMAT AMB LA PROTEÏNA F DEL PARAMIXOVIRUS SV5.

En treballs anteriors al l'inici d'aquesta tesi, el nostre grup va generar un vector adenoviral que expressava la glicoproteïna F del paramixovirus SV5. L'expressió de la proteïna F va induir la formació de sincitis en les cèl·lules infectades, i la conseqüent mort de les cèl·lules tumorals.

En aquest apartat dels resultats es descriu la construcció i caracterització d'un adenovirus recombinant que expressa la proteïna F durant la fase tardana de la replicació viral. La capacitat oncolítica del nou adenovirus s'analitza mitjançant assajos *in vitro* i *in vivo*.

1.1.1. Construcció i caracterització de l'adenovirus recombinant AdwtRGD-F.

La construcció de l'adenovirus AdwtRGD-F es va realitzar per introducció del gen de la proteïna F en el genoma de l'adenovirus d'AdwtRGD. El virus AdwtRGD és l'adenovirus 5 salvatge, però amb la introducció de tres aminoàcids, Arg-Gly-Asp (RGD) al *Knob* de la fibra adenoviral. El gen de la proteïna F es va clonar després del gen de la fibra adenoviral amb la modificació RGD, sota el control del promotor principal tardà (MLP), com una unitat nova de transcripció, que es va anomenar L6. Davant del gen de la proteïna F, es va introduir l'acceptor

de tall i lligació del gen adenoviral IIIa, i darrera una seqüència de poliadenilació. Com a controls es van utilitzar el virus AdwtRGD i el virus Ad-F, un vector viral no replicatiu que expressa la proteïna F sota el control del promotor del citomegalovirus. El virus Ad-F va ser construït i caracteritzat anteriorment en el nostre laboratori. L'esquema del genoma viral dels tres virus es representa a la Figura 1A. El genoma de l'adenovirus AdwtRGD-F va ser analitzat per digestió amb HindIII, i la presència del gen de la proteïna F es va analitzar per seqüenciació. Els tres virus es van amplificar en les cèl·lules 293 i es van purificar per gradients de clorur de cesi.

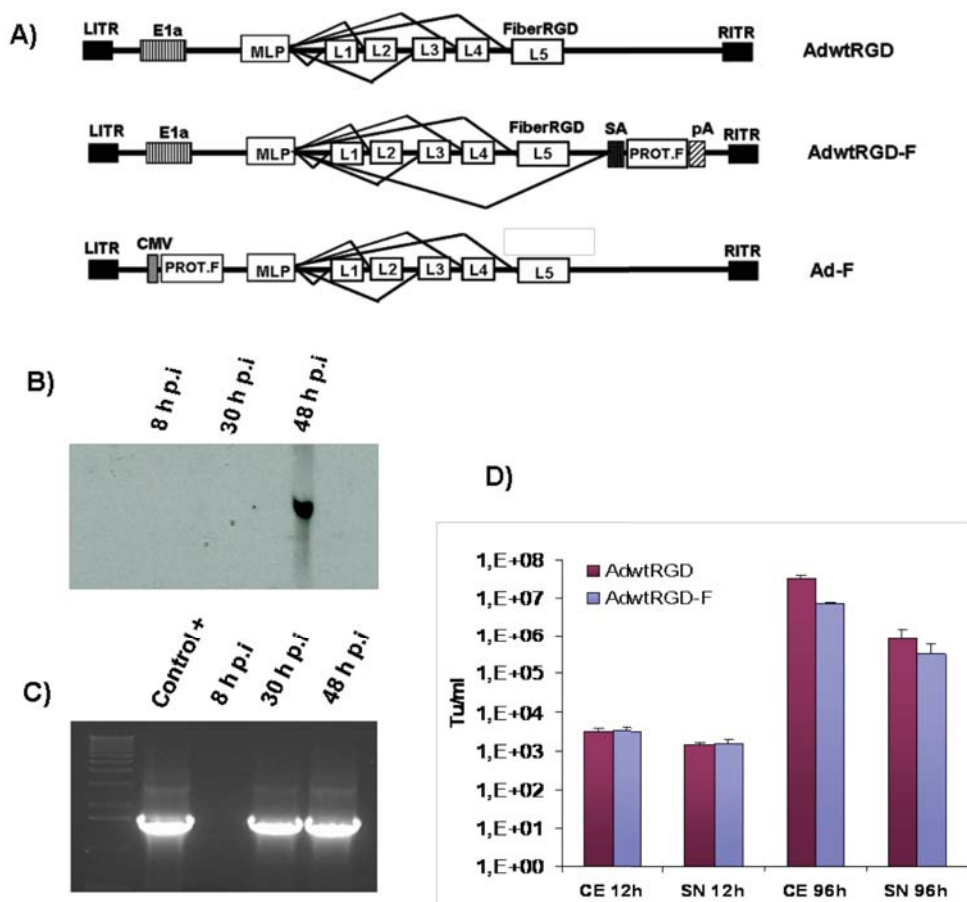


Figura 1. Caracterització de l'AdwtRGD-F. **A)** Estructura dels adenovirus. L'AdwtRGD és un virus de replicació competent no-selectiva, que presenta la modificació RGD en el HI *loop* del *knob* de la fibra. L'AdwtRGD-F conté el genoma del virus AdwtRGD amb el gen de la proteïna F del paramyxovirus SV5 clonat darrera la fibra adenoviral, sota el control del promotor principal tardà. El virus Ad-F és un virus no replicatiu. En comptes de la regió E1, presenta el gen de la proteïna F sota el control del promotor de CMV. Aquest virus conté la fibra adenoviral salvatge, sense la modificació RGD. **B)** Anàlisi de l'expressió de l'RNA de la proteïna F pel virus AdwtRGD-F. Les cèl·lules SKMel-28 van ser infectades amb el virus AdwtRGD-F amb les m.o.i. necessàries per obtenir un 100% d'infecció. L'RNA es va extreure a les 8, 30 i 48 hores, i va ser analitzat per Northern Blot. En la figura es mostra el film que va ser exposat a la membrana durant 2 hores. **C)** Aquest mateix RNA va ser retrotranscrit a cDNA mitjançant una RT-PCR. El cDNA va ser amplificat amb primers específics per la proteïna F. Com a control de la PCR es va utilitzar el plasmidi pNKFiberRGDF que conté el gen de la proteïna F. Com a marcador es va utilitzar el 1 kb ladder. **D)** Anàlisi de la replicació viral d'AdwtRGD-F vs AdwtRGD. La línia NP9 va ser infectada amb AdwtRGD-F i AdwtRGD amb les m.o.i. necessàries per obtenir un 100% d'infecció. El sobrenedant i l'extracte cel·lular van ser recollits a les 12 i 96 hores i titulats per tinció d'hexó. TU, unitats de transducció; CE, extractes cel·lulars; SN, sobrenadants.

Els temps i els nivells d'expressió de l'RNA de la proteïna F pel virus AdwtRGD-F van ser analitzats per Northern Blot. Les cèl·lules SKMel-28 van ser infectades amb el virus AdwtRGD-F a una m.o.i que permetés un 100% d'infecció. L'RNA va ser extret a les 8, 30 i 48 hores, i posteriorment analitzat per Northern Blot. L'exposició de la membrana al film durant 2 hores, permetia visualitzar una banda intensa a les 48 hores postinfecció que corresponia a la proteïna F (Fig 1B). Quan vam exposar la membrana al film durant tota la nit, va aparèixer una banda més dèbil a les 30 hores postinfecció (aquesta dada no es mostra). Per tal de confirmar aquests resultats, aquest mateix RNA va ser transcrit a cDNA mitjançant una RT-PCR. El cDNA resultant va ser amplificat amb primers específics per l'amplificació de la proteïna F. Com a control d'expressió d'RNA, també es van amplificar fragments d'E1A i la Fibra. Els productes de la PCR es van córrer en un gel d'agarosa i tal com mostra la Figura 1C, es va corroborar que l'RNA de la proteïna F s'expressava tan a les 30 com a les 48 hores. L'RNA d'E1A es va detectar durant els primers temps post-infecció (8h i 30h) i l'RNA de la fibra, igual que l'RNA de la proteïna F, es va detectar a les 30h i a les 48h p.i. (aquesta dada no es mostra).

Per tal de comprovar si l'expressió de la proteïna F produïa un efecte inhibitori en la replicació dels virus, es va realitzar un assaig de replicació viral. Les línies cel·lulars A549, NP9 i 293 van ser infectades amb l'AdwtRGD-F i l'AdwtRGD amb les m.o.i necessàries per obtenir un 80% d'infecció. El sobrenedant i l'extracte cel·lular van ser recollits a les 12 i a les 96 hores, i titulats per tinció d'hexó. L'expressió de la proteïna F no va afectar ni a la replicació viral ni a l'alliberament del virus al sobrenedant en cap de les línies assajades. La Figura 1D mostra els resultats de la replicació en la línia cel·lular NP9.

1.1.2. Caracterització fenotípica de l'AdwtRGD-F

L'expressió de la proteïna F, així com la seva capacitat per induir la formació de sincitis, va ser comprovada per un assaig d'immunofluorescència indirecta. Les cèl·lules NP9 van ser infectades amb baixes m.o.i d'AdwtRGD-F, Ad-F i AdwtRGD. A les 96h, moment en que l'efecte citopàtic dels virus AdwtRGD-F i AdwtRGD es començava a fer evident, es va procedir a la realització de l'assaig d'immunofluorescència utilitzant anticossos monoclonals contra la proteïna F. Tal i com es pot observar a la Figura 2, les cèl·lules infectades pel virus AdwtRGD-F expressaven grans quantitats de proteïna F en la seva membrana citoplasmàtica. Els nuclis infectats es van poder identificar perquè presentaven un marcatge amb iodur de propidi més intens (refringent) i irregular. També es va poder observar la formació de petits sincitis de tres o quatre nuclis. Pel que fa al virus Ad-F, es va detectar un menor número de cèl·lules que expressaven la proteïna F a la seva membrana, i no es va poder observar la formació de sincitis, fet que podríem atribuir a la baixa multiplicitat d'infecció que es va utilitzar per dur a terme l'assaig. Les cèl·lules que es van cultivar amb PBS presentaven nuclis intactes i absència

d'expressió de proteïna F, mentre que les cèl·lules infectades per l'AdwtRGD presentaven nuclis infectats però amb absència de proteïna F en la membrana citoplasmàtica.

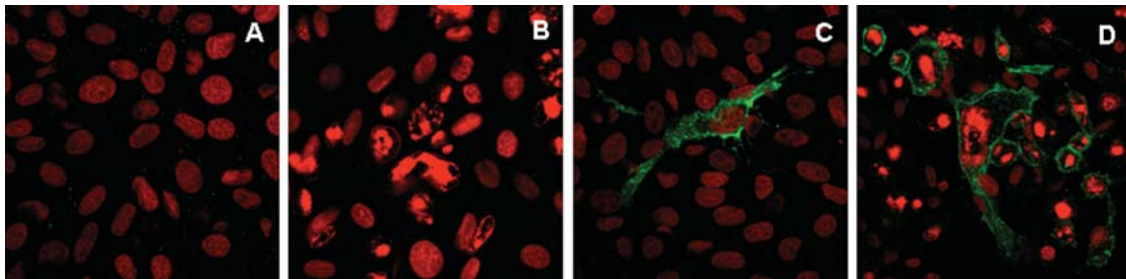


Figura 2. Anàlisi de l'expressió de la proteïna F i de la formació de sincitis per immunofluorescència. Les cèl·lules NP9 van ser infectades amb 3 m.o.i d'AdwtRGD, AdwtRGD-F i Ad-F o amb PBS. 96 hores després de la infecció, les cèl·lules van ser fixades i marcades amb un anticòs monoclonal contra la proteïna F, seguit d'un anticòs secundari conjugat amb cianina. (A) PBS; (B) AdwtRGD; (C) Ad-F; (D) AdwtRGD-F. Les imatges han estat preses per microscopia confocal.

1.1.3. Capacitat oncolítica de l' AdwtRGD-F respecte AdwtRGD *in vitro*.

Per tal de determinar la potència oncolítica de l'adenovirus AdwtRGD-F, la citotoxicitat dels adenovirus AdwtRGD-F i AdwtRGD va ser testada en un panell de línies cel·lulars de diferents orígens, infectades amb un rang ampli de m.o.i. Als 6-8 dies d'infecció es va determinar el tan per cent de supervivència cel·lular i es va calcular la IC_{50} per cada virus i cada línia cel·lular. En cap de les línies cel·lulars infectades es van poder observar diferències en la citotoxicitat dels dos virus, mostrant IC_{50} molt similars (Fig. 3).

Per comprovar si l'expressió de la proteïna F podia aportar una avantatge citotòxica en front del virus AdwtRGD en presència d'anticossos neutralitzants antiadenovirals, aquest experiment es va tornar a repetir però en presència d'anticossos. En cas que la formació de sincitis permetés al virus disseminar-se cèl·lula a cèl·lula sense haver d'entrar en contacte amb els anticossos neutralitzants, l'AdwtRGD-F hauria de presentar una capacitat oncolítica superior a l'AdwtRGD en presència d'aquests anticossos. En canvi, tal com es mostra a la Figura 3A, no es van veure diferències en la capacitat d'eliminar cèl·lules dels dos virus. Les IC_{50} dels dos virus va augmentar unes 10 vegades respecte el mateix experiment sense anticossos neutralitzants (Figura 3B).

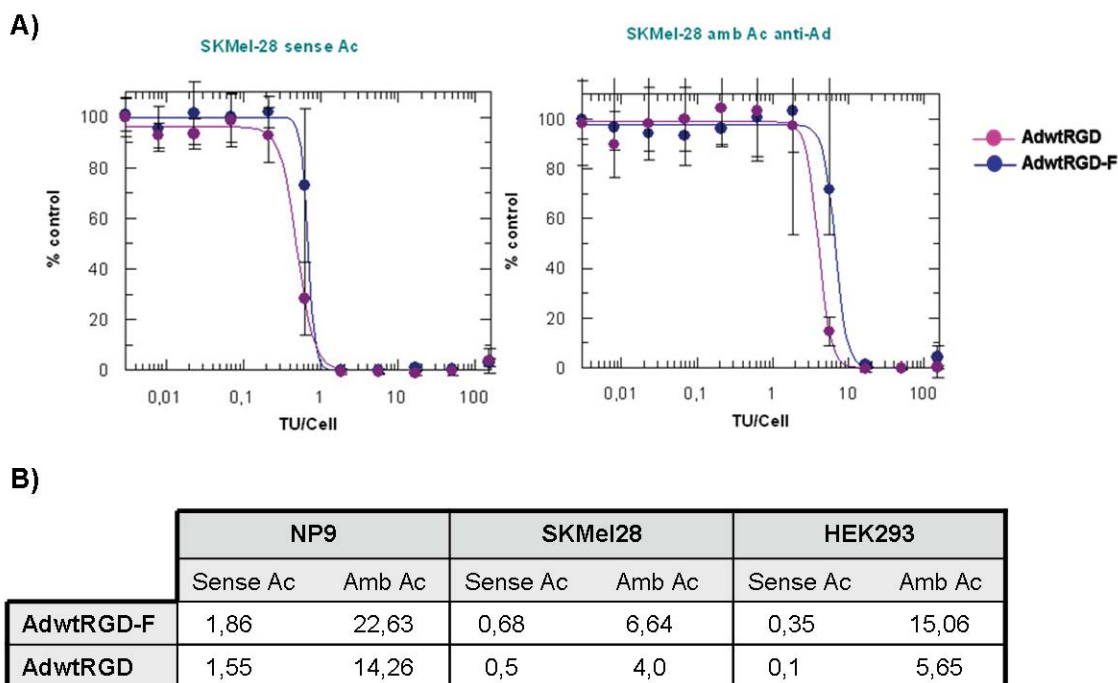


Figura 3. Capacitat citotòxica dels virus AdwtRGD-F i AdwtRGD *in vitro*. Les línies NP9, SKMel-28 i 293 van ser infectades amb un rang de dosis des de les 150 m.o.i fins a 0,0001 m.o.i, depenent de la susceptibilitat de la línia. Entre els dies 6 i 8 post-infecció es va procedir a la determinació de la viabilitat cel·lular. Aquest assaig es va realitzar amb presència i absència d'anticossos neutralitzants antiadenovirals. **(A)** Corba dosi-resposta en la línia SKMel-28. En la resta de línies cel·lulars es van obtenir corbes molt similars. **(B)** Valors de les IC₅₀, expressades com TU/cèl·lula necessàries per matar el 50% de les cèl·lules en cultiu, pels diferents virus i les diferents línies cel·lulars amb presència i absència d'anticossos neutralitzants antiadenovirals.

1.1.4. Efecte de la proteïna HN, la temperatura i les proteases sobre l'efecte fusogènic i citotòxic de la proteïna F.

Per tal d'identificar quina era la causa de la manca d'increment de citotoxicitat del virus AdwtRGD-F varem decidir fer un assaig de citotoxicitat en presència de la proteïna HN, de temperatura elevada i de proteases exògenes. Si la proteïna F no tenia l'energia necessària per passar a una conformació activa, la presència de la proteïna HN o l'increment de temperatura, li haurien de conferir aquesta energia, i per tant augmentar tan la seva potència citotòxica, com la seva capacitat fusogènica. En canvi, en cas que la proteïna F es mantingués en la forma precursora F₀, incapaç d'hidrolitzar-se a F₁ i F₂, la presència en el medi d'una proteasa exògena, com la tripsina, augmentaria la capacitat citotòxica de la proteïna F. Per tal d'aclarir aquestes possibilitats, es va infectar la línia cel·lular SKMel-28 amb baixes m.o.i de AdwtRGD-F i AdwtRGD, en presència de PBS, tripsina, calor i la proteïna HN expressada pel vector adenoviral AdHN. L'AdHN és un vector adenoviral amb la regió E1 delecionada que expressa la proteïna homotípica HN sota el promotor CMV.

L'aparició de sincitis es va seguir diàriament, i la determinació de la viabilitat cel·lular es va realitzar a dia 6 pel mètode MTT. La presència de tripsina, calor o la proteïna HN no van

augmentar el número ni mida dels sincitis d'AdwtRGD-F respecte a la infecció del mateix virus amb PBS. Pel que fa a la citotoxicitat, no va haver-hi un augment de la citotoxicitat cel·lular de l'AdwtRGD-F en cap de les 3 condicions. Com es mostra a la Figura 4A, el virus AdwtRGD va matar les cèl·lules més eficientment en tots els casos, sent les diferències estadísticament significatives tan en presència de tripsina, com calor, com proteïna HN.

1.1.5. Eficàcia antitumoral de l'adenovirus AdwtRGD-F *in vivo*.

La monocapa cel·lular no és un bon model per l'estudi de la capacitat citotòxica de les proteïnes de fusió degut a que per tal que la fusió es doni correctament cal que les cèl·lules estiguin molt properes entre elles. Necessitàvem per això un model tridimensional, més proper a la realitat. Per això es va realitzar un estudi de l'eficàcia antitumoral *in vivo*. Ratolins de la soca BalbC nu/nu amb tumors xenògrafs NP9 preestablerts van ser injectats intratumoralment amb 1×10^9 partícules virals (vp) d'AdwtRGD-F, AdwtRGD, Ad-F o PBS. El creixement tumoral es va seguir fins a dia 67, moment en que els ratolins van ser sacrificats. Com es pot veure en la Figura 4B, els virus AdwtRGD-F i AdwtRGD van presentar un millor control del creixement tumoral respecte els grups injectats amb PBS o Ad-F. No es van observar, però, diferències estadísticament significatives entre els grups injectats amb AdwtRGD-F i AdwtRGD. Les diferències en el creixement tumoral entre els grups injectats amb Ad-F o PBS tampoc van ser estadísticament significatives en cap punt.

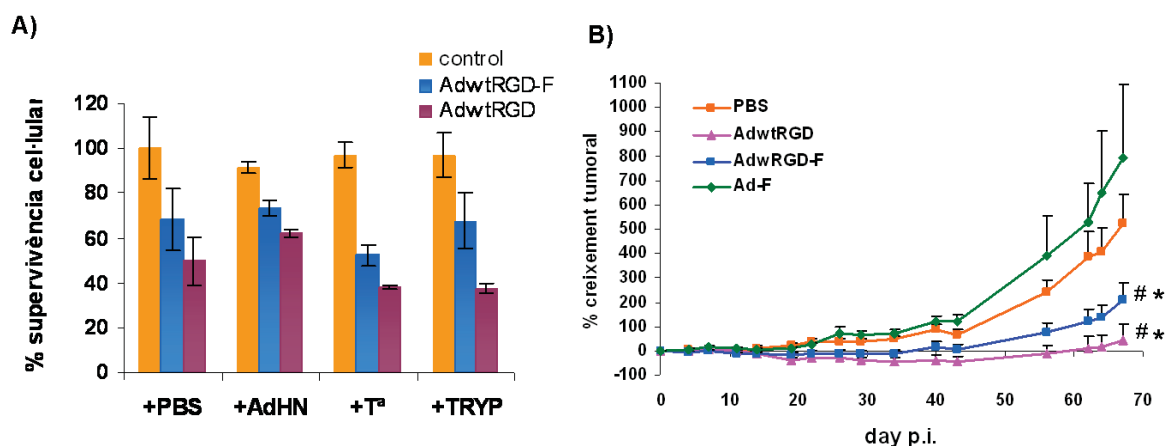


Figura 4. (A) Avaluació de l'efecte de la temperatura, la tripsina i la proteïna HN sobre la proteïna F. Les cèl·lules SKMel-28 van ser infectades a baixes m.o.i amb els virus AdwtRGD-F i AdwtRGD o amb PBS per triplicat. Aquest assaig es va realitzar amb presència de la proteïna HN (per coinfecció amb el virus AdHN), de tripsina, de temperatura o de PBS. 6 dies després de la infecció es va procedir a determinar el % de supervivència cel·lular. Les diferències en citotoxicitat dels virus AdwtRGD-F i AdwtRGD en presència de la proteïna HN, temperatura i tripsina són estadísticament significatives ($p \leq 0,05$) **(B) Control del creixement tumoral en un model xenògraft de càncer de pàncrees (NP9).** Ratolins immunosuprimits amb tumors preestablerts de la línia NP9 van ser injectats intratumoralment amb 1×10^9 vp d'AdwtRGD, AdwtRGD-F i Ad-F, o amb PBS. $n=10$ tumors per grup. La gràfica mostra la mitjana del creixement dels tumors de cada grup respecte el dia 0, en funció del temps post-administració. # $P \leq 0,05$, significativament diferent al grup injectat amb PBS. * $P \leq 0,05$, significativament diferent al grup injectat amb Ad-F.

Segons els resultats obtinguts en aquest apartat, l'expressió de la glicoproteïna F del paramixovirus SV5 no confereix un augment de la capacitat antitumoral d'un adenovirus replicatiu. El següent pas que ens varem plantejar va ser analitzar l'efecte de l'expressió d'una altra FMG, la glicoproteïna GALV del virus de la leucèmia de gibó.

1.2. GENERACIÓ D'UN ADENOVIRUS REPLICATIU ARMAT AMB LA PROTEÏNA DE L'ENVOLTA DEL VIRUS DE LA LEUCÈMIA DE GIBÓ.

La forma hiperfusogènica de la proteïna de l'envolta del virus de la leucèmia de gibó (GALV), on el pèptid R de la regió C-terminal ha estat eliminat, ha demostrat ser altament citotòxica per les cèl·lules tumorals. Fins ara, el clonatge de la proteïna GALV en un vector adenoviral ha estat molt problemàtic degut a que l'elevada citotoxicitat de la proteïna GALV, per les cèl·lules productores d'adenovirus, feia impossible l'obtenció del virus a títols suficientment elevats.

En aquest treball presentem el clonatge de la forma hiperfusogènica de la proteïna GALV en un adenovirus replicatiu sota el control del promotor principal tardà (MLP) de l'adenovirus, així com l'avaluació de la capacitat replicativa i citotòxica del nou adenovirus. Aquest projecte s'ha realitzat amb col·laboració amb el Dr. Richard Vile, del Programa de Medicina Molecular de la Clínica Mayo (Rochester, MN, USA).

1.2.1. Generació i caracterització de l'adenovirus AdwtRGD-GALV.

Per tal de generar un adenovirus replicatiu que expressés la forma hiperfusogènica de la glicoproteïna GALV, es va clonar la seqüència codificant per la proteïna GALV en el genoma de l'AdwtRGD, tal i com s'havia fet amb l'adenovirus AdwtRGD-F. Una possible causa de la baixa citotoxicitat de la proteïna F era que s'estigués expressant a concentracions no suficientment elevades. Per això varem decidir augmentar els nivells d'expressió de la proteïna GALV inserint la seqüència kozac just davant del codó d'inici de traducció del gen GALV. Davant de la seqüència kozac es va inserir la seqüència acceptora de tall i lligació IIIa, i darrera el gen GALV, una seqüència poliA. El casset d'expressió es va inserir darrera del gen de la fibra adenoviral, sota el control del promotor MLP (Fig. 5A). La transfecció del genoma de l'adenovirus AdwtRGD-GALV va resultar en la fusió de les cèl·lules transfectades amb les cèl·lules veïnes no transfectades, la formació de grans sincitis multinucleats i la generació de l'adenovirus AdwtRGD-GALV (Fig. 5B). El nou adenovirus fusogènic, l'AdwtRGD-GALV, i l'adenovirus control, l'AdwtRGD es van amplificar eficientment en les cèl·lules 293. Mentre l'AdwtRGD induïa l'efecte citopàtic típic d'una infecció adenoviral, caracteritzat per l'observació de cèl·lules arrodonides i refringents, les 293 infectades amb dosis elevades d'AdwtRGD-GALV formaven

uns agrupaments esfèrics de cèl·lules fusionades que es desenganxaven ràpidament de la placa (Fig. 5C). Els extractes cel·lulars dels dos virus es van titular per tinció d'hexó, obtenint-se títols elevats en ambdós casos: 625 TU/cèl·lula per l'extracte cel·lular de l'AdwtRGD-GALV i 486 TU/cèl·lula per l'AdwtRGD. A partir d'aquest extractes, els virus es van amplificar a gran escala i es van purificar per gradients de clorur de cesi.

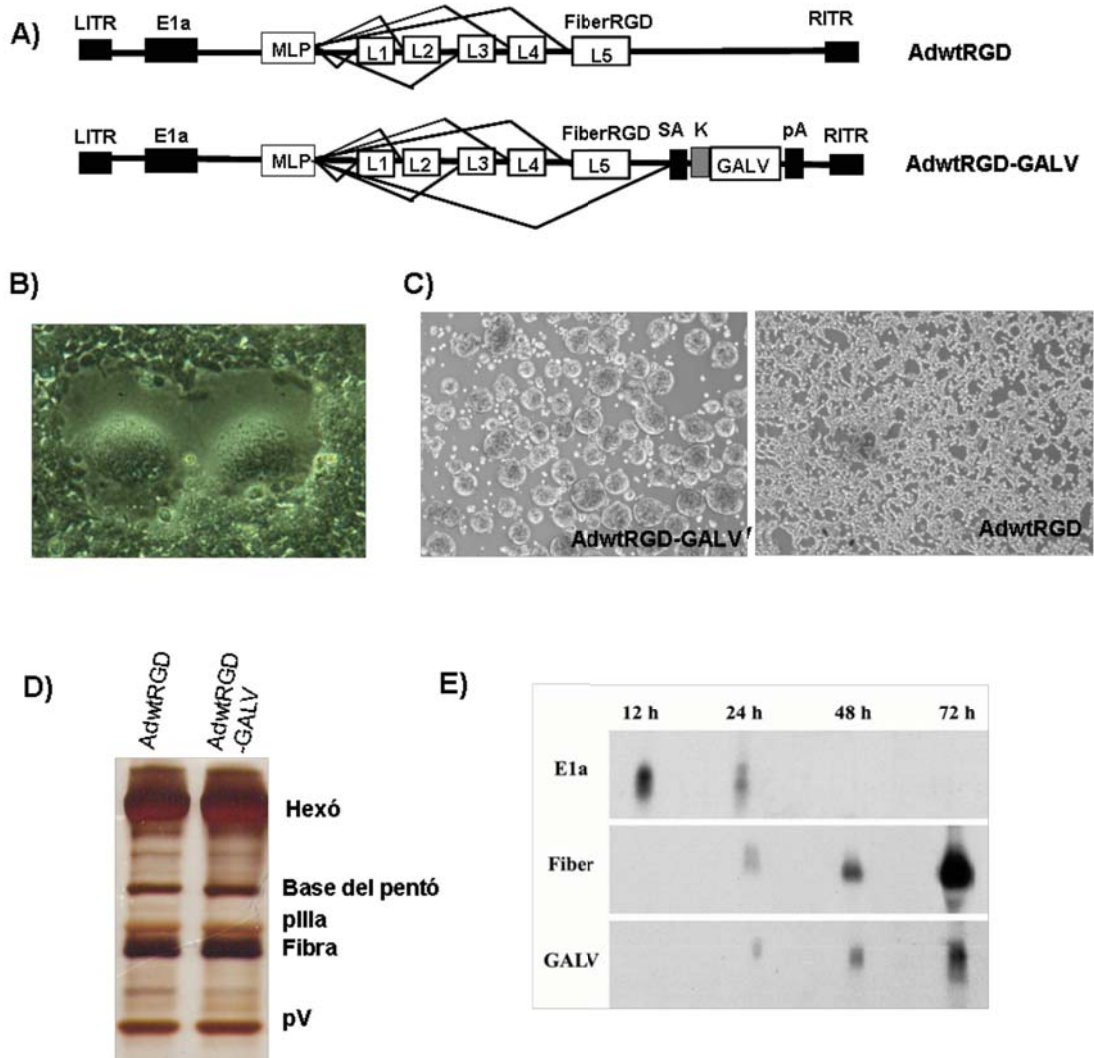


Figura 5. Generació i caracterització de l'AdwtRGD-GALV. (A) Representació esquemàtica dels adenovirus utilitzats. L'AdwtRGD és un adenovirus replicatiu, que presenta la modificació RGD en el HI *loop* del *knob* de la fibra. En l'adenovirus AdwtRGD-GALV, es va insertar darrera el gen de la fibra adenoviral un cassat d'expressió que consisteix en l'acceptor de tall i lligació de l'adenovirus IIIa (SA), la seqüència kozac (k), el gen de la glicoproteïna GALV, i una seqüència de poliadenilació (pA). Aquest cassat té una llargada de 2053 pb. (B) Morfologia de les cèl·lules després de la transfecció del genoma de l'AdwtRGD-GALV. Les cèl·lules 293 es van transfectar amb 3 µg del genoma de l'AdwtRGD-GALV. La formació de grans sincitis multinucleats es va observar 5 dies després de la transfecció. (C) Caracterització de l'efecte citopàtic induït després de la infecció de les 293 amb altes m.o.i d'AdwtRGD i AdwtRGD-GALV. (D) Anàlisi del contingut proteïc dels adenovirus purificats. 5×10^{10} partícules virals de l'AdwtRGD i AdwtRGD-GALV es van resoldre per electroforesi en un gel d'acrilamida al 10%, i posteriorment es van tenir amb nitrat de plata. (E) Anàlisi de l'expressió de l'RNA d'E1a, de la fibra i de GALV pel virus AdwtRGD-GALV. Les cèl·lules A549 van ser infectades amb el virus AdwtRGD-GALV amb les m.o.i. necessàries per obtenir un 100% d'infecció. L'RNA es va extreure a les 12, 24, 48 i 72 hores, i va ser analitzat per Northern Blot amb sondes específiques per E1a, la fibra, i GALV.

Com que era possible que la inserció del casset GALV darrera del gen de la fibra adenoviral afectés l'expressió de la proteïna de la fibra, el contingut proteic dels virus purificats es va analitzar per tinció de plata. Les càpsides virals de l'AdwtRGD-GALV i l'AdwtRGD es van lliurar, i les proteïnes de la càpsida es van resoldre en condicions desnaturalitzants en un gel d'acrilamida-SDS, i es van tenyir amb nitrat de plata. Tal i com es mostra a la figura 5D, no es van detectar diferències en la quantitat de fibra present en la càpsida dels dos virus.

Per tal de confirmar que la proteïna GALV s'estava expressant durant la fase tardana de la replicació viral, els temps i els nivells d'expressió de l'RNA de la proteïna GALV es van analitzar per Northern Blot. Com es mostra a la Figura 5E, l'expressió de l'RNA d'E1a es va detectar durant les primeres hores de la infecció viral (entre les 12 i les 24 h). L'RNA de GALV, en canvi, es va detectar a partir de les 24 h post-infecció, presentant un màxim d'expressió a les 72 h. La cinètica d'expressió de l'RNA de la proteïna GALV va ser molt similar a la de l'RNA de la fibra, confirmant que l'expressió de la proteïna GALV s'estava donant durant la fase tardana de la replicació.

1.2.2. Anàlisi de la producció i alliberament de l'AdwtRGD-GALV.

Per tal de comprovar si la inserció del gen GALV, així com la formació de sincitis, podien perjudicar la replicació normal de l'AdwtRGD-GALV, es va realitzar un assaig de producció viral a altes dosis d'infecció. Les cèl·lules A549 es van infectar amb els virus AdwtRGD i AdwtRGD-GALV per tal assolir un 100% d'infecció de les cèl·lules en cultiu. En aquestes condicions, els sincitis es formen a partir de diferents cèl·lules infectades que expressen les proteïnes de fusió a la seva membrana. A diferents temps post-infecció, es van recollir els extractes cel·lulars totals i els sobrenadants, que es van titular per tinció de l'hexó. Tal i com es mostra a la Figura 6Aa, la producció dels dos virus va ser pràcticament idèntica, assolint les mateixes concentracions virals en els mateixos temps. En canvi, la quantitat d'AdwtRGD-GALV alliberada al sobrenadant a les 48 h post-infecció va ser unes 100 vegades superior a la quantitat d'AdwtRGD alliberada (Fig. 6Ab), indicant que la formació de sincitis a dosis elevades estava millorant l'alliberament viral. La representació gràfica del tant per cent de virus alliberat en relació a la totalitat de virus produït indica que, mentre a les 48 h post-infecció el 40 % de l'AdwtRGD-GALV produït havia estat alliberat al sobrenadant, la quantitat d'AdwtRGD alliberada era inferior al 0.5% (Fig. 6Ac).

Aquest mateix experiment es va repetir però infectant les cèl·lules amb dosis baixes de virus i recollint les mostres a temps més llargs (fins a dia 7 p.i), per tal de permetre al virus realitzar múltiples rondes de replicació. En aquestes condicions, s'observen grans sincitis multinucleats que es formen a partir d'una o poques cèl·lules inicialment infectades. En aquest

cas, la producció d'AdwtRGD-GALV, així com l'alliberament al sobrenadant, es van veure significativament disminuïts respecte a l'adenovirus control (AdwtRGD) en tots els temps post-infecció (Fig. 6B).

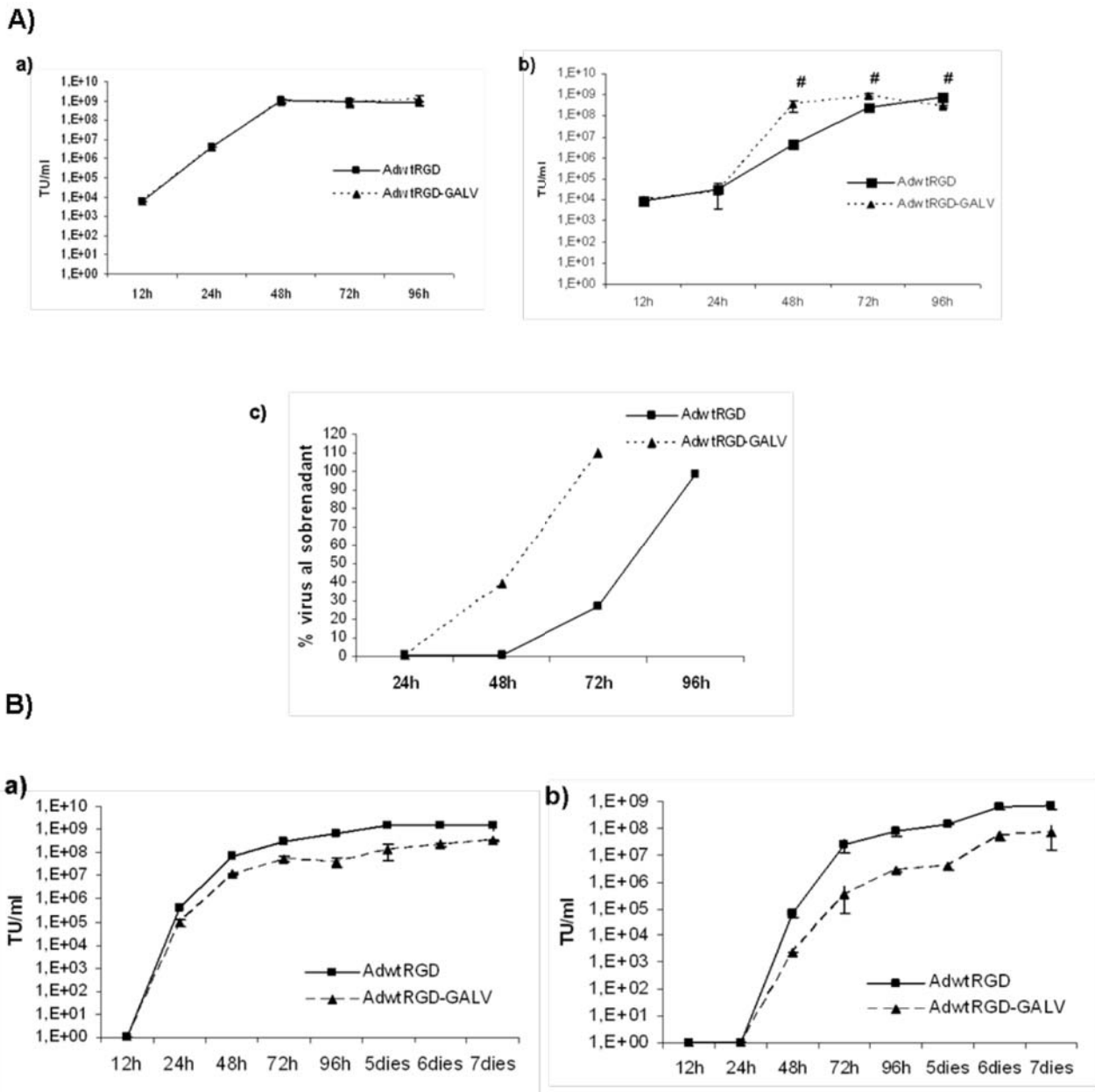


Figura 6. Títols virals després de la infecció de les A549 amb els adenovirus AdwtRGD i AdwtRGD-GALV.(A) Les A549 es van infectar amb 10 m.o.i. d'AdwtRGD i AdwtRGD-GALV. Quatre hores després de la infecció, el medi es va retirar, les cèl·lules es van rentar amb PBS, i es va afegir 1 ml de medi fresc a cada pou. Als temps indicats, es van recollir els sobrenadant (a) i els extractes cel·lulars (b), i es van titular per tinció de l'hexó. El virus detectat a les 12 h p.i, correspon al virus romanent al sobrenadant després dels rentats amb PBS. # $p \leq 0,05$. (c) Representació gràfica del tant per cent de virus alliberat al sobrenadant respecte el total del virus produït. (B) Les A549 es van infectar amb 0,1 m.o.i. d'AdwtRGD i AdwtRGD-GALV de la mateixa manera que en l'apartat (A). Als diferents temps post-infecció, es van recollir els sobrenadant (a) i els extractes cel·lulars (b), i es van titular per tinció de l'hexó. A les 12 h p.i no es va detectar virus romanent de la infecció. En tots els punt els títols d'AdwtRGD van ser significativament superiors als títols d'AdwtRGD-GALV. $P \leq 0,05$.

1.2.3. Anàlisi de la replicació viral a l'interior d'un sinciti.

La baixa producció viral de l'AdwtRGD-GALV en presència de sincitis formats a baixa m.o.i. es podria explicar en cas que la replicació viral dins d'un sinciti només es donés en el nucli de la cèl·lula inicialment infectada. En aquest cas, la resta de cèl·lules incloses en el sinciti moririen per efecte de la fusió, sense poder produir nous virions, i limitant la producció total de virus. Per testar aquesta hipòtesi, les cèl·lules de melanoma humà, SKMel28 es van infectar amb dosis molt baixes d'AdwtRGD-GALV (0,5 m.o.i.). La presència de DNA en els nuclis cel·lulars es va determinar per hibridació fluorescent *in situ* (FISH) 72 h després de la infecció. Com es mostra a la Figura 7, en pràcticament tots els sincitis avaluats, el DNA viral es va detectar només en un nucli del s'inciti, indicant que el DNA viral no es pot distribuir, i per tant replicar, en els diferents nuclis del s'inciti.

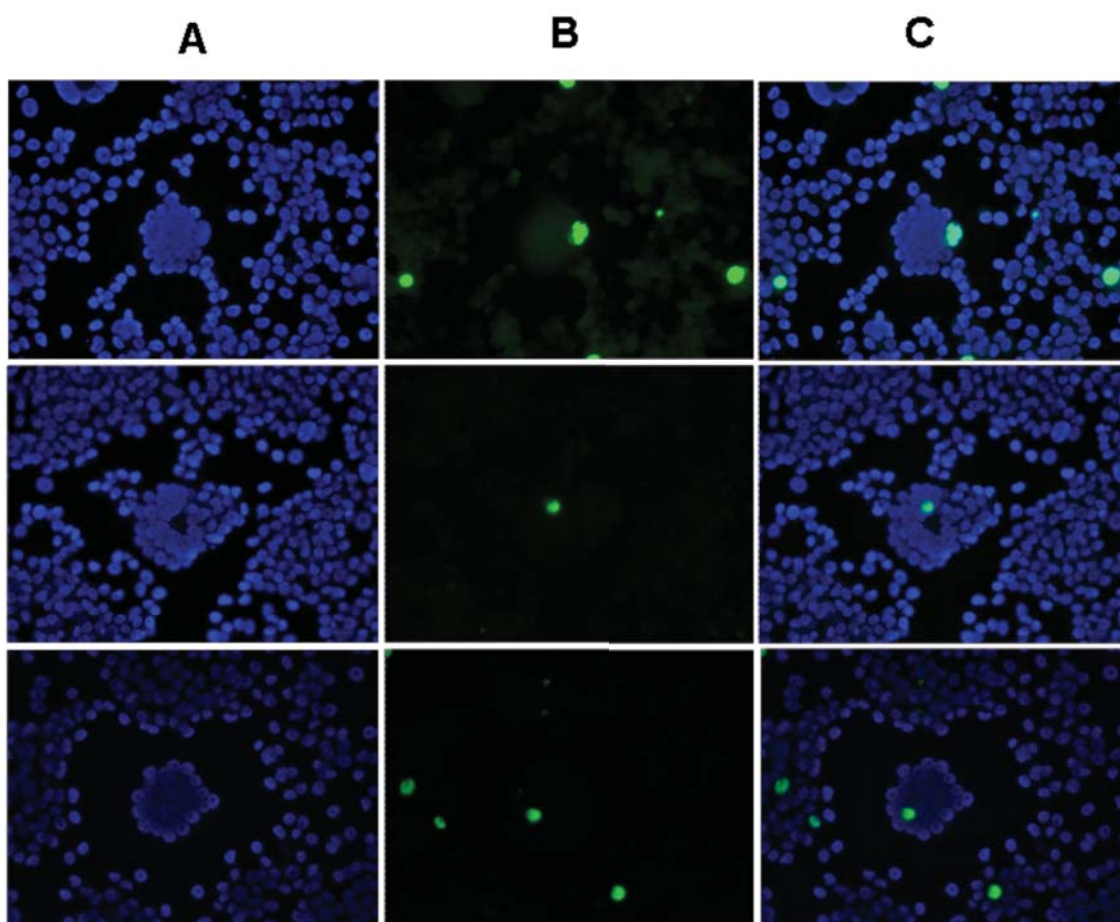


Figura 7. Anàlisi de la replicació del DNA viral en els diferents nuclis del sinciti. Les cèl·lules SKMel28 es van infectar les amb 0,5 m.o.i d'AdwtRGD-GALV. Tres dies després de la infecció, les cèl·lules es van fixar, i el DNA viral es va detectar per hibridació fluorescent *in situ*. El DNA cel·lular total es va teñir amb DAPI (A), i el DNA viral es va detectar amb una sonda, preparada a partir de DNA de l'AdwtRGD-GALV marcat per *nick-translation* (B). En l'apartat (C) es mostra la superposició dels dos marcatges.

1.2.4. Efecte citotòxic de l'AdwtRGD-GALV respecte l'AdwtRGD.

Tot i que els títols virals de l'AdwtRGD-GALV obtinguts després de la infecció a baixes m.o.i. eren baixos, podria ser que l'expressió de la proteïna GALV estigués augmentant la citotoxicitat del virus fusogènic respecte l'adenovirus control. Per tal d'analitzar aquesta possibilitat, es van infectar les cèl·lules SKMel28 amb 5 o 0,5 m.o.i de l'AdwtRGD i l'AdwtRGD-GALV. A diferents temps post-infecció, es va determinar el tant per cent de supervivència cel·lular per cada condició. 72 h després de la infecció de les cèl·lules amb 5 m.o.i de virus, l'AdwtRGD-GALV havia eliminat més del 60 % de les cèl·lules en cultiu. En aquest mateix punt, menys del 45% de les cèl·lules infectades amb l'AdwtRGD eren mortes. A una m.o.i de 0,5 la viabilitat cel·lular als 5 dies p.i dels cultius infectats amb l'AdwtRGD-GALV era inferior al 60 %, mentre pràcticament el 100 % de les cèl·lules infectades amb l'AdwtRGD eren viables (Fig. 8A). Les diferències de citotoxicitat entre els dos virus a dia 7 p.i eren encara significatives. Per tal de confirmar aquest resultat, l'experiment es va repetir de forma similar en les cèl·lules A549 (Fig. 8B) i en les cèl·lules pancreàtiques, NP9 (aquesta dada no es mostra). En tots dos casos, l'AdwtRGD-GALV va matar les cèl·lules tumorals més eficientment que l'AdwtRGD, indicant que l'expressió de la proteïna GALV estava millorant la capacitat citotòxica de l'AdwtRGD.

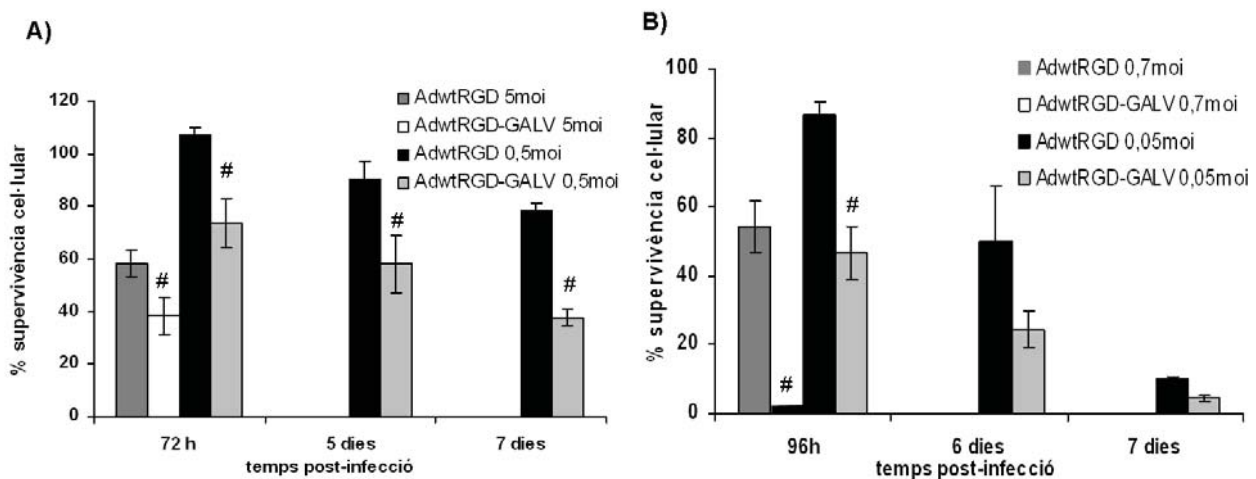


Figura 8. Comparació de la citotoxicitat de l'AdwtRGD-GALV respecte l'AdwtRGD en les cèl·lules tumorals. (A) Es van infectar les cèl·lules SKMel28 amb 5 i 0.5 m.o.i d'AdwtRGD-GALV i AdwtRGD, o amb medi sense virus. (B) Les cèl·lules A549 es van infectar amb 0.7 i 0.05 m.o.i d'AdwtRGD-GALV i AdwtRGD, o amb medi sense virus. Als temps indicats, les cèl·lules es van recollir per tripsinització, i es van tenyir amb blau de tripà. Les cèl·lules viables es van contar a l'hemocitòmetre. El percentatge de cèl·lules viables es va determinar dividint el número de cèl·lules viables en els pous infectats, pel número de cèl·lules viables en els pous no infectats. Les dades s'expressen com la mitjana dels triplicats \pm la desviació estàndard. $P < 0.02$.

Els resultats obtinguts en aquest apartat, segons els quals l'expressió la glicoproteïna GALV era capaç d'augmentar la citotoxicitat d'un adenovirus replicatiu, ens van fer plantejar la inserció del gen GALV en el genoma d'un adenovirus de replicació condicional.

L'AdwtRGD-GALV, és un adenovirus salvatge, on l'expressió d'E1A no està controlada per un promotor selectiu de cèl·lula tumoral. Així doncs, aquest adenovirus ens va servir per analitzar l'efecte de l'expressió de la proteïna fusogènica, però l'AdwtRGD-GALV no es pot utilitzar com a agent terapèutic en pacients. En el següent apartat es presenta la inserció del gen de la glicoproteïna GALV en el genoma d'adenovirus de replicació condicionada.

2. EXPRESSIÓ DE FMG COM ESTRATÈGIA PER AUGMENTAR L'EFICÀCIA TERAPÈUTICA D'ADENOVIRUS DE REPLICACIÓ CONDICIONADA.

En aquest apartat, el gen que codifica per la forma hiperfusogènica de la glicoproteïna GALV va ser inserit en el genoma de dos adenovirus oncolítics diferents, l'ICOVIR5 i l'ICOVIR15, ambdós generats en el nostre laboratori. En els següents apartats, s'estudien diferents estratègies per armar un adenovirus oncolític, i s'analitza la capacitat de la glicoproteïna GALV d'augmentar l'eficàcia antitumoral dels adenovirus oncolítics esmentats.

2.1. EFECTE DE LA INSERCIÓ DEL GEN GALV, I LA DELECCIÓ DELS ORFS1,2,3 DE LA REGIÓ E4 SOBRE L'EFICÀCIA ANTITUMORAL DE L'ICOVIR5.

L'ICOVIR5 (Ad-DM-E2F-K- Δ 24RGD) és un adenovirus oncolític altament selectiu, que expressa la proteïna E1A amb la mutació Δ 24 sota el control del promotor d'E2F-1, aïllat per l'aïllant de la distròfia muscular humana (DM). En aquest apartat dels resultants, es descriu la generació d'una versió fusogènica de l'ICOVIR5, l'ICOVIR9dE4, on el gen de la glicoproteïna GALV ha estat inserit darrera el gen de la fibra adenoviral, sota el control del promotor MLP de l'adenovirus. S'ha descrit que la llargada màxima que pot tenir un genoma adenoviral per ser encapsidat eficientment són 38 kb (2 kb més que l'adenovirus salvatge). Degut a que el casset GALV té una llargada de 2053 pb, i l'ICOVIR5 té 994 pb més que l'Adwt, la inserció del casset GALV en l'ICOVIR5 resultaria en un genoma massa gran per ser encapsidat correctament (3049 pb més que l'adenovirus salvatge). Per tal d'acomodar la inserció del gen GALV en el genoma de l'ICOVIR5 sense afectar la capacitat d'encapsidació, en l'ICOVIR9dE4, els ORF1, ORF2 i ORF3 de la regió E4 van ser delecionats. Aquesta deleció ens dóna una capacitat extra de 1017 pb. Per tal d'estudiar l'efecte de la deleció dels ORF123, es va generar l'adenovirus salvatge Adwtorf123, on els ORF1, ORF2 i ORF3 de la regió E4 van ser delecionats.

A continuació, s'analitza la producció viral i la capacitat citotòxica dels adenovirus Adwtorf123 i ICOVIR9dE4 respecte els adenovirus controls, l'Adwt i l'ICOVIR5 en un ampli panell de línies tumorals. Finalment, s'analitza l'efecte antitumoral *in vivo* del nou adenovirus oncolític armat, l'ICOVIR9dE4, respecte l'ICOVIR5.

2.1.1. Generació de l'adenovirus Adwtorf123 i estudi de l'efecte de la deleció dels ORF1,2,3 de la regió E4 sobre la replicació viral.

L'adenovirus Adwtorf123 es va generar per deleció de les seqüències codificants per les proteïnes ORF1, ORF2 i ORF3 de la regió E4 de l'adenovirus salvatge, l'Adwt. La regió delecionada va del 34508 pb al 35525 pb de l'Adwt, i té una llargada de 1017 pb (Fig. 9A). Alhora de dissenyar la deleció es va anar amb molt de compte per tal de no delecionar els acceptors i donadors de tall i lligació necessaris pel processament de la resta de proteïnes d'E4. L'adenovirus Adwtorf123 es va generar per transfecció del genoma en 293, i es va amplificar en aquesta mateixa línia. La deleció dels ORF1,2,3, es va comprovar per seqüenciació del genoma de l'Adwtorf123 extret pel mètode Hirt's a partir de la infecció d'una placa de cèl·lules A549.

Per tal d'analitzar l'efecte de la deleció dels ORF1,2,3 d'E4 sobre la replicació viral, es van infectar les cèl·lules A549 amb altes m.o.i d'Adwt i Adwtorf123, per tal obtenir un 100% d'infecció. Als diferents temps post-infecció, es van recollir els sobrenedant i els extractes cel·lulars totals, i es van quantificar per tinció de l'hexó (Fig. 9Ba). Tot i que la quantitat de virus produït i alliberat al sobrenedant a punt final de l'experiment (72 h) és molt similar entre els dos virus, la gràfica mostra un retard en la producció i alliberament de l'Adwtorf123 respecte l'Adwt. A les 24 h post-infecció, la quantitat d'Adwtorf123 produïda és pràcticament 10 vegades inferior a la d'Adwt. A les 48 h post-infecció, moment en que tot l'Adwt s'ha produït, la quantitat d'Adwtorf123 és 6 vegades inferior a la d'Adwtorf123. L'anàlisi de l'alliberació del virus ens dona resultats similars, sent les quantitats d'Adwtorf123 present al sobrenedant a les 24 h i 48 h post-infecció 10 vegades inferiors a les quantitats d'Adwt als mateixos temps. L'experiment de producció viral a altes m.o.i. es va repetir en cèl·lules de càncer de pròstata, les PC3 (Fig. 9Bb). En aquest cas, les diferències entre la producció viral i l'alliberament de l'Adwtorf123 respecte l'Adwt van ser mínimes, indicant que la disminució de la producció de l'Adwtorf123 podia dependre de la línia cel·lular emprada.

Per tal de confirmar els resultats de l'assaig de producció viral, i analitzar més a fons l'efecte de la deleció dels ORF1,2,3 sobre la replicació viral, es va realitzar un assaig de competició entre l'Adwtorf123 i l'Adwt. Les cèl·lules A549 i les cèl·lules PC3 es van co-infectar amb la mateixa quantitat d'Adwtorf123 i Adwt. Un cop s'assolia l'efecte citopàtic complet, els extractes cel·lulars es recollien i s'utilitzaven per infectar noves cèl·lules. El procés es va repetir fins a 5 vegades, i a cada passatge (p1-p5) es recollia una mostra de sobrenedant per tal d'obtenir-ne DNA viral. El DNA viral obtingut a cada passatge s'analitzava per PCR amb encebadors específics per la regió E4, i els fragments obtinguts per PCR s'analitzaven en un gel d'agarosa. La presència del DNA de l'Adwt es detectava per amplificació d'una banda de 1993 pb, mentre la presència de l'Adwtorf123 es detectava per amplificació d'una banda de 977 pb

(Fig. 9Ca). La relació entre les dues bandes, comparada amb una recta patró (Fig. 9Cb), ens donava la relació de la quantitat d'Adwtorf123 respecte l'Adwt a cada passatge. En cas que l'expressió de les proteïnes ORF1, ORF2 o ORF3 donés una avantatge en quan a replicació viral, els passatges consecutius s'haurien d'enriquir en Adwt, i empobrir en Adwtorf123. En canvi, tal i com es mostra a la Figura 9C, les relacions entre l'Adwtorf123 i Adwt, tan en les cèl·lules PC3 (Fig. 9Cc), com en les cèl·lules A549 (Fig. 9Cd), es van mantenir invariables al llarg dels passatges.

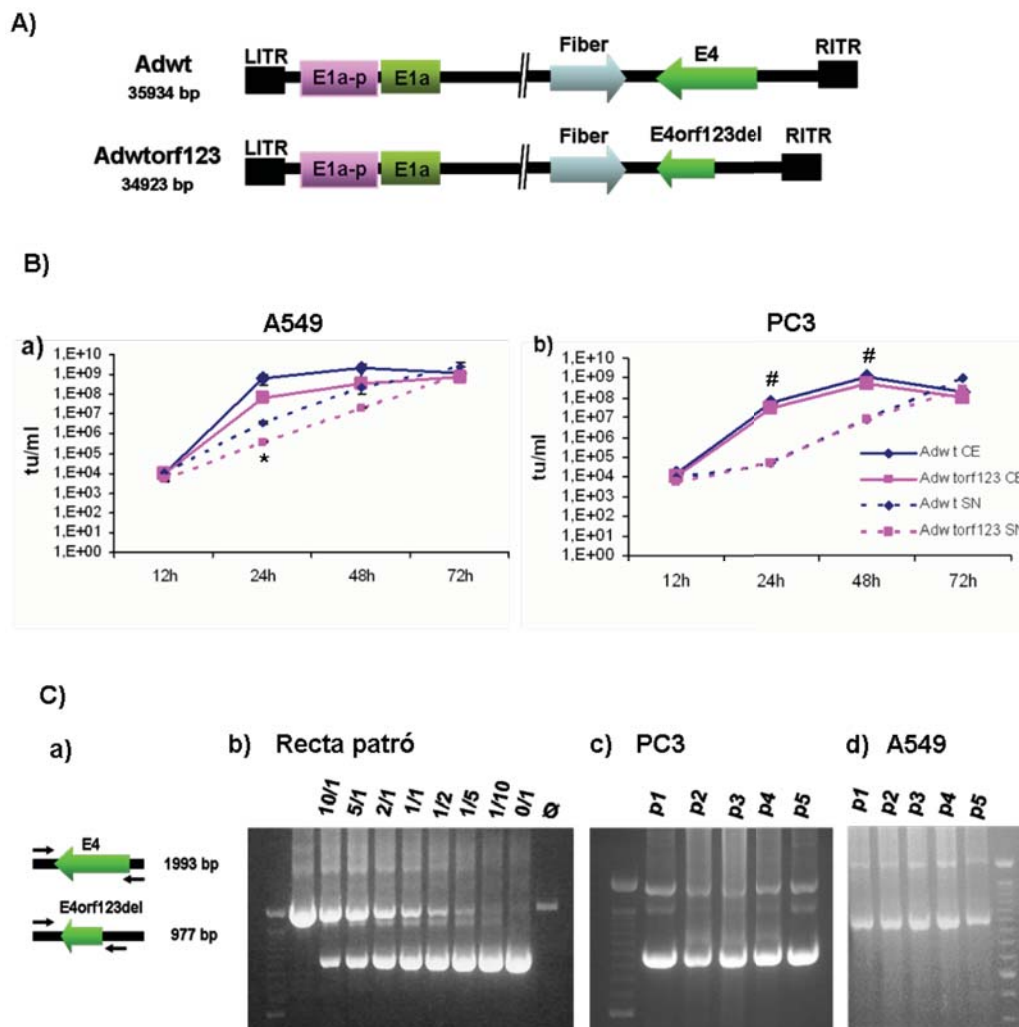


Figura 9. Caracterització de l'adenovirus Adwtorf123. (A) l'Adwtorf123 conté una deleció de la seqüència entre 34508 i 35525, que elimina els gens que codifiquen per les proteïnes ORF1, ORF2 i ORF3, de la regió E4. La llargada total de la deleció és de 1017 pb. (B) Efecte de la deleció dels ORF1,2,3 d'E4 en la replicació i alliberament viral. Es van infectar les cèl·lules tumorals A549 (a) i PC3 (b) amb 20 m.o.i de l'Adwt i l'Adwtorf123. Als temps indicats, es van recollir els extractes cel·lulars totals i els sobrenedant es van titular per tinció de l'hexò. *p < 0.02 respecte la quantitat d'Adwt alliberada al sobrenedant. # p < 0.02 respecte la quantitat d'Adwt produïda. (C) Anàlisi de la producció viral mitjançant un assaig de competició. Les cèl·lules PC3 i A549 es van co-infectar amb 20 m.o.i d'Adwtorf123 i Adwt. Un cop es va obtenir un efecte citopàtic total, es va recollir una alíquota de sobrenedant (SN) per realitzar l'extracció de DNA (p1), i els extractes cel·lulars totals es van submetre a tres cicles de congelació i descongelació per alliberar les partícules virals al sobrenedant. Noves cèl·lules PC3 (c) i A549 (d) van ser infectades amb els extractes cel·lulars durant 5 passatges. El DNA viral es va extreure del SN dels 5 passatges consecutius, i es va analitzar per PCR mitjançant l'amplificació de la regió E4. La corba patró (b) es va realitzar mesclant proporcions diferents de plasmidis que contenien el genoma complet dels virus Adwtorf123 i Adwt (pAdwt i pAdwtorf123). Com a marcador es va utilitzar el 1 kb ladder.

2.1.2. Capacitat citotòxica de l'Adwtorf123 respecte l'Adwt.

Per tal d'analitzar l'efecte de la deleció dels ORF1,2,3 de la regió E4 en la capacitat citotòxica de l'adenovirus Adwtorf123 es va realitzar un assaig citotoxicitat. Amb aquesta finalitat, es va infectar un panell de línies cel·lulars, incloent cèl·lules de carcinoma de pulmó, pàncrees i melanoma, amb dilucions seriades de l'Adwt i l'Adwtorf123 (Fig. 10). Com es mostra en la Figura 10 B, en les cèl·lules SKMel28 i en les cèl·lules NP9, les corbes dosi-resposta dels dos virus van ser molt similars. En les cèl·lules A549, en canvi, es requereix gairebé 6 vegades més d'Adwtorf123 que d'Adwt per tal d'eliminar el 50 % de les cèl·lules tumorals en cultiu. Aquests resultats estan en acord amb els resultats obtinguts en l'assaig de replicació viral, i indiquen que, mentre en les A549 la deleció dels ORF1,2,3 de la regió E4 de l'adenovirus pot anar en detriment de la producció viral, i la citotoxicitat cel·lular, en altres línies tumorals, aquesta regió pot ser més prescindible.

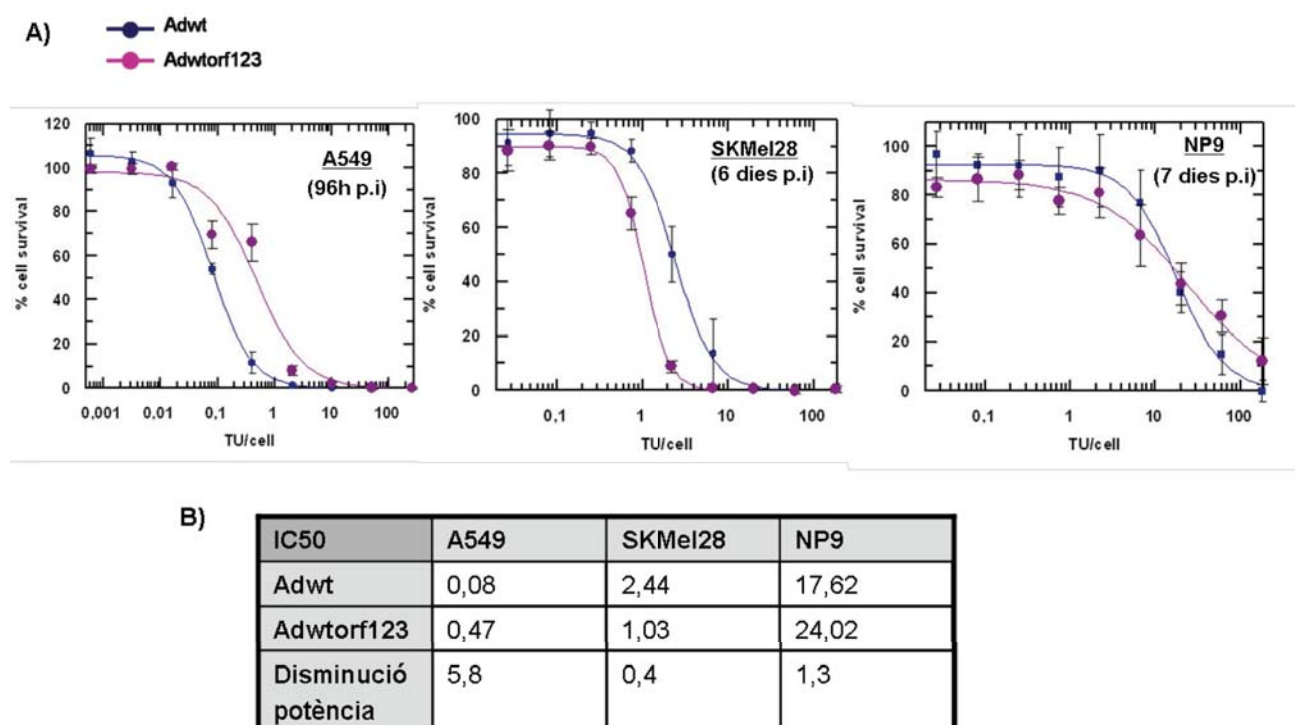


Figura 10. Perfil de citotoxicitat de l'adenovirus Adwtorf123 respecte l'adenovirus Adwt. Les cèl·lules tumorals A549, SKMel28 i NP9 es van sembrar en plaques de 96 pous i es van infectar amb dilucions seriades de l'Adwt o l'Adwtorf123. Als temps indicats, es va tènir el contingut proteic de cada pou, i es va mesurar l'absorbància. **(A)** Corbes dosi-resposta. **(B)** La quantitat de TU per cèl·lula necessària per produir el 50% de mort cel·lular (valor IC₅₀) es va estimar a partir d'una corba dosi-resposta per regressió no lineal, mitjançant una adaptació de l'equació de Hill. La disminució de la potència es defineix com la ràtio dels valors de IC₅₀ obtinguts per l'Adwt i l'Adwtorf123.

2.1.3. Generació i caracterització de l'adenovirus ICOVIR9dE4.

Per tal d'augmentar l'eficàcia antitumoral de l'adenovirus ICOVIR5, i en vista dels resultats obtinguts amb l'AdwtRGD-GALV, varem decidir inserir el gen *GALV* en el genoma de l'ICOVIR5, per generar l'ICOVIR9dE4. En l'ICOVIR9dE4, el casset *GALV* va ser inserit darrera del gen de la fibra adenoviral, tal i com s'havia fet prèviament amb l'AdwtRGD-GALV. El resultat de la inserció, va ser un genoma adenoviral de 38984 pb, 3049 pb més que l'Adwt. Per tal de reduir la llargada d'aquest genoma, i permetre l'encapsidació del DNA viral, en l'ICOVIR9dE4 els ORF1,2,3 d'E4 van ser deletats (Fig. 11A). La transfecció del genoma resultant, de 37972 pb, en les cèl·lules 293, va induir una formació massiva de sincitis multinucleats i la generació de l'ICOVIR9dE4. L'amplificació de l'ICOVIR9dE4 es va fer a partir d'un clon fusogènic seleccionat per l'assaig de formació de calbes.

Per tal d'analitzar l'efecte de les diferents modificacions realitzades en l'adenovirus ICOVIR9dE4 sobre la replicació viral es va realitzar un assaig producció viral per infecció de les línies tumorals A549, PC3 i SKMel28 amb altes m.o.i d'ICOVIR5 i ICOVIR9dE4. La quantitat de virus funcional present als extractes cel·lulars totals i als sobrenedant als diferents temps es va determinar per tinció de l'hexó. En les cèl·lules A549 la producció viral d'ICOVIR9dE4 va ser significativament inferior (entre 12-15 vegades) a la producció viral d'ICOVIR5 en tots els temps (Fig. 11Ba). A més, l'alliberament d'ICOVIR9dE4 al sobrenedant es va veure dràsticament disminuït. El títol d'ICOVIR9dE4 al sobrenedant a les 72 h era 800 vegades inferior al d'ICOVIR5, mentre a les 96 h, la diferència era de més de 2000 vegades. En les cèl·lules PC3 la producció viral d'ICOVIR9dE4 també es va veure disminuïda respecte l'ICOVIR5 (entre 24-55 vegades) en tots els temps (Fig. 11Bb). Els títols d'ICOVIR9dE4 en el sobrenedant també van ser menors als d'ICOVIR5, sent les diferències al final de l'experiment d'unes 200 vegades. En canvi, en les cèl·lules SKMel28, no es van trobar diferències en la quantitat d'ICOVIR9dE4 produïda respecte l'ICOVIR5. Les diferències entre els títols dels dos virus en el sobrenedant van ser molt petites, i van variar entre 2 i 5 vegades segons el temps post-infecció (aquesta dada no es mostra).

Per tal d'analitzar si la disminució de la producció viral d'ICOVIR9dE4 era deguda a problemes en la replicació del DNA o a deficiències en el procés d'encapsidació del virus, es va repetir l'assaig de producció viral en les cèl·lules A549, però aquesta vegada, es va determinar la quantitat de partícules físiques (vp) mitjançant la quantificació del DNA per PCR a temps real. Tal i com mostra la figura 11Bc, la producció de partícules físiques d'ICOVIR9dE4 i ICOVIR5 va ser molt similar al llarg del temps. En canvi, l'alliberament d'ICOVIR9dE4 al sobrenedant es va tornar a veure disminuït. Al final de l'experiment (72 h p.i), el títol físic d'ICOVIR9dE4 al sobrenedant era pràcticament 100 vegades inferior al d'ICOVIR5.

Aquests resultats demostraven que, tot i que la replicació del DNA viral s'estava donant correctament, una part important de les càpsides formades no eren funcionals. Una possibilitat era que la proteïna de la fibra s'estigués expressant en menor quantitat, i per tan les partícules virals formades tinguessin quantitats inferiors de fibra. Per tal d'analitzar aquesta possibilitat, la composició proteica dels virions purificats de l'ICOVIR5 i l'ICOVIR9dE4 es va analitzar per tinció amb nitrat de plata. La figura 12C mostra que la quantitat de fibra present en les càpsides virals d'ICOVIR9dE4 és inferior a la quantitat de fibra present en les càpsides d'ICOVIR5.

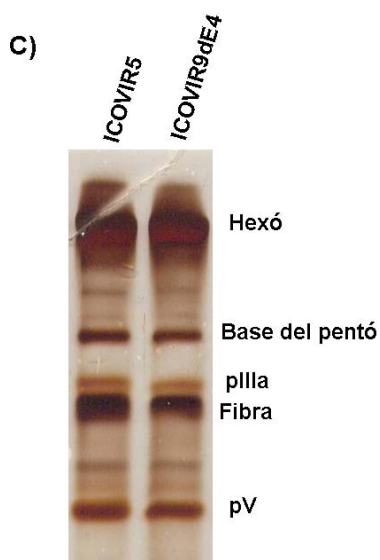
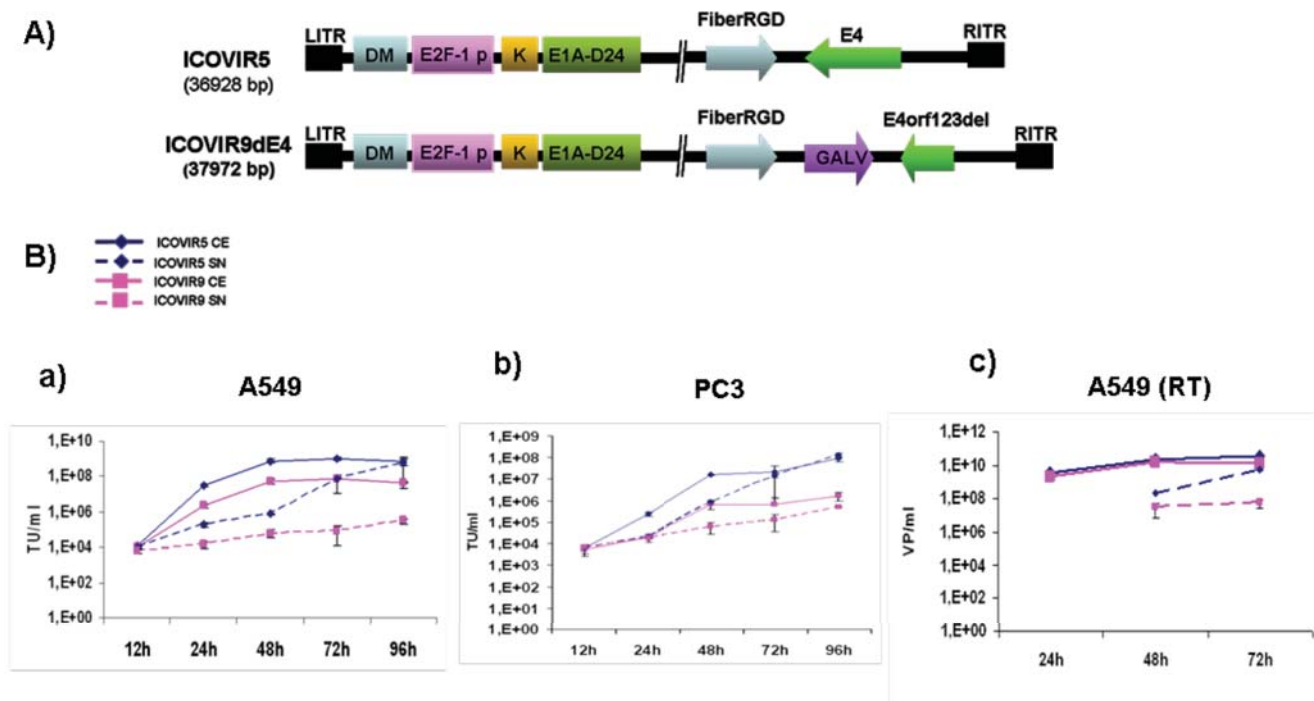


Figura 11. Generació i caracterització de l'adenovirus ICOVIR9dE4. (A) Estructura dels virus utilitzats en aquest estudi. Tan en l'ICOVIR5, com en l'ICOVIR9dE4, el promotor endogen d'E1A ha estat reemplaçat per la forma aïllada del promotor d'E2F-1, la seqüència kozac inserida immediatament abans de la seqüència codificant per l'E1A- Δ 24, i el motiu RGD inserit al *knob* de la fibra adenoviral. En l'ICOVIR9dE4 es va inserir darrera el gen de la fibra adenoviral el casset GALV, que consisteix en la seqüència acceptora de tall i lligació, SA, la seqüència kozac, el cDNA de GALV, i una seqüència poliA. A més, els ORF1,2,3 de la regió E4 van ser deletats. La llargada total del genoma de l'ICOVIR9dE4 és 2037 pb superior a la de l'Adwt, i 1044 pb superior a la de l'ICOVIR5. (B) Es van infectar les cèl·lules tumorals A549 (a) i PC3 (b) amb dosis elevades d'ICOVIR5 i ICOVIR9dE4 (100% d'infectivitat). A diferents temps després de la infecció, es van recollir els extractes cel·lulars i els sobrenedants, i les partícules funcionals presents a cada mostra es van titular per tinció de l'hexó. (c) Es van infectar les cèl·lules A549 amb dosis elevades d'ICOVIR5 i ICOVIR9dE4. Als temps indicats, es van recollir els extractes cel·lulars i els sobrenedants, i les partícules físiques (vp) presents a cada mostra es van titular per PCR a temps real. (C) Anàlisi del contingut proteic dels adenovirus purificats. 5×10^{10} partícules virals d'ICOVIR5 i d'ICOVIR9dE4 es van resoldre per electroforesi en un gel d'acrilamida al 10%, i posteriorment es van tenyir amb nitrat de plata.

2.1.4. Anàlisi de la citotoxicitat de l'ICOVIR9dE4 respecte l'ICOVIR5.

Tot i que els títols d'ICOVIR9dE4 en els assajos de producció viral eren molt baixos, les cèl·lules infectades amb dosis elevades d'ICOVIR9dE4 durant l'assaig de producció morien tan o més eficientment que les cèl·lules infectades amb l'ICOVIR5. Per tal d'analitzar si l'expressió de la glicoproteïna GALV era capaç d'augmentar la citotoxicitat de l'ICOVIR9dE4 respecte l'ICOVIR5 després de la infecció a baixes m.o.i de virus, varem realitzar un assaig de citotoxicitat. Es van infectar un panell de línies cel·lulars amb dilucions seriadades d'ICOVIR5 i d'ICOVIR9dE4, i als diferents temps post-infecció es va determinar la viabilitat cel·lular. En totes les línies testades, l'ICOVIR9dE4 va matar les cèl·lules més eficientment que l'ICOVIR5 (Fig. 12A). # $p < 0.05$ respecte l'ICOVIR5. La infecció de les diferents línies tumorals amb l'ICOVIR9dE4 va resultar en la formació de grans sincitis multinucleats. En tots els casos, el grau de citotoxicitat provocat per la infecció d'ICOVIR9dE4 semblava correlacionar amb l'extensió de formació de sincitis (Fig. 12B).

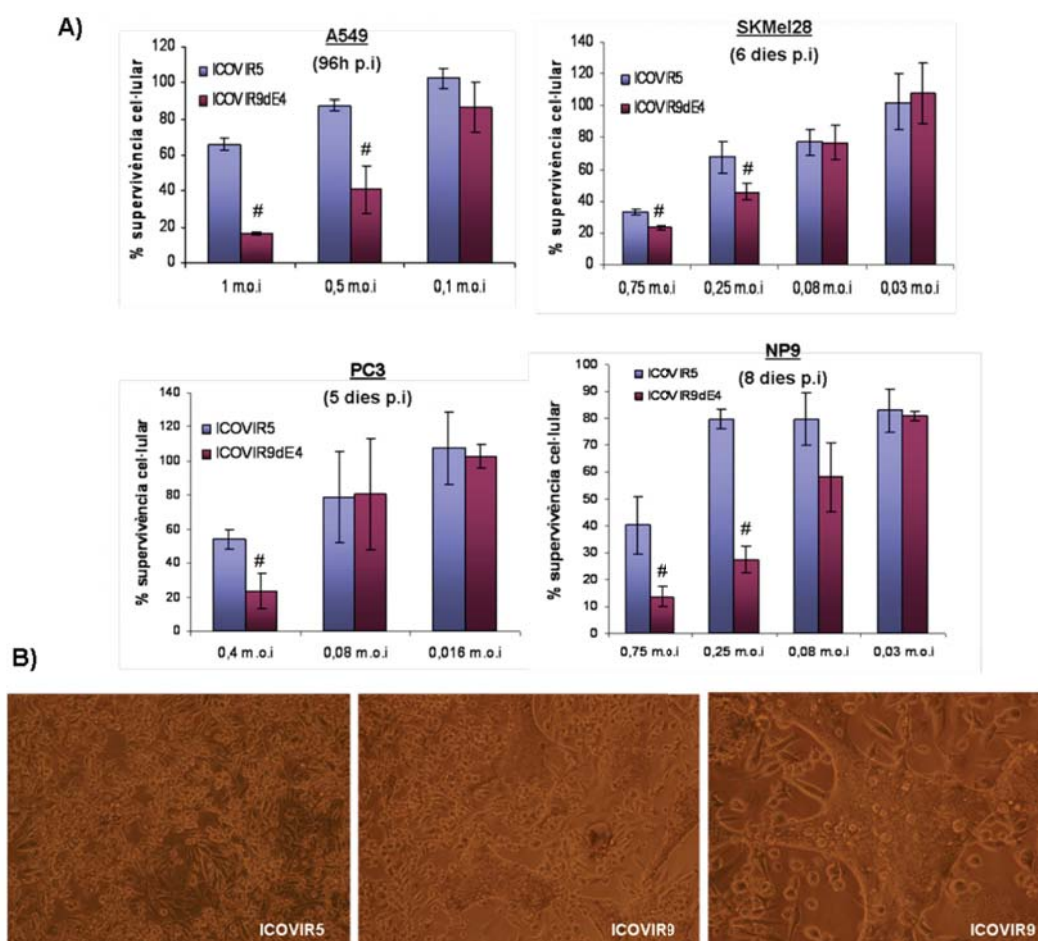


Figura 12. Citotoxicitat de l'ICOVIR9dE4 respecte l'ICOVIR5 *in vitro*. (A) Les línies tumorals, A549, SKMel28, NP9 i PC3 es van infectar amb dilucions seriadades d'ICOVIR5 i d'ICOVIR9dE4. Als temps indicats, les cèl·lules es van tripsinitzar, es van tenyir amb blau de tripà i les cèl·lules viables es van contar. La viabilitat de cada cultiu infectat s'expressa com a percentatge respecte la viabilitat dels cultius controls no infectats. # $p \leq 0.05$ (B) Les cèl·lules PC3 infectades a 0.4 m.o.i d'ICOVIR5 i d'ICOVIR9dE4 es van fotografiar a dia 5 post-infecció.

2.1.5. Anàlisi de l'eficàcia antitumoral *in vivo* de l'ICOVIR9dE4 respecte l'ICOVIR5.

L'augment de la citotoxicitat produït per l'expressió de la glicoproteïna GALV *in vitro* es podria traduir en un augment de l'eficàcia antitumoral de l'ICOVIR9dE4 respecte l'ICOVIR5 *in vivo*. Per analitzar aquesta possibilitat, varem injectar ratolins immunodeficients amb tumors subcutanis preestablerts de la línia tumoral humana PC3 amb PBS o amb una dosi única de 5×10^{10} partícules virals d'ICOVIR5 o d'ICOVIR9dE4. Els tumors de PC3 són tumors que contenen elevades concentracions de matriu extracel·lular, i de creixement molt ràpid. En aquestes condicions, l'administració sistèmica d'ICOVIR5 va aconseguir alentir la progressió tumoral respecte el PBS, tot i que les diferències no van ser significatives en cap punt (Fig. 13A). Al final de l'experiment (dia 28 p.i), el volum dels tumors tractats amb ICOVIR5 era un 21 % inferior al volum dels tumors tractats amb PBS. L'adenovirus ICOVIR9dE4 va mostrar una tendència a millorar els resultats terapèutics de l'ICOVIR5, sent el volum dels tumors tractats amb l'ICOVIR9dE4 un 35 % inferior als tractats amb PBS. Les diferències entre el volum dels tumors tractats amb ICOVIR9dE4 o PBS van ser significatives entre els dies 11 i 18 de tractament ($\# p \leq 0.05$).

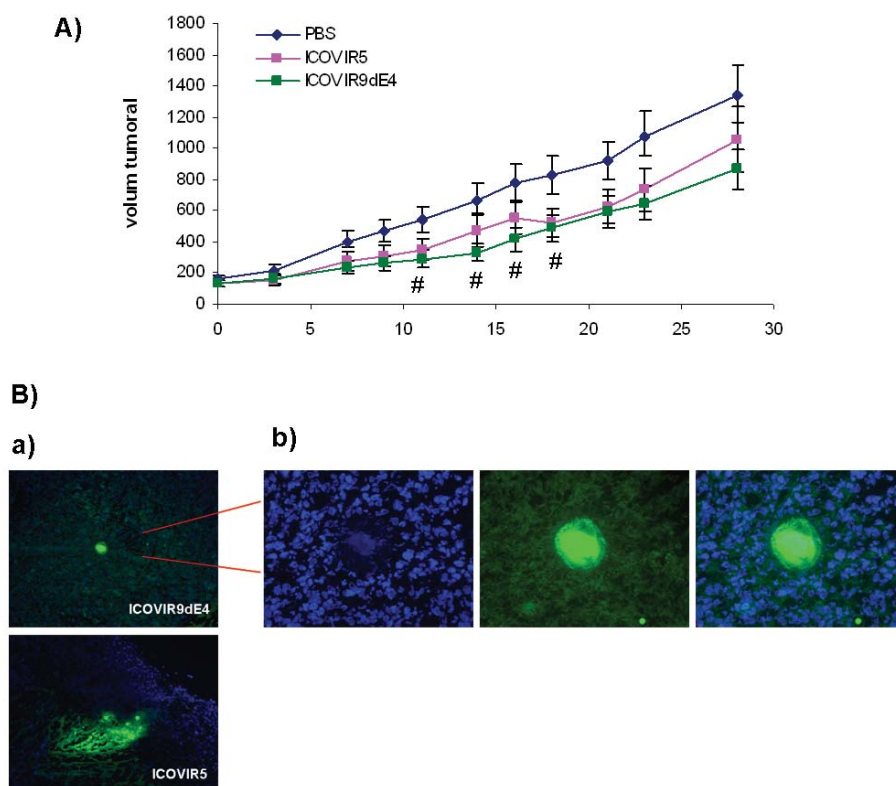


Figura 13. Anàlisi de l'activitat antitumoral de l'ICOVIR9dE4 respecte l'ICOVIR5 *in vivo*. (A) Ratolins immunodeficients nu/nu amb tumors subcutanis de la línia PC3, amb una mida d'uns 170 mm^3 , van ser tractats amb una única injecció intravenosa de 5×10^{10} partícules virals d'ICOVIR5, d'ICOVIR9dE4 o amb PBS. El volum tumoral es va seguir cada 2-3 dies. $\# p \leq 0,05$ respecte el grup PBS. (B) Detecció immunohistoquímica de l'ICOVIR5 i l'ICOVIR9dE4 en els tumors de PC3. Els tumors de PC3 es van extreure 28 dies després de l'administració viral, i es van congelar en OCT. La presència d'adenovirus en tumors es va detectar per immunohistoquímica amb un anticòs anti-adenoviral, i la detecció dels nuclis de les cèl·lules tumorals es va realitzar per tinció amb DAPI. (a) ampliació 10x (b) ampliació 40x.

Per tal d'analitzar si l'alentiment del creixement tumoral dels grups tractats amb ICOVIR5 i ICOVIR9dE4 es devia a la replicació del virus pel tumor, es va analitzar la presència de focus de replicació viral en els tumors extrets 28 dies després de l'administració viral. L'anàlisi immunohistoquímica de les seccions tumorals amb un anticòs anti-adenoviral va revelar focus d'infecció adenoviral en els tumors tractats amb ICOVIR5. En canvi, en els tumors tractats amb l'ICOVIR9dE4, es van poder detectar molt pocs focus de replicació viral, sent la presència d'ICOVIR9dE4 mínima en tots els tumors analitzats. La figura 14B mostra la presència d'un sinciti en un dels tumors de PC3 administrats amb l'ICOVIR9dE4.

2.2. EFECTE DE LA INSERCIÓ DEL GEN GALV SOBRE L'EFICÀCIA ANTITUMORAL DE L'ICOVIR15.

Duran la realització d'aquesta tesi, en el nostre laboratori es va generar un nou adenovirus de replicació condicionada, l'ICOVIR15, amb un genoma molt compacte, de mida similar a la de l'adenovirus salvatge. En l'ICOVIR15, el promotor endogen d'E1A ha estat modificat mitjançant la inserció de quatre còpies de la seqüència d'unió del factor de transcripció E2F i una còpia de la seqüència d'unió del factor de transcripció Sp1 en la posició 415 de l'adenovirus. L'eficàcia de l'ICOVIR15 per matar cèl·lules tumorals *in vitro* va resultar molt similar a la de l'AdwtRGD. L'administració sistèmica de $5 \cdot 10^{10}$ vp d'ICOVIR15 en ratolins immunocompetents va ser poc tòxica, demostrant un nivell de selectivitat tumoral similar al de l'ICOVIR5.

En aquest apartat, el casset GALV s'insereix en el genoma de l'ICOVIR15 per tal de generar un nou adenovirus fusogènic de replicació condicionada, l'ICOVIR16. A continuació, s'analitza la producció i citotoxicitat de l'ICOVIR16 *in vitro*, així com la seva l'eficàcia antitumoral *in vivo*.

2.2.1. Generació i caracterització de l'adenovirus ICOVIR16.

En ICOVIR16, igual que en l'ICOVIR15, l'expressió d'E1A- Δ 24 està controlada pel promotor endogen d'E1A modificat, mitjançant la inserció de 4 llocs d'unió a E2F i un lloc d'unió a Sp1. L'ICOVIR16, igual que l'ICOVIR9dE4, conté el casset d'expressió GALV inserit darrera el gen de la fibra adenoviral, sota el control del MLP de l'adenovirus (Fig. 14A). La llargada del genoma de l'ICOVIR15 presenta 154 pb més que la de l'adenovirus salvatge. Tot i que el genoma de l'ICOVIR16 conté 2260 pb més que l'Adwt, i per tan sobrepassa una mica la llargada màxima d'encapsidació, varem decidir no deletar cap seqüència adenoviral del genoma de l'ICOVIR16. La transfecció del genoma de l'ICOVIR16 en les cèl·lules 293 va resultar en la

formació de grans sincitis, i en la generació de l'adenovirus oncolític fusogènic. L'amplificació de l'ICOVIR16 es va fer a partir d'un clon fusogènic seleccionat per l'assaig de formació de calbes, en les cèl·lules A549.

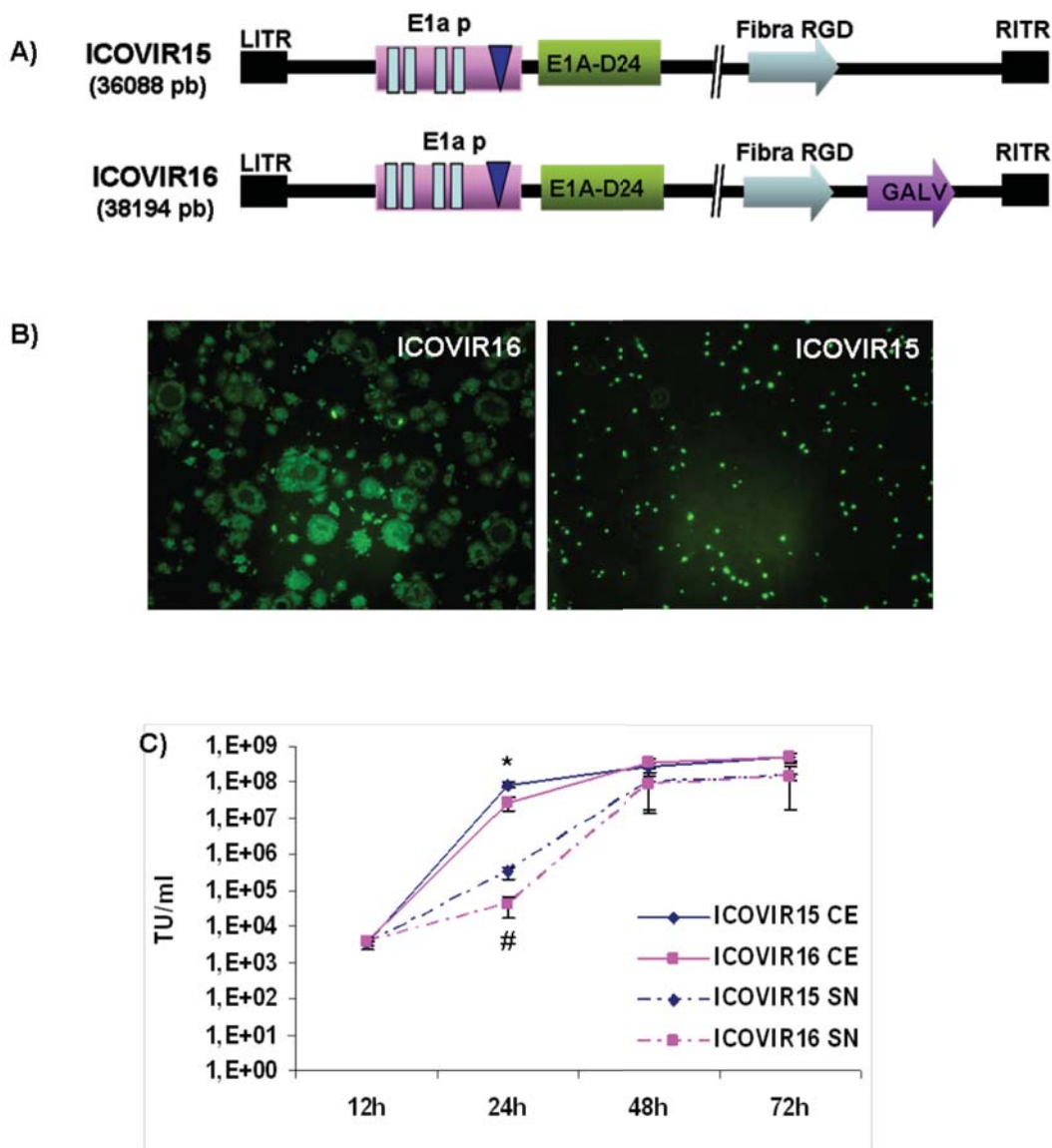


Figura 14. Generació i caracterització de l'ICOVIR16. (A) Representació esquemàtica dels adenovirus utilitzats. Tan en l'ICOVIR15, com en l'ICOVIR16, la proteïna E1A- Δ 24 està controlada pel promotor endogen d'E1A modificat mitjançant la inserció de 4 llocs d'unió a E2F (rectangles blau-cel) i un lloc d'unió a Sp1 (triangle blau-mari). En l'ICOVIR16 s'ha inserit el casset GALV darrera el gen de la fibra adenoviral modificada amb la inserció del motiu RGD. (B) Els estocs virals d'ICOVIR15 i ICOVIR16 es van titular per tinció de l'hexó amb un anticòs primari que reconeix les proteïnes de la càpsida viral, i un anticòs secundari marcat amb Alexa 488. Amplificació 10x. (C) Anàlisi de la producció i l'alliberament al sobredant de l'ICOVIR16 respecte l'ICOVIR15 en A549. * $P \leq 0,02$ respecte la producció d'ICOVIR15. # $P \leq 0,001$ respecte l'alliberament al sobredant d'ICOVIR15.

Com que el genoma de l'ICOVIR16 era molt llarg, hi havia la possibilitat que el virus fos inestable i recombinés eliminant una part del seu genoma. Aleshores, els extractes cel·lulars estarien formats per una barreja de virus recombinants. A mesura que el virus s'anés amplificant,

el virus amb una avantatge replicativa (en aquest cas, un genoma més curt) es seleccionaria. Per tal de descartar aquesta possibilitat, l'ICOVIR16 es va amplificar per passatges successius, i es va purificar per gradients de clorur de cesi. A partir del virus purificat, es va fer una extracció de DNA. Les regions del genoma corresponents al promotor d'E1a, el gen *E1a*, el gen *GALV*, i el gen de la *fibra* adenoviral es van analitzar per seqüenciació, i el genoma sencer es va analitzar per restricció amb HindIII i EcoRV. L'anàlisi per restricció i seqüenciació dels genomes virals dels diferents estocs d'ICOVIR16 utilitzats en aquest treball, han estat sempre correctes. Tots els estocs s'han titulat per tinció de l'hexó. Amb aquesta tècnica, les proteïnes de la càpside viral acabades de sintetitzar queden marcades amb fluorescència verda. D'aquesta manera, les cèl·lules 293 infectades amb virus s'identifiquen com a punts verds al microscopi de fluorescència. Les cèl·lules infectades amb virus fusogènics formen sincitis, i per tant el marcatge verd s'esten a tot el sinciti. Com es mostra a la figura 14B, pràcticament el 100% de les cèl·lules infectades amb ICOVIR16 s'han fusionat amb les cèl·lules veïnes, indicant que dins l'estoc purificat, tots els virus estan expressant la glicoproteïna GALV.

A continuació, es va voler analitzar si la inserció del gen *GALV* interferia en la replicació viral de l'ICOVIR16. En les cèl·lules A549, la producció i l'alliberament viral de l'ICOVIR16 va ser molt similar a la de l'ICOVIR15 (Fig. 14C), sobretot als últims temps del cicle replicatiu (48h i 72h). Tot i així, a les 24 h post-infecció es van detectar petites diferències en els títols virals del dos virus. La quantitat d'ICOVIR16 produït a les 24 h post-infecció va ser tres vegades inferior la quantitat d'ICOVIR15 produït (* $p \leq 0.02$). A aquest mateix temps, la quantitat de virus fusogènic (ICOVIR16) al sobrenedant era gairebé 8 vegades inferior al del virus no fusogènic (ICOVIR15) (# $p \leq 0.001$), indicant que la inserció del gen *GALV* o la formació de sincitis podrien estar alentint el cicle replicatiu de l'ICOVIR16.

2.2.2. Anàlisi de la citotoxicitat de l'adenovirus ICOVIR16 respecte l'ICOVIR15.

Per tal d'analitzar si l'expressió de la glicoproteïna GALV era capaç d'augmentar la citotoxicitat de l'ICOVIR16 respecte l'ICOVIR15 després de la infecció a baixes m.o.i de virus, varem realitzar un assaig de citotoxicitat. Cèl·lules de melanoma i càncer de pàncrees es van infectar amb dilucions seriades de l'ICOVIR15 i l'ICOVIR16, i als diferents temps post-infecció es va determinar la supervivència cel·lular. En ambdues línies tumorals, l'expressió de la glicoproteïna GALV va resultar en la formació de sincitis i en la millora de la citotoxicitat de l'ICOVIR16 respecte l'ICOVIR15 (# $p < 0.05$). L'assaig es va repetir de la mateixa manera amb fibroblasts associats a carcinoma (CAF-1). L'eliminació dels fibroblasts que es troben barrejats amb les cèl·lules tumorals és imprescindible per l'eradicació total del tumor. La infecció dels

fibroblasts amb l'ICOVIR16 va resultar en la formació de grans sincitis i en una millor eliminació dels fibroblasts en cultiu respecte la infecció amb ICOVIR15 (# $p < 0.05$) (Fig. 15).

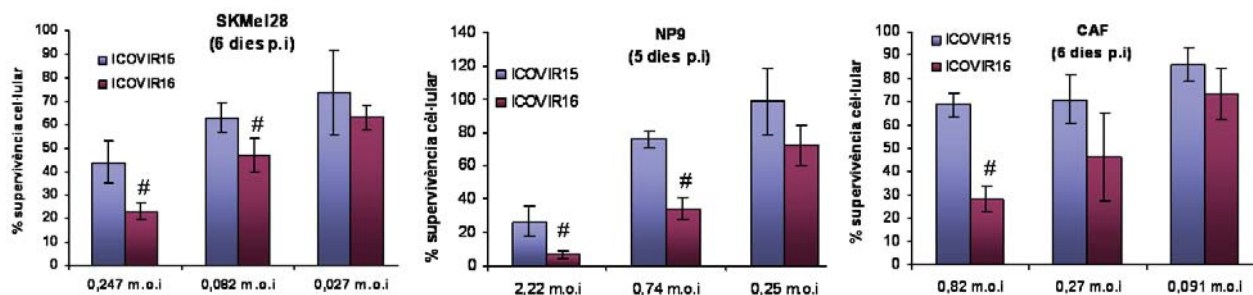


Figura 15. Citotoxicitat de l'ICOVIR16 respecte l'ICOVIR15 *in vitro*. Les línies tumorals SKMe128 i NP9 i els fibroblasts associats a tumor (CAF-1) es van infectar amb dilucions seriadades d'ICOVIR15 i d'ICOVIR16. Als temps indicats, les cèl·lules es van tripsinitzar, es van tenyir amb blau de tripà i les cèl·lules viables es van contar. La viabilitat de cada cultiu infectat s'expressa com a percentatge respecte la viabilitat dels cultius controls no infectats. # $p \leq 0.05$

2.2.3. Anàlisi de l'eficàcia antitumoral *in vivo* de l'ICOVIR16 respecte l'ICOVIR15 després de l'administració intratumoral.

Per tal d'analitzar si l'expressió de la glicoproteïna GALV podia augmentar l'eficàcia antitumoral de l'ICOVIR16 respecte l'ICOVIR15 *in vivo*, varem injectar ratolins immunodeficients amb tumors subcutanis de la línia tumoral humana SKMe128 amb PBS o amb una dosi única de 1×10^8 tu d'ICOVIR15 o d'ICOVIR16. En la majoria de treballs realitzats amb adenovirus oncolítics, l'administració intratumoral (en tumors en ratolins o en pacients), es realitza injectant dosis de virus repetides i injectades en diferents punts del tumor per tal d'afavorir la distribució del virus per la massa tumoral. En aquest treball, les solucions virals es van administrar per injecció intratumoral en un sol punt del tumor per tal d'analitzar l'efecte de l'expressió del transgèn sobre la distribució de l'adenovirus. Tal i com es mostra a la figura 16A, l'adenovirus fusogènic ICOVIR16 va demostrar una gran activitat oncolítica, i va ser capaç de controlar el creixement tumoral més eficientment que l'adenovirus control, l'ICOVIR15 (# $p \leq 0,05$). Al final de l'experiment, el 70 % dels tumors injectats amb ICOVIR16 estaven regressant, mentre en el grup injectat amb ICOVIR15 regressaven el 30 % dels tumors. El 100 % dels tumors injectats amb PBS estaven creixent en el moment del sacrifici. El tan per cent de creixement tumoral dels grups injectats amb ICOVIR15 i ICOVIR16 va ser molt menor al del grup injectat amb PBS, sent les diferències estadísticament significatives des dels primers dies de tractament (* $p \leq 0,02$). Al final de l'experiment, els tumors van ser extrets i pesats. El pes dels tumors injectats amb l'ICOVIR16 va ser significativament inferior al pes dels tumors injectats amb ICOVIR15 (# $p \leq 0,05$) o amb PBS (* $p \leq 0,02$) (Fig. 16B).

Per tal de comprovar si el control del creixement tumoral dels grups tractats amb ICOVIR15 i ICOVIR16 es devia a la replicació del virus pel tumor, es va analitzar la presència de focus de replicació viral en els tumors extrets 42 dies després de l'administració viral. L'anàlisi immunohistoquímica de les seccions tumorals amb un anticòs anti-adenoviral va revelar focus d'infecció adenoviral en tots els tumors tractats amb ICOVIR15. En els tumors tractats amb ICOVIR16, el virus es va detectar en majors quantitats, i distribuït de forma més homogènia pel tumor (Fig. 16C). Tots els tumors injectats amb virus contenien grans àrees necròtiques, al voltant de les quals es trobaven els focus de replicació viral. Aquests resultats indicaven que l'expressió de la glicoproteïna GALV podia augmentar l'activitat antitumoral i millorar la distribució pel tumor d'un adenovirus oncolític administrat intratumoralment.

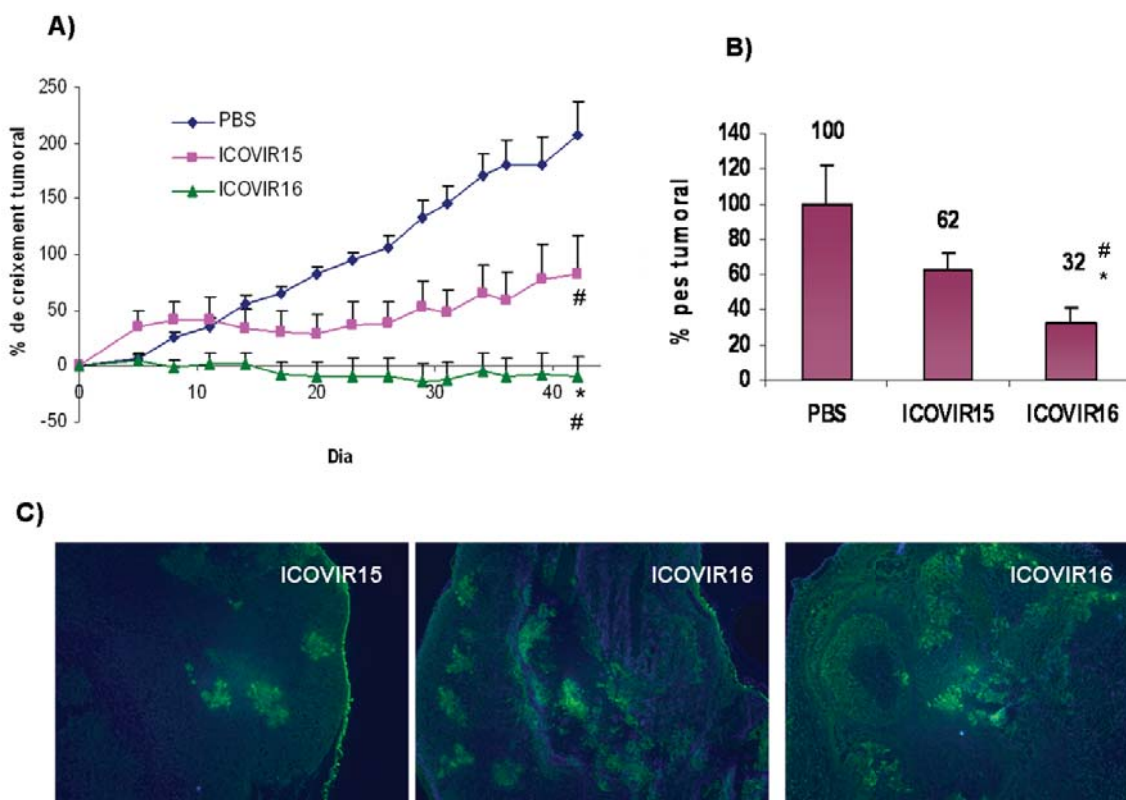


Figura 16. Eficàcia antitumoral de l'ICOVIR16 després de l'administració intratumoral en un model de melanoma. (A) Cèl·lules de la línia SKMel28 es van implantar en ratolins immunodeficients nu/nu. Quan els tumors van assolir una mitjana de 100 mm³, es van injectar amb PBS o amb una única dosi de 1x10⁸ TU d'ICOVIR15 i d'ICOVIR16 (n=10). La gràfica mostra la mitjana del creixement dels tumors de cada grup respecte el dia 0, en funció del temps post-administració. Els resultats es presenten com la mitjana ± S.E. # P ≤ 0,02, significativament diferent al grup injectat amb PBS. *P < 0,05, significativament diferent al grup injectat amb ICOVIR15. (B) 42 dies després de l'administració intratumoral, els ratolins es van sacrificar, i els tumors es van extreure i es van pesar. El tan per cent de pes tumoral es va calcular en relació al pes dels tumors injectats amb PBS. # P ≤ 0,02, significativament diferent al grup injectat amb PBS. *P ≤ 0,05, significativament diferent al grup injectat amb ICOVIR15. (C) Detecció immunohistoquímica de l'ICOVIR15 i l'ICOVIR16 en els tumors de SKMel28. La presència d'adenovirus en tumors extrets 42 dies després de l'administració es va detectar per immunohistoquímica amb un anticòs anti-adenoviral, i la detecció dels nuclis de les cèl·lules tumorals es va realitzar per tinció amb DAPI. Les fotografies presenten una ampliació 4x.

2.2.4. Anàlisi de l'eficàcia antitumoral de l'administració sistèmica de l'adenovirus ICOVIR16 respecte l'ICOVIR15.

A continuació, varem analitzar l'habilitat de l'ICOVIR16 d'inhibir el creixement tumoral de tumors xenògrafs humans de diferents orígens per administració sistèmica. Per això, es van administrar 5×10^{10} vp dels adenovirus ICOVIR15, ICOVIR16 o PBS en ratolins immunodeprimits amb tumors subcutanis de melanoma, pàncrees o pròstata. En tots els models analitzats, l'adenovirus fusogènic ICOVIR16 va controlar el creixement tumoral més eficientment que l'adenovirus control, l'ICOVIR15 (* $P \leq 0,05$) i que el PBS (* $p \leq 0,05$) (Fig. 17). En el model d'SKMe128, on els tumors van créixer molt a poc a poc, l'ICOVIR16 va alentir significativament el creixement tumoral respecte el grup tractat amb ICOVIR15. A dia 48 post-administració, l'adenovirus fusogènic ICOVIR16 va induir una reducció del 75 % en el creixement dels tumors d'SKMe128 respecte el grup control (PBS). En aquest mateix punt, la reducció en el creixement dels tumors administrats amb l'adenovirus de referència, l'ICOVIR15, era d'un 30 %. En el model de PC3, de creixement molt ràpid, l'administració d'ambdós virus va poder alentir el creixement tumoral significativament respecte el grup no tractat. Després de 25 dies de l'administració viral, els ratolins tractats amb PBS es van haver de sacrificar degut a un creixement incontrolat dels tumors (mitjana del volum tumoral = 1262 mm^3). En aquest mateix punt, la mitjana dels tumors del ratolins tractats amb ICOVIR15 era de 817 mm^3 , mentre els tumors que havien rebut l'adenovirus fusogènic tenien un volum tumoral de 508 mm^3 . Els resultats més espectaculars es van obtenir en el model de NP18, on l'ICOVIR16 va demostrar una gran eficàcia antitumoral. Els tumors de NP18 tractats amb PBS van créixer ràpidament, i a dia 30 post-administració es van haver de sacrificar. En aquest moment, el 30 % dels tumors tractats amb ICOVIR16 havien regressat entre un 20 i un 50 % des del moment de l'administració. Només un 20 % dels tumors estaven creixent en el moment del sacrifici, i aquest creixement era un 35 % inferior al creixement dels tumors tractats amb PBS. Com a mitjana, l'administració d'ICOVIR16 van reduir el creixement tumoral un 91 % respecte el tractament amb PBS ($p \leq 0,005$). L'ICOVIR15 també va demostrar una bona capacitat terapèutica, tot i significativament menor a la d'ICOVIR16 ($p \leq 0,05$). A punt final de l'experiment (dia 30 p.i), l'administració d'ICOVIR15 va reduir el creixement tumoral un 77 % respecte el grup administrat amb PBS.

A continuació, varem voler analitzar la presència de virus en els tumors d'SKMe128 dels ratolins tractats per administració sistèmica d'ICOVIR15 i ICOVIR16. Tots els tumors analitzats presentaven focus de replicació viral més o menys extensos. Els tumors tractats amb l'adenovirus fusogènic ICOVIR16 presentaven zones necròtiques més extenses i una millor distribució viral que els tumors tractats amb ICOVIR15 (Fig. 17Ba). En les immunohistoquímiques en talls congelats l'estructura del teixit no es conserva correctament i això dificulta l'observació de possibles sincitis formats després de l'administració de l'adenovirus fusogènic. Tot i així, en els

tumors tractats amb ICOVIR16 els focus de replicació viral es caracteritzen per regions més desestructurades amb un marcatge més difús, que podrien correspondre a àrees de cèl·lules fusionades (Fig. 17Bb).

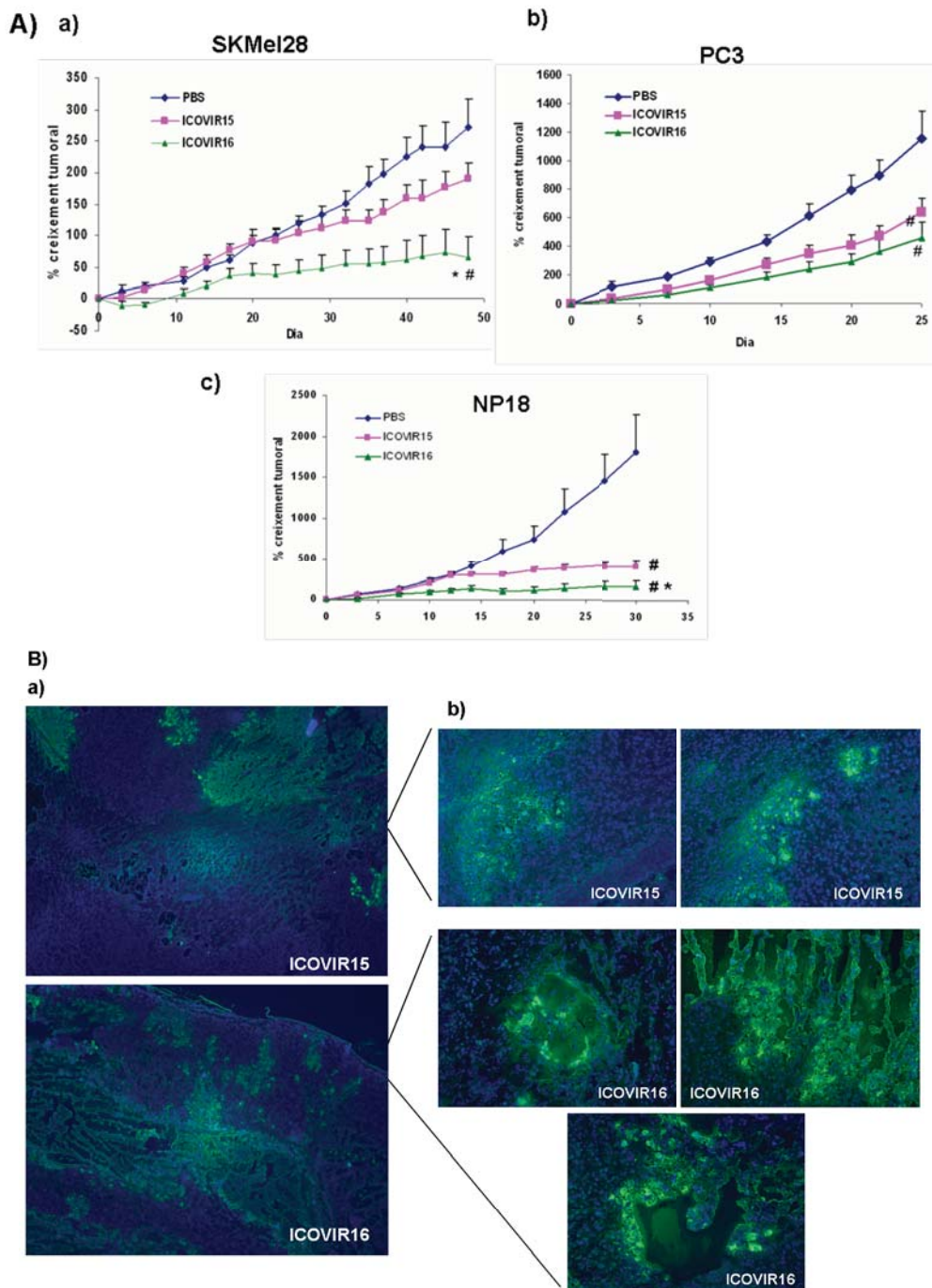


Figura 17. Eficàcia antitumoral de l'ICOVIR16 per administració sistèmica en diferents models tumorals *in vivo*. (A) Tumors de la línia (a) SKMeI28, (b) PC3 i (c) NP18 es van implantar en ratolins immunodeficients. Quan els tumors van assolir una mitjana d'entre 60-100 mm³, es van injectar amb PBS o amb una única dosi de 5x10¹⁰ vp d'ICOVIR15 i d'ICOVIR16 (n=10). Les gràfiques mostren la mitjana del creixement dels tumors de cada grup respecte el dia l'administració (dia 0). Els resultats es presenten com la mitjana ± S.E. # P ≤ 0.05, significativament diferent al grup injectat amb PBS. *P ≤ 0.05, significativament diferent al grup injectat amb ICOVIR15. (B) Detecció immunohistoquímica de l'ICOVIR15 i l'ICOVIR16 en els tumors de SKMeI28. Els animals amb tumors de la línia de melanoma SKMeI28 van ser sacrificats 48 dies després de l'administració viral. La presència d'adenovirus en els tumors es va detectar per immunohistoquímica amb un anticòs anti-adenoviral, i la detecció dels nuclis de les cèl·lules tumorals es va realitzar per tinció amb DAPI. Les fotografies presenten una ampliació (a) 4x (b) 20x.

3. EXPRESSIÓ DE HIALURONIDASES COM ESTRATÈGIA PER MILLORAR LA DISTRIBUCIÓ INTRATUMORAL D'ADENOVIRUS REPLICATIUS.

Una de les principals limitacions dels adenovirus oncolítics és la seva incapacitat de distribuir-se eficientment per la massa tumoral. Una possible causa d'aquesta distribució ineficient és l'elevada concentració de teixit connectiu i de matriu extracel·lular en el teixit tumoral. Estudis previs a l'inici d'aquest treball suggereixen que la degradació de la matriu extracel·lular mitjançant l'administració d'enzims proteolítics, com la tripsina o la col·lagenasa, millora la distribució del virus pel tumor. Per altra banda, l'àcid hialurònic s'ha identificat com un dels principals implicats en la resistència a múltiples drogues, probablement pel seu efecte d'increment de la pressió intersticial i de les barreres d'adhesió cel·lular.

En aquesta treball, hem volgut analitzar si la degradació de l'àcid hialurònic, per part de la hialuronidasa testicular humana, és capaç de millorar la distribució dels adenovirus replicatius per la massa tumoral, i si això es tradueix en un augment de l'eficàcia antitumoral.

3.1. EFECTE DE LA DEGRADACIÓ DE L'ÀCID HIALURÒNIC SOBRE L'EFICÀCIA ANTITUMORAL DE L'ADENOVIRUS ICOVIR5.

Abans de decidir-nos a generar un adenovirus oncolíctic que expressés el gen d'una hialuronidasa, varem voler analitzar l'efecte de la coadministració de hialuronidasa comercial soluble en la distribució intratumoral de l'ICOVIR5.

Per tal d'escollir un model adequat per realitzar els diferents experiments, primer de tot es va analitzar el contingut d'àcid hialurònic de les diferents línies tumorals disponibles en el laboratori. Aquest anàlisi es va fer en col·laboració amb la Dra. Anna Bassols, del departament de Bioquímica i Biologia Molecular, de la Facultat de Veterinària (UAB).

3.1.1 Anàlisi de l'expressió d'àcid hialurònic en línies tumorals de diferents orígens.

Segons el tipus tumoral, l'àcid hialurònic (HA) pot ser sintetitzat per les cèl·lules tumorals, les cèl·lules de l'estroma o per ambdós tipus cel·lulars, tot i que en general, totes les cèl·lules tumorals sintetitzen HA. Per tal d'analitzar la quantitat d'HA alliberat al sobrenedant per les cèl·lules tumorals en cultiu, els sobrenedants de diferents línies cel·lulars es van analitzar mitjançant un assaig similar a una ELISA, utilitzant una proteïna d'unió a l'àcid hialurònic marcada amb biotina (HABP-B). La quantitat d'HA present a cada mostra es va determinar en relació a una recta patró. Com es mostra en la figura 18A, la màxima expressió d'HA es va detectar en la línia tumoral de melanoma SKMel28 i en la línia tumoral de pròstata PC3.

Per confirmar aquests resultats, varem analitzar la presència d'HA per immunohistoquímica en tumors xenògrafs de diferents orígens que conservàvem parafinats en el nostre laboratori. L'HA es va detectar amb la HAP-B (precipitat marró), i els nuclis de les cèl·lules, per tinció amb hematoxilina (Fig. 18B). Els tumors de la línia de melanoma SKMel28 van demostrar expressar grans quantitats d'HA. En canvi, les cèl·lules tumorals pancreàtiques, NP9 i les metàstasis hepàtiques de la línia NP18, expressaven quantitats menors d'HA, confirmant els resultats obtinguts per ELISA.

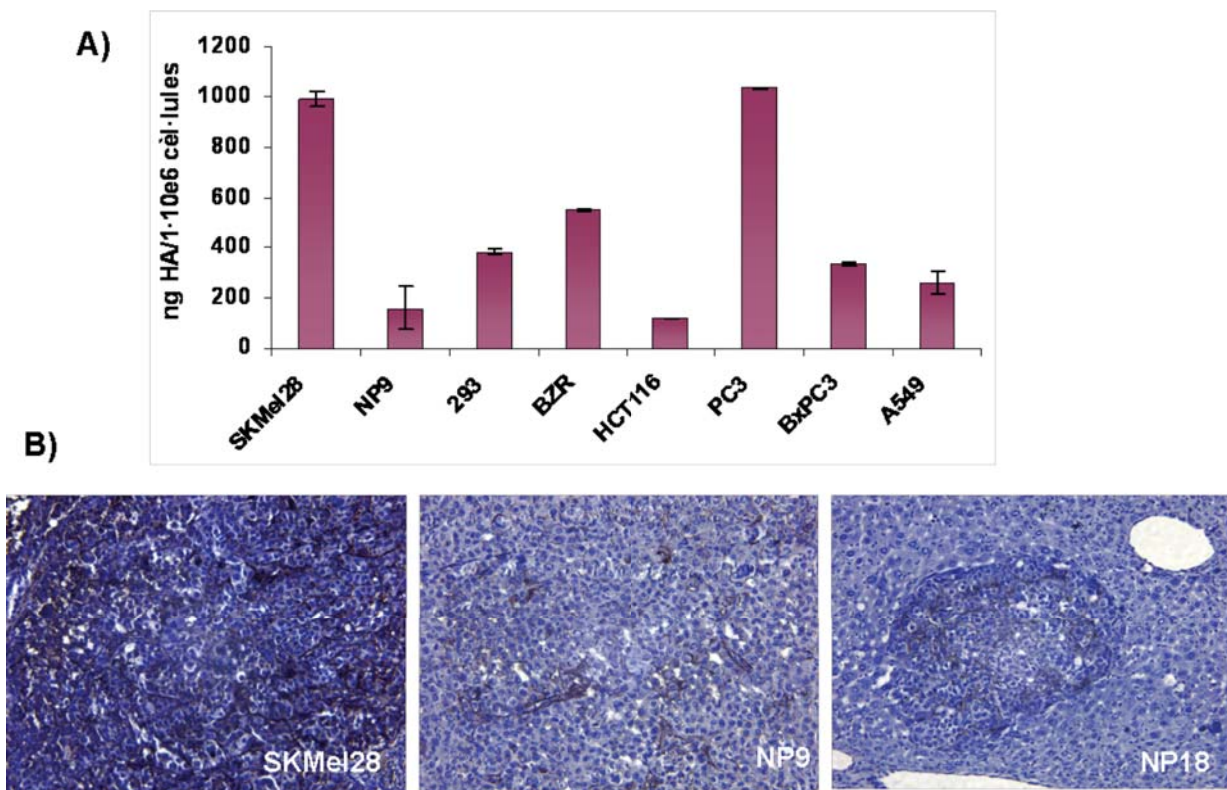


Figura 18. Anàlisi de l'expressió d'HA per cèl·lules tumorals. (A) Anàlisi de l'expressió d'HA per les cèl·lules tumorals en cultiu. La quantitat d'HA alliberada al sobrenedant de cultius de cèl·lules tumorals de diferents orígens es va analitzar mitjançant un assaig similar a l'ELISA. La quantitat d'HA present a cada mostra, expressada com ng d'HA per 1×10^6 cèl·lules, es va determinar en relació a una recta patró realitzada a partir de concentracions conegudes d'HA comercial. (B) Anàlisi immunohistoquímica de la presència d'HA en tumors xenògrafs d'origen humà conservats en parafina. La presència d'HA en tumors xenògrafs de les línies tumorals SKMel28 i NP9 i en una metàstasi hepàtica de la línia pancreàtica NP18, es va analitzar per immunohistoquímica amb una proteïna d'unió a l'HA marcada amb biotina. L'HA correspon al marcatge marró. Els nuclis de les cèl·lules es van tenyir amb hematoxilina (color blau-lila).

3.1.2. Efecte de la coadministració de hialuronidasa soluble en l'eficàcia antitumoral de l'adenovirus ICOVIR5.

Per tal d'avaluar l'efecte de la hialuronidasa sobre l'eficàcia terapèutica d'un adenovirus oncolític, ratolins immunodeprimits amb tumors subcutanis de melanoma humà (SKMel28), es van injectar amb PBS, amb 100 U de hialuronidasa testicular bovina (PH20), amb 1×10^9 vp d'ICOVIR5, o es van coinjectar amb 100 U de PH20 i 1×10^9 vp d'ICOVIR5. L'administració es va realitzar per injecció d'una sola dosi en un sol punt del tumor. Els tumors dels grups tractats amb PBS o amb la hialuronidasa PH20 sola, van incrementar el seu volum 4,6 i 4,9 vegades, respectivament, en un període de 32 dies. En aquest mateix temps, l'increment de volum dels tumors tractats amb ICOVIR5 va ser de 3,3 vegades. La coadministració de la hialuronidasa amb l'ICOVIR5 va controlar el creixement tumoral més eficientment que el PBS ($P \leq 0,01$), la hialuronidasa PH20 ($p \leq 0,01$) i l'ICOVIR5 sol ($p \leq 0,05$, dies 11 i 14 post-administració), sent l'increment de volum tumoral al final de l'experiment de 2,1 vegades (Fig. 19A).

A continuació, es va analitzar si l'administració de hialuronidasa resultava en la degradació de l'HA del tumor. La presència d'HA es va detectar per immunohistoquímica a partir de tumors dels diferents grups experimentals extrets a dia 14 post-administració, moment en que les diferències entre ICOVIR5 \pm hialuronidasa eren significatives. En la figura 19B es mostra que els tumors tractats amb PBS presentaven concentracions elevades d'HA, envoltant les cèl·lules tumorals. Les zones dels tumors, tractats amb virus, on hi havia replicació viral es van detectar amb l'ajuda del patòleg del nostre laboratori, el Dr. Felip Vilardell, i es caracteritzaven per la presència de nuclis inflats i amb tinció més intensa. En els tumors tractats amb ICOVIR5, les zones de replicació viral estaven envoltades d'HA. En canvi, els tumors coinjectats amb ICOVIR5 i hialuronidasa, presentaven focus de replicació viral on no es va detectar marcatge d'HA, indicant que la hialuronidasa soluble estava degradant l'HA present en el tumor (Fig. 19Ba).

Per tal d'analitzar si la degradació de l'HA afavoria la distribució del virus per la massa tumoral, els tumors extrets i congelats a dia 14 post-administració es van analitzar per immunohistoquímica amb un anticòs anti-adenoviral. Els tumors tractats amb ICOVIR5 van mostrar àrees extenses de replicació viral, però els foci de replicació quedaven restringits a una zona concreta del tumor. En canvi, en els tumors tractats amb ICOVIR5 més hialuronidasa el virus es trobava distribuït més homogèniament per la massa tumoral (Fig. 19Bb).

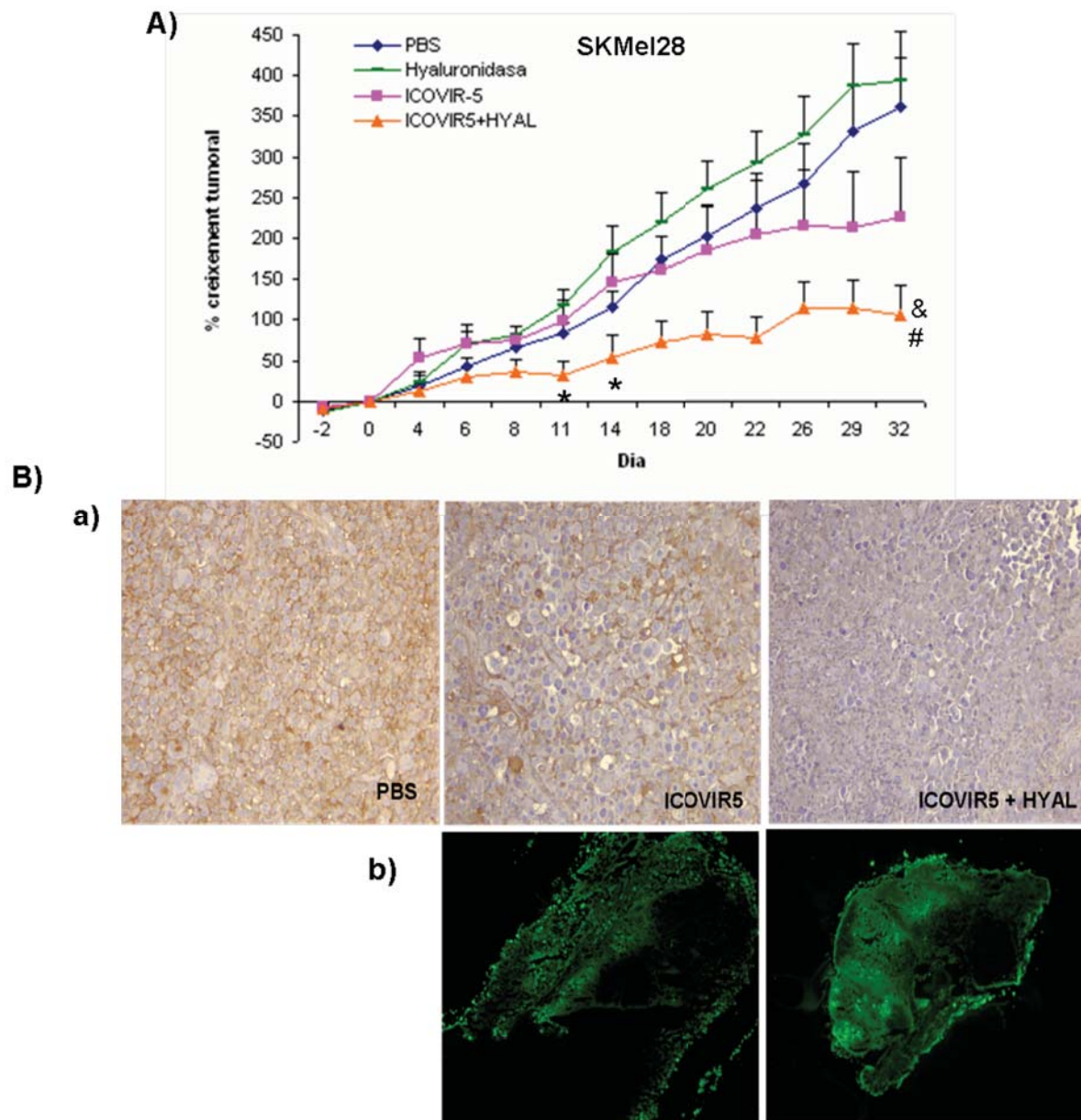


Figura 19. Efecte de la coadministració de hialuronidasa sobre l'eficàcia antitumoral de l'adenovirus ICOVIR5. (A) Cèl·lules de la línia SKMel28 es van implantar en ratolins immunodeficients nu/nu. Quan els tumors van assolir una mitja de 170 mm³, es van injectar amb PBS, hialuronidasa (100 U) o amb una única dosi de 1x10⁹ vp d'ICOVIR5, amb i sense hialuronidasa (100 U) (n=10). La gràfica mostra el creixement dels tumors de cada grup respecte el dia 0. Els resultats es presenten com la mitjana ± S.E. # P ≤ 0,01, diferent significativament (del dia 11 al dia 32 post-administració) al grup injectat amb PBS. & p ≤ 0,01, diferent significativament (del dia 8 al dia 32 post-administració) al grup injectat amb hialuronidasa. *P ≤ 0,05, diferent significativament al grup injectat amb ICOVIR5. (B) Anàlisi immunohistoquímica de l'HA en els tumors de SKMel28. La presència d'HA es va analitzar per immunohistoquímica amb una proteïna d'unió a l'àcid hialurònic, en els tumors extrets 14 dies després de l'administració. Els nuclis de les cèl·lules es van contratenyir amb hematoxilina. Les fotografies presenten una ampliació 20x. (C) Detecció immunohistoquímica de l'ICOVIR5 en els tumors de SKMel28. La presència d'adenovirus en tumors extrets 14 dies després de l'administració es va detectar per immunohistoquímica amb un anticòs anti-adenoviral. Les fotografies presenten una ampliació 4x.

4. EXPRESSIÓ DE LA HIALURONIDASA PH20 COM ESTRATÈGIA PER MILLORAR LA DISTRIBUCIÓ D'ADENOVIRUS REPLICATIUS EN LA MASSA TUMORAL.

Els resultats obtinguts en l'apartat anterior, pel qual la coadministració de hialuronidasa soluble i l'adenovirus ICOVIR5 presenta millors resultats terapèutics que l'administració del virus sol, ens va encoratjar a generar un adenovirus replicatiu que expressés una hialuronidasa.

La hialuronidasa PH20 és una proteïna de membrana present a la membrana plasmàtica i acrosomal dels espermatozoides. A diferència de la resta de hialuronidases de mamífers, la hialuronidasa PH20 presenta activitat enzimàtica a pH neutre. Per tal d'augmentar la dispersió dels adenovirus per la massa tumoral ens interessava que la hialuronidasa, en comptes de quedar-se ancorada a la membrana cel·lular, es secretés al medi extracel·lular. En aquest treball, es va eliminar la seqüència aminoacídica responsable de l'ancoratge de la proteïna PH20 a la membrana cel·lular. En aquest apartat, es presenta la generació i caracterització d'un adenovirus replicatiu que expressa el cDNA de la hialuronidasa humana PH20 sota el control del MLP.

4.1. GENERACIÓ D'UN ADENOVIRUS REPLICATIU ARMAT AMB LA HIALURONIDASA HUMANA PH20.

4.1.1. Generació i caracterització de l'adenovirus AdwtRGD-PH20.

Per tal de generar un adenovirus replicatiu que expressés la hialuronidasa PH20, varem clonar el cDNA de hialuronidasa PH20 en el genoma de l'AdwtRGD. La seqüència codificant per la hialuronidasa PH20 té 1527 pb. La seqüència de nucleòtids de la regió 1468 a la 1527 codifica per la cua hidrofòbica de la proteïna, responsable del seu ancoratge a la membrana cel·lular (Fig. 20). En aquest treball, el cDNA de la hialuronidasa PH20 inserit en el genoma de l'AdwtRGD té una deleció de la regió que codifica per la cua hidrofòbica de la proteïna.

A) 470-DGVCIDAFLKPPMETEEPQIFYNASPSTLSATMFIVSILFLIISVSL-509
 ↓
 CUA HIDROFÒBICA
 Punt de tall

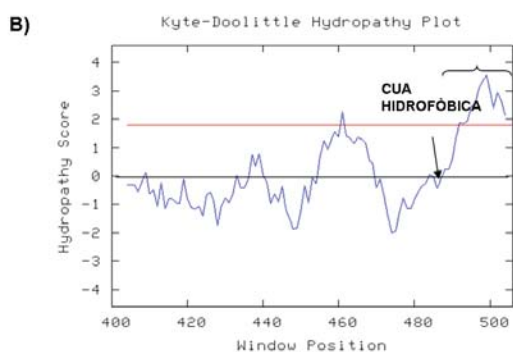


Figura 20. Seqüència aminoacídica de la proteïna PH20 i representació gràfica hidropàtica segons l'algoritme de kyte-doolittle. (A) Representació dels últims 39 aminoàcids, d'un total de 509, de la seqüència aminoacídica de la hialuronidasa PH20. Subratllada es mostra la seqüència hidrofòbica responsable de l'ancoratge de la proteïna a la membrana, que en aquest treball ha estat delecionada. **(B)** Representació gràfica hidropàtica dels últims 100 aminoàcids de la proteïna PH20 segons l'algoritme Kyte-doolittle.

Després del cDNA de la hialuronidasa PH20 (nucleòtid 1468) es va afegir el codó de parada de la traducció, TAA, i una seqüència de poliadenilació. Davant el cDNA de la hialuronidasa PH20 es van inserir la seqüència acceptora de tall i lligació IIIa i la seqüència kozac, i el casset d'expressió es va inserir darrera del gen de la fibra adenoviral, sota el control del MLP (Fig. 21A). L'adenovirus AdwtRGD-PH20 es va generar per transfecció del genoma en la línia cel·lular 293, i es va amplificar a través de passatges successius en aquesta mateixa línia. El contingut proteic dels virions d'AdwtRGD-PH20 purificats va ser molt similar al dels virions d'AdwtRGD (Fig. 21B).

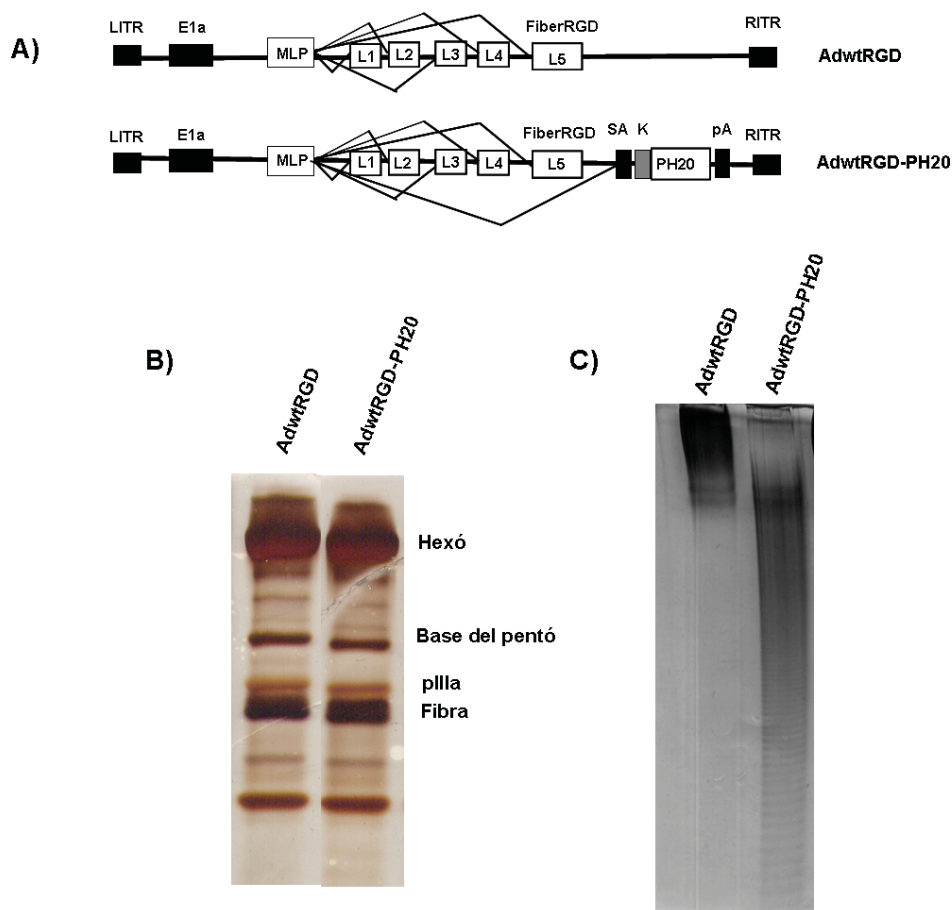


Figura 21. Caracterització de l'AdwtRGD-PH20. (A) Representació esquemàtica dels adenovirus utilitzats. En l'AdwtRGD-PH20, s'ha insertat darrera el gen de la fibra adenoviral un casset d'expressió que consisteix en l'acceptor de tall i lligació de l'adenovirus IIIa (SA), la seqüència kozac (k), el gen de la hialuronidasa PH20, i una seqüència de poliadenilació (pA). Aquest casset té una llargada de 1508 pb. (B) Anàlisi del contingut proteic dels adenovirus purificats. 5×10^{10} partícules virals de l'AdwtRGD i AdwtRGD-PH20 es van resoldre per electroforesi en un gel d'acrilamida al 10%, i posteriorment es van tenyir amb nitrat de plata. (C) Anàlisi de l'activitat hialuronidasa de sobrenedants de cèl·lules infectades amb AdwtRGD-PH20. Les A549 es van infectar amb dosis elevades d'AdwtRGD i d'AdwtRGD-PH20. Els sobrenedants es van recollir a les 48 h post-infecció i es van incubar amb una solució d'HA. Els oligosacàrids formats per digestió de l'HA amb la hialuronidasa PH20 present al sobrenadant de les cèl·lules infectades es van analitzar per electroforesi en gel de poliacrilamida, i tinció combinada de blau d'alcià i nitrat de plata.

Per tal de demostrar que l'adenovirus AdwtRGD-PH20 expressava una proteïna amb activitat hialuronidasa, i que aquesta s'alliberava al medi extracel·lular, les cèl·lules A549 es van infectar amb l'AdwtRGD i l'AdwtRGD-PH20. Després de 48 h, es van recollir els sobrenedant i es van concentrar. Una alíquota dels sobrenedant concentrats es va incubar amb una solució d'àcid hialurònic, i els oligosacàrids formats per la digestió de l'HA es van analitzar per electroforesi en gel de poliacrilamida. La figura 21C mostra com l'HA incubat amb el sobrenedant de l'AdwtRGD conté l'HA sense digerir. En canvi, la mostra d'HA incubada amb el sobrenadant de l'AdwtRGD-PH20 va ser digerida donant lloc a oligosacàrids de diferents grandàries. Aquests resultats indicaven que el sobrenedant de les cèl·lules infectades amb l'AdwtRGD-PH20 contenien una proteïna amb activitat hialuronidasa.

4.1.2. Efecte citotòxic de l'adenovirus AdwtRGD-PH20 respecte l'AdwtRGD.

Per tal d'analitzar l'efecte de l'expressió de la hialuronidasa PH20 en la capacitat citotòxica de l'adenovirus AdwtRGD-PH20, es va realitzar un assaig citotoxicitat. Un panell de línies cel·lulars, incloent cèl·lules de carcinoma de pulmó, càncer de pàncrees i melanoma, es va infectar amb dilucions seriades de l'AdwtRGD i l'AdwtRGD-PH20. Als temps indicats, i depenent de susceptibilitat de cada línia al tractament viral, es va determinar la supervivència cel·lular (Fig. 22A), i es va calcular la quantitat de virus necessària per obtenir un 50 % de mort cel·lular (IC_{50}) (Fig. 22B). En les cèl·lules SKMel28 i en les cèl·lules NP18 no es van veure diferències entre les IC_{50} dels dos virus. En canvi, en les cèl·lules A549 es requereix gairebé 12 vegades menys d'AdwtRGD-PH20 que AdwtRGD per tal d'eliminar el 50 % de les cèl·lules tumorals en cultiu, indicant que, depenent del tipus cel·lular, l'expressió de la hialuronidasa PH20 pot aportar avantatges en la citotoxicitat d'un adenovirus replicatiu, *in vitro*.

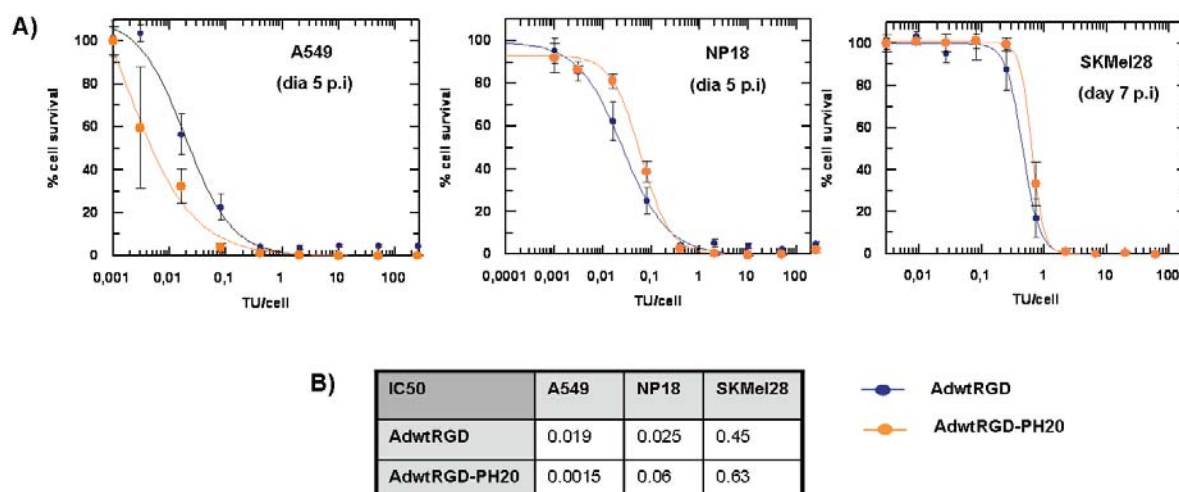


Figura 22. Perfil de citotoxicitat de l'AdwtRGD-PH20 respecte l'AdwtRGD. Les cèl·lules tumorals A549, SKMel28 i NP18 es van sembrar en plaques de 96 pous i es van infectar amb dilucions seriades de l'AdwtRGD o l'AdwtRGD-PH20. Als temps indicats, es va tenyir el contingut proteic de cada pou, i es va mesurar l'absorbància. **(A)** Corbes dosi-resposta. **(B)** Valors de la IC_{50} per cada virus i cada línia cel·lular.

4.1.3. Anàlisi de l'eficàcia antitumoral *in vivo* de l'adenovirus AdwtRGD-PH20 respecte l'adenovirus AdwtRGD

A continuació, varem voler analitzar si l'expressió de la hialuronidasa PH20 podia millorar la distribució del virus pel tumor, i en conseqüència, augmentar l'eficàcia antitumoral de l'AdwtRGD-PH20 respecte l'AdwtRGD *in vivo*. Ratolins immunodeficients amb tumors subcutanis de la línia tumoral humana SKMel28 es van injectar amb PBS o amb una dosi única de 1×10^8 unitats de transducció d'AdwtRGD i d'AdwtRGD-PH20, injectada en un sol punt del tumor. L'adenovirus AdwtRGD-PH20 va demostrar una gran activitat oncolítica, i va ser capaç de controlar el creixement tumoral més eficientment que l'adenovirus control, l'AdwtRGD (* $p \leq 0,01$), i que el grup tractat amb PBS (# $p \leq 0,0001$). Al final de l'experiment (dia 27 post-injecció) el 100 % dels tumors injectats amb AdwtRGD-PH20 estaven regressant entre un 10-50%. En els grups injectats amb PBS o AdwtRGD no es va detectar cap regressió tumoral, indicant que l'expressió de la hialuronidasa PH20 estava millorant substancialment l'eficàcia antitumoral d'un adenovirus replicatiu (Fig. 23A).

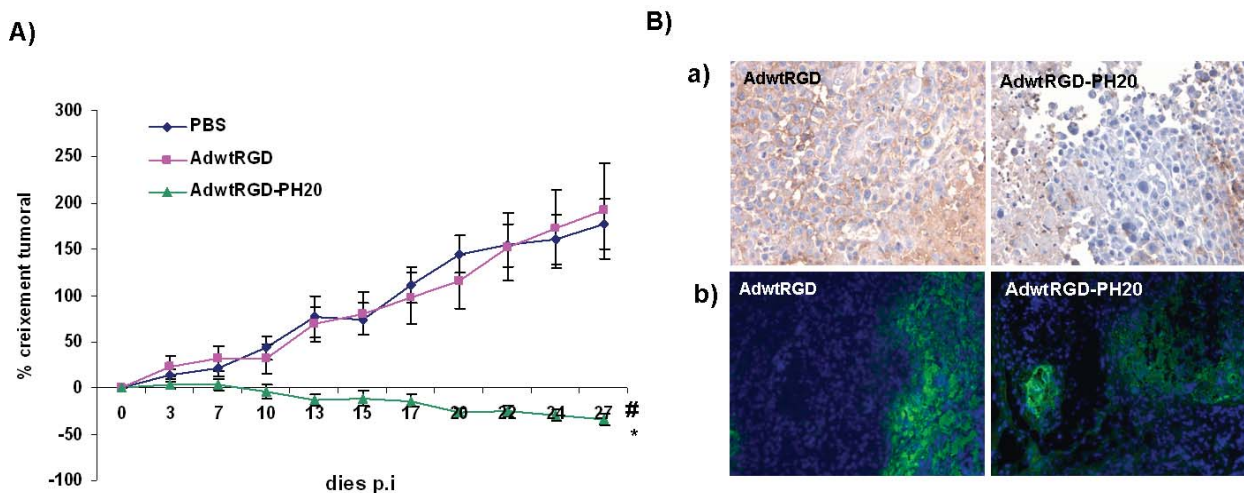


Figura 23. Efecte de l'administració intratumoral de l'AdwtRGD-PH20 en un model de melanoma. (A) Cèl·lules de la línia SKMel28 es van implantar en ratolins immunodeficients nu/nu. Quan els tumors van assolir una mitjana de 150 mm^3 , es van injectar amb PBS o amb una única dosi de 1×10^8 tu d'AdwtRGD i d' AdwtRGD-PH20 (n=10). La gràfica mostra la mitja del creixement dels tumors de cada grup respecte el dia 0, en funció del temps post-administració. Els resultats es presenten com la mitjana \pm S.E. # $P \leq 0,0001$, significativament diferent al grup injectat amb PBS. * $P \leq 0,01$, significativament diferent al grup injectat amb AdwtRGD. **(B)** Detecció immunohistoquímica de l'HA. A dia 14 post-administració, es va sacrificar un animal de cada grup. Els tumors es van extreure i la presència d'HA es va analitzar per immunohistoquímica amb una HAPB biotilada. Els nuclis de les cèl·lules es van contratenyir amb hematoxilina. Amplificació 40x. **(C)** Detecció immunohistoquímica de d'AdwtRGD i d' AdwtRGD-PH20 en els tumors de SKMel28. La presència d'adenovirus en tumors extrets 27 dies després de l'administració es va detectar per immunohistoquímica amb un anticòs anti-adenoviral, i la detecció dels nuclis de les cèl·lules tumorals es va realitzar per tinció amb DAPI. Les fotografies presenten una ampliació 20x.

Per tal comprovar si el control del creixement tumoral del grup tractat amb AdwtRGD-PH20 es devia a l'eliminació de l'HA del tumor, i a la consegüent millora de la distribució del virus pel tumor, es va analitzar la presència d'HA i de focus de replicació viral en els tumors extrets 14 i 27 dies després de l'administració viral, respectivament. L'anàlisi immunohistoquímica de l'HA va revelar una disminució en la presència d'HA en els tumors tractats amb AdwtRGD-PH20 en comparació amb els tumors tractats amb PBS o AdwtRGD (Fig. 23Ba). Per altra banda, l'anàlisi immunohistoquímica amb un anticòs antiadenoviral va revelar focus d'infecció adenoviral en els tumors tractats amb l'AdwtRGD i l'AdwtRGD-PH20, indicant que la manca d'eficàcia antitumoral presentada per l'AdwtRGD no es devia a una falta de replicació viral en el tumor. En general, els focus de replicació virals de l'AdwtRGD-PH20 es trobaven millor distribuïts per la massa tumoral que no pas els focus de replicació de l'AdwtRGD (Fig. 23Bb).

5. EXPRESSIÓ DE LA HIALURONIDASA PH20 COM ESTRATÈGIA PER MILLORAR L'EFICÀCIA TERAPÈUTICA D'ADENOVIRUS DE REPLICACIÓ CONDICIONADA.

Els resultats obtinguts en els apartats anteriors, segons els quals l'expressió de la hialuronidasa PH20 era capaç de digerir l'àcid hialurònic del teixit tumoral i millorar la distribució del virus pel tumor, ens va fer plantejar la inserció del cDNA de la hialuronidasa PH20 en el genoma d'un adenovirus de replicació condicionada.

En aquest treball, el gen que codifica per hialuronidasa PH20 va ser inserit en el genoma de dos adenovirus oncolítics diferents, l'ICOVIR5 i l'ICOVIR15. Ens els següents apartats, s'estudien les diferents estratègies per armar aquests adenovirus amb la hialuronidasa PH20, i s'analitza la capacitat de la hialuronidasa d'augmentar l'eficàcia antitumoral dels adenovirus oncolítics esmentats.

5.1. EFECTE DE LA INSERCIÓ DEL cDNA DE LA HIALURONIDASA PH20, I LA DELECCIÓ DELS ORFS1,2 D'E4 SOBRE L'EFICÀCIA ANTITUMORAL DE L'ADENOVIRUS ICOVIR5.

El cDNA de la proteïna PH20 és relativament petit (1471 pb) en comparació amb el cDNA de la glicoproteïna GALV (2004 pb). Tot i així, la seva inserció en el genoma de l'ICOVIR5 resultava en un genoma massa gran per ser encapsidat correctament dins la càpside viral. En aquest cas, la deleció dels ORF1 i ORF2 de la regió E4 va ser suficient per tal d'acomodar la inserció del cDNA de la hialuronidasa PH20 en el genoma de l'ICOVIR5.

En aquest apartat, es presenta la generació de l'adenovirus ICOVIR8dE4, una nova versió de l'ICOVIR5, on el cDNA de la hialuronidasa humana PH20 ha estat inserit darrera el gen de la fibra adenoviral, i els ORF1,2 d'E4 han estat deleccionats. Per tal d'estudiar l'efecte de la deleció, es va generar l'adenovirus salvatge Adwtorf12, on els ORF1 i ORF2 de la regió E4 havien estat deleccionats.

A continuació, s'analitza la producció viral i l'efecte citopàtic de l'Adwtorf12 i de l'ICOVIR8dE4 respecte els adenovirus controls, Adwt i ICOVIR5 en un ampli panell de línies tumorals. Finalment, s'analitza l'efecte antitumoral del nou adenovirus oncolític armat, l'ICOVIR8dE4, respecte l'ICOVIR5 *in vivo*.

5.1.1. Generació de l'adenovirus Adwtorf12 i estudi de l'efecte de la deleció dels ORF1,2 d'E4 sobre la replicació viral.

L'adenovirus Adwtorf12 es va generar per deleció de les seqüències codificants per les proteïnes ORF1 i ORF2 de la regió E4 de l'adenovirus salvatge, l'Adwt. La regió delecionada va del 34779 pb al 35525 pb de l'Adwt, i té una llargada de 746 pb (Fig. 24A). L'adenovirus Adwtorf12 es va generar per transfecció del genoma en 293, i es va amplificar en aquesta mateixa línia cel·lular. La deleció dels ORF1,2 es va comprovar per seqüenciació del genoma de l'Adwtorf12.

Per tal d'analitzar l'efecte de la deleció dels ORF1,2 d'E4 sobre la replicació viral, es van infectar les cèl·lules A549 i PC3 amb altes m.o.i d'Adwt i Adwtorf12. Als temps indicats, es van recollir els sobrenedant i els extractes cel·lulars totals, i es van quantificar per tinció de l'hexó. Tan en les cèl·lules A549 (Fig. 24Ba), com en les cèl·lules PC3 (Fig. 24Bb), els títols d'Adwtorf12 produït i alliberat al sobrenedant van ser molt similars als títols de l'Adwt, indicant que l'expressió dels ORF1,2 en el contorn d'un adenovirus salvatge, no era imprescindible per una replicació viral eficient.

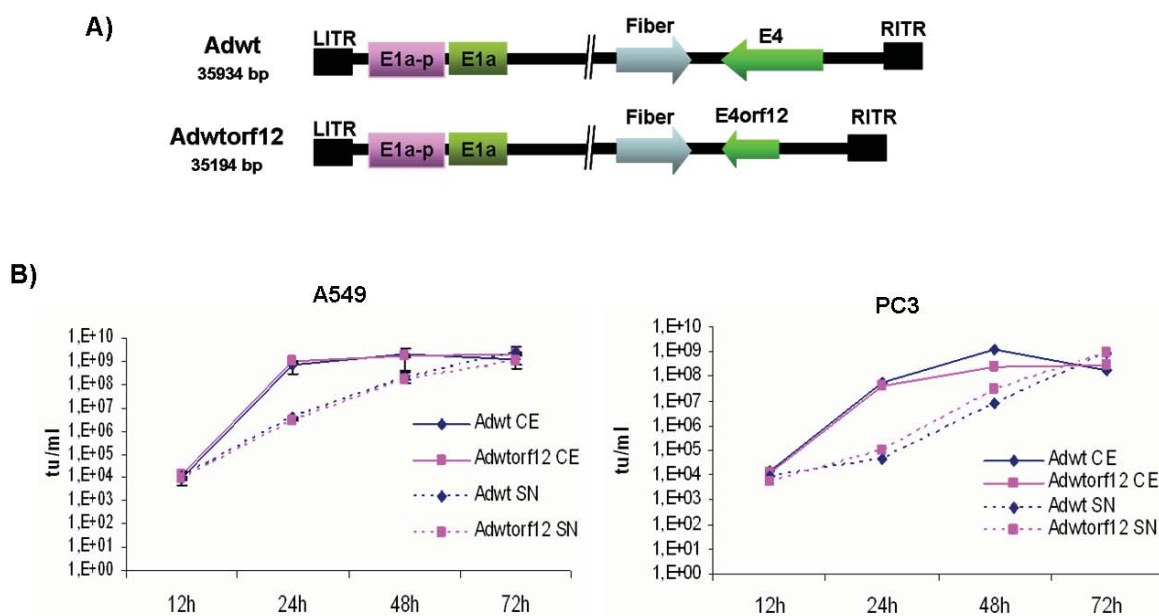


Figura 24. Caracterització de l'adenovirus Adwtorf12. (A) l'Adwtorf12 conté una deleció de la seqüència entre 34779 i 35525 que elimina els gens que codifiquen per les proteïnes ORF1 i ORF2 de la regió E4. La llargada total de la deleció és de 746 pb. (B) Efecte de la deleció dels ORF1,2 d'E4 en la replicació i alliberament viral de l'adenovirus. Es van infectar les cèl·lules tumorals A549 (a) i PC3 (b) amb 20 m.o.i de l'Adwt i l'Adwtorf12. A les 4 h post-infecció, el medi d'infecció es va retirar, les cèl·lules es van rentar amb PBS, i es va afegir 1 ml de medi fresc per pou. Als temps indicats, es van recollir els extractes cel·lulars totals i els sobrenedants i es van titular per tinció de l'hexó.

5.1.2 Capacitat citotòxica de l'adenovirus Adwtorf12 respecte l'adenovirus Adwt.

Per tal d'analitzar l'efecte de la deleció dels ORF1,2 d'E4 en la capacitat citotòxica de l'adenovirus Adwtorf12 respecte l'Adwt, es va realitzar un assaig de citotoxicitat. Un panell de línies tumorals, incloent cèl·lules de carcinoma de pulmó, pàncrees i melanoma, es van infectar amb dilucions seriades de l'Adwt i l'Adwtorf12. Als temps indicats, es va determinar la viabilitat cel·lular dels cultius infectats respecte els cultius no infectats (Fig. 25A), i es va determinar la dosi IC₅₀ (Fig. 25B). En tots els casos, les corbes dosi-resposta i el valor IC₅₀ van ser pràcticament idèntics pels dos virus.

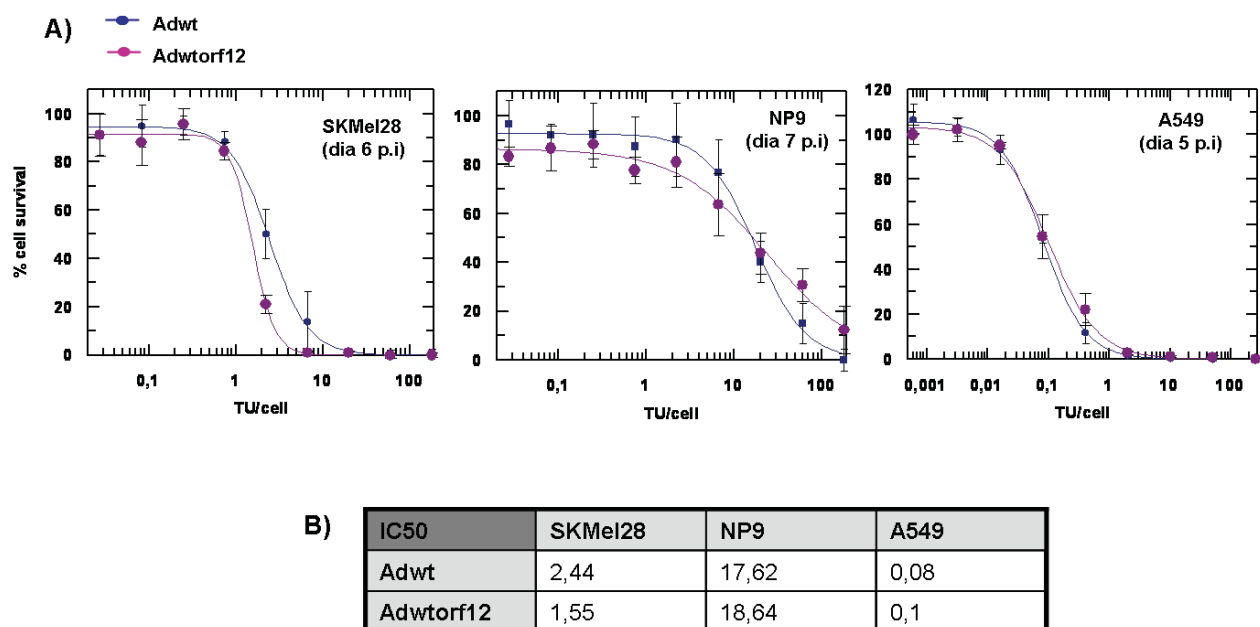


Figura 25. Perfil de citotoxicitat de l'adenovirus Adwtorf12 respecte l'adenovirus Adwt. Les cèl·lules tumorals A549, SKMel28 i NP9 es van sembrar en plaques de 96 pous i es van infectar amb dilucions seriades de l'Adwt o l'Adwtorf12. Als temps indicats, es va tenir el contingut proteic de cada pou, i es va mesurar l'absorbància. (A) Corbes dosi-resposta. (B) Valors de la IC₅₀ per cada virus i cada línia cel·lular.

5.1.3. Generació i caracterització de l'adenovirus ICOVIR8dE4.

En vista dels resultats obtinguts amb l'Adwtorf12, pels quals l'expressió de les proteïnes ORF1 i ORF2 no semblaven necessàries per una replicació viral eficient en la cèl·lula tumoral, varem decidir construir l'adenovirus oncolític ICOVIR8dE4. A l'igual que en l'ICOVIR5, en l'ICOVIR8dE4 l'expressió de la proteïna E1A-Δ24 està controlada per la forma aïllada del promotor d'E2F-1. A part, l'ICOVIR8dE4 presenta la inserció del casset PH20 darrera el gen de la fibra adenoviral, i la deleció dels ORF 1 i 2 de la regió E4 (Fig. 26A). L'ICOVIR8dE4 es va generar per transfecció del genoma en les cèl·lules 293. L'amplificació de l'ICOVIR8dE4 es va fer a partir d'un clon seleccionat per l'assaig de formació de calbes, en les cèl·lules A549.

El contingut proteic dels virus purificats es va analitzar per electroforesi. Al contrari del que havia succeït amb l'adenovirus fusogènic ICOVIR9dE4, no es van veure diferències en la quantitat de fibra present als virions d'ICOVIR5 i d'ICOVIR8dE4.

A continuació, es va analitzar la capacitat de la hialuronidasa PH20, expressada en el sobrenedant de cèl·lules infectades per l'ICOVIR8dE4, de digerir l'àcid hialurònic. Tal i com es mostra en la figura 26 C, la hialuronidasa PH20 expressada pel virus ICOVIR8dE4 va ser capaç de digerir l'HA en fragments d'oligosacàrids de diferents mides.

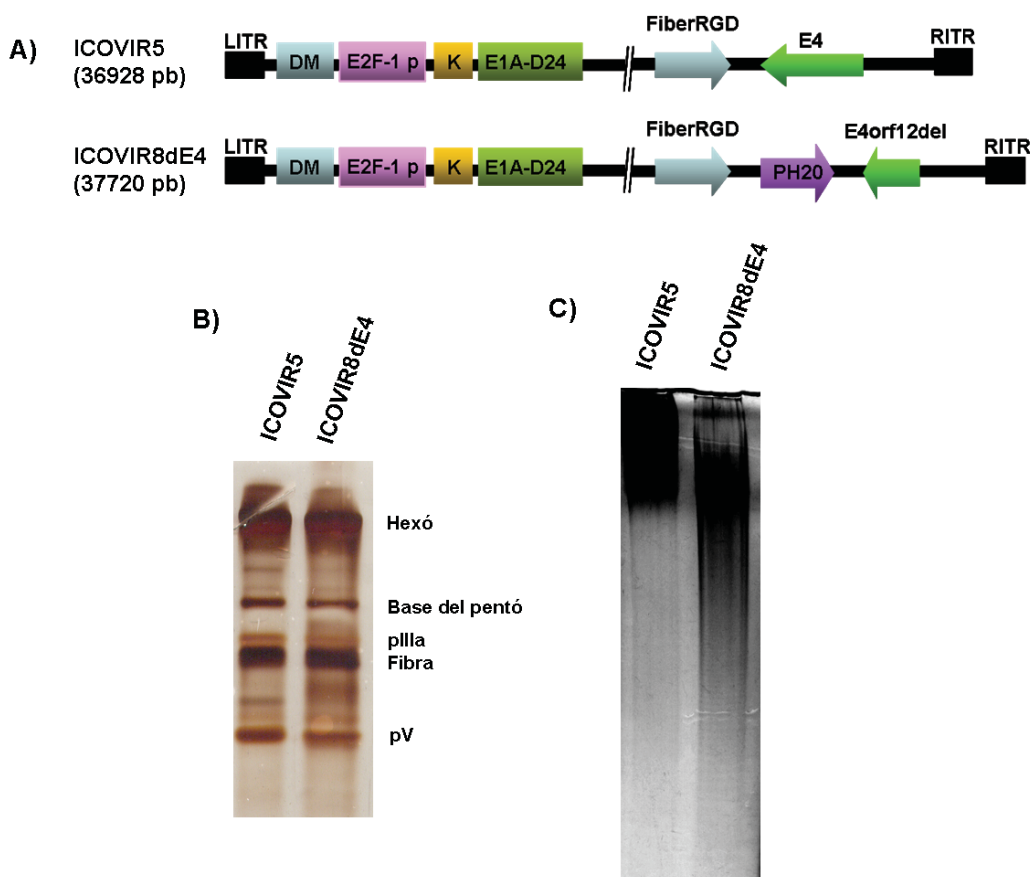


Figura 26. Generació i caracterització de l'adenovirus ICOVIR8dE4. (A) Representació esquemàtica dels adenovirus utilitzats. Tan en l'ICOVIR5, com en l'ICOVIR8dE4, el promotor endogen d'E1A ha estat reemplaçat per la forma aïllada del promotor d'E2F-1, la seqüència kozac inserida immediatament abans de la seqüència codificant per l'E1A- Δ 24, i el motiu RGD inserit al *knob* de la fibra adenoviral. En l'ICOVIR8dE4 s'ha inserit darrera el gen de la fibra adenoviral el casset PH20, que consisteix en la seqüència acceptora de tall i lligació, SA, la seqüència kozac, el cDNA de la PH20, i una seqüència poliA. A més, els ORF1,2 de la regió E4 han estat deletats (B) Anàlisi del contingut proteic dels adenovirus purificats. 5×10^{10} partícules virals de l'ICOVIR5 i l'ICOVIR8dE4 es van resoldre per electroforesi en un gel d'acrilamida al 10%, i posteriorment es van tenyir amb nitrat de plata. (C) Anàlisi de l'activitat hialuronidasa de sobrenedants de cèl·lules infectades amb ICOVIR8dE4. Les A549 es van infectar amb dosis elevades d'ICOVIR5 i d'ICOVIR8dE4. Els sobrenedants es van recollir a les 48 h post-infecció i es van incubar amb una solució d'HA. Els oligosacàrids formats per digestió de l'HA amb la hialuronidasa PH20 present al sobrenadant de les cèl·lules infectades es van analitzar per electroforesi en gel de poliacrilamida i tinció combinada de blau d'alcià i nitrat de plata.

Per tal d'analitzar l'efecte de les diferents modificacions realitzades en l'ICOVIR8dE4 sobre la replicació del virus, es va realitzar un assaig de producció viral en les cèl·lules PC3. A punt final de l'experiment (96h), la quantitat d'ICOVIR8dE4 funcional produïda i alliberada al sobrenedant es va veure disminuïda gairebé quatre vegades respecte l'ICOVIR5. A més, es va observar un alentiment en la producció i en l'alliberament de l'ICOVIR8dE4 respecte l'ICOVIR5. A les 24 h post-infecció, la quantitat d'ICOVIR8dE4 produïda era 11 vegades inferior a la d'ICOVIR5, i a les 48 h post-infecció, el títol d'ICOVIR8dE4 present al sobrenedant era 20 vegades inferior al d'ICOVIR5 (Fig. 27). Aquests resultats suggerien que, les diferents modificacions realitzades en l'ICOVIR8dE4, incloent la deleció dels ORF12 i la inserció del gen de la hialuronidasa, que individualment no afectaven la replicació normal del virus, en combinació, anaven en detriment d'una replicació viral efectiva.

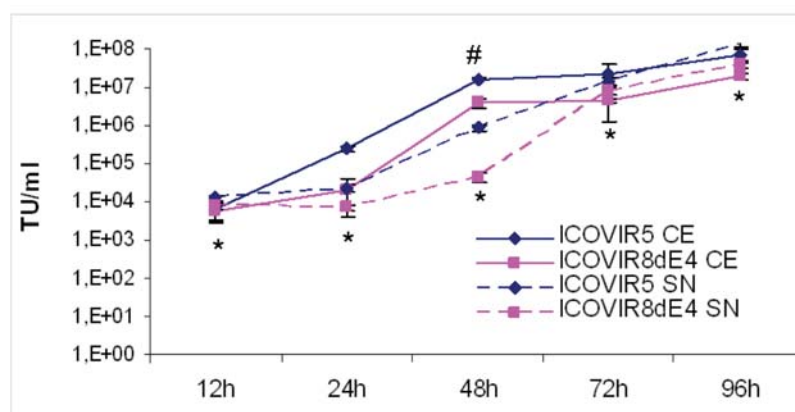


Figura 27. Efecte de les modificacions realitzades en l'adenovirus ICOVIR8dE4 sobre la replicació i l'alliberament viral. Les cèl·lules de carcinoma de pròstata, PC3 es van infectar amb 20 m.o.i d'ICOVIR5 i d'ICOVIR8dE4. Als temps indicats, es van recollir els extractes cel·lulars totals i els sobrenedants, i el títol funcional de virus es va determinar per tinció de l'hexó.

5.1.4. Capacitat citotòxica de l'adenovirus ICOVIR8dE4 respecte l'adenovirus ICOVIR5.

Per tal de confirmar els resultats obtinguts en l'assaig de producció viral, la capacitat citotòxica de l'ICOVIR8dE4 respecte l'ICOVIR5 es va analitzar en línies cel·lulars de melanoma i pàncrees. En l'assaig de citotoxicitat, on les cèl·lules s'infecten a dosis baixes de virus i es deixa que els virus facin diferents rondes de replicació, les deficiències en la producció viral s'haurien d'amplificar a cada ronda de replicació. Això, resultaria en una disminució significativa en la capacitat citotòxica de l'ICOVIR8dE4. Pel contrari, les corbes dosi-resposta de l'ICOVIR8dE4 i de l'ICOVIR5 van ser molt similars en les dues línies cel·lulars (Fig. 28A). Les IC₅₀ de l'ICOVIR8dE4, en els dos models cel·lulars, van ser 1,6 vegades superiors a les de l'ICOVIR5 (Fig. 28B). Aquests resultats podien suggerir que l'efecte de les modificacions incorporades en l'ICOVIR8dE4 podia variar en funció de la línia cel·lular utilitzada.

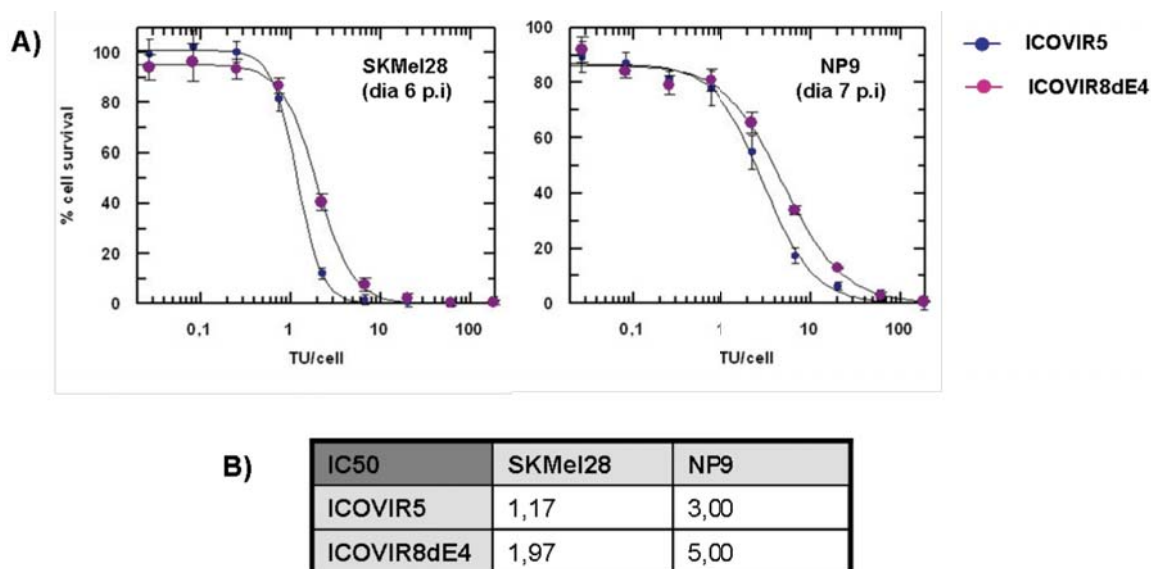


Figura 28. Perfil de citotoxicitat de l'adenovirus ICOVIR8dE4 respecte l'adenovirus ICOVIR5. Les cèl·lules tumorals SKMel28 i NP9 es van sembrar en plaques de 96 pous i es van infectar amb dilucions seriades de l'ICOVIR5 i l'ICOVIR8dE4. Als temps indicats, es va tenyir el contingut proteic de cada pou, i es va mesurar l'absorbància. **(A)** Corbes dosi-resposta. **(B)** Valors de la IC_{50} per cada virus i cada línia cel·lular.

5.1.5. Anàlisi de l'eficàcia antitumoral de l'administració sistèmica de l'adenovirus ICOVIR8dE4 respecte l'adenovirus ICOVIR5.

Tot i els possibles efectes perjudicials de la deleció dels ORF12 d'E4 i la inserció d'un cDNA extern en el genoma adenoviral sobre la replicació viral i la potència oncolítica, podria ser que l'expressió de la hialuronidasa PH20 *in vivo*, millorés l'eficàcia antitumoral de l'ICOVIR5. Per tal d'analitzar aquesta hipòtesi, l'ICOVIR5 i l'ICOVIR8dE4 es van injectar via sistèmica a ratlins immunodeprimits amb tumors de melanoma (SKMel28). En aquest model, la coadministració de hialuronidasa soluble ja havia demostrat millorar l'efecte terapèutic de l'ICOVIR5 injectat directament al tumor. En canvi, els resultats mostren com l'ICOVIR8dE4 no va ser capaç d'inhibir el creixement dels tumors respecte el grup PBS (Fig. 29). Al final de l'experiment, l'administració d'ICOVIR5 van reduir el creixement tumoral un 36 % respecte l'administració de PBS (# $p \leq 0,05$), mentre l'administració d'ICOVIR8dE4 només va reduir el creixement tumoral un 15 %. Les diferències en volum tumoral o en tant per cent de creixement tumoral entre el grup administrat amb l'ICOVIR8dE4 i els grups tractats amb ICOVIR5 o PBS, no van ser significatives en cap punt.

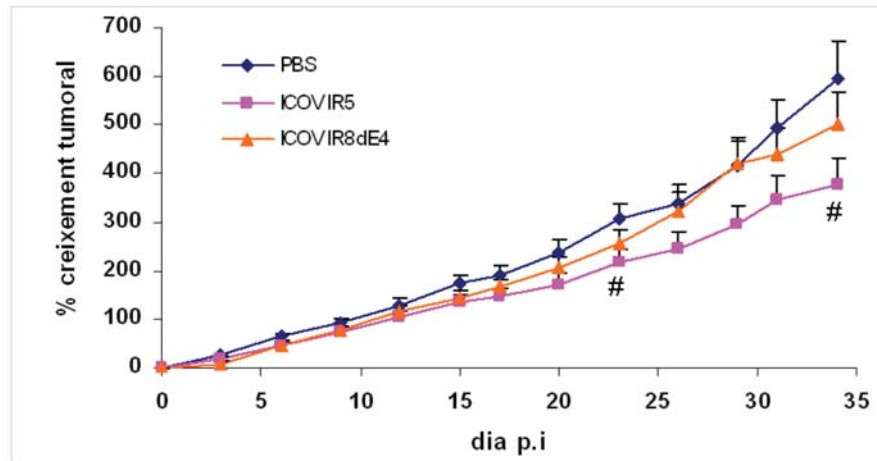


Figura 29. Anàlisi de l'activitat antitumoral de l'adenovirus ICOVIR8dE4 respecte l'adenovirus ICOVIR5 *in vivo*. (A) Ratolins immunodeficients amb tumors subcutanis d'SKMel28, amb una mida d'uns 160 mm³, van ser tractats amb una única injecció intravenosa de 5×10^{10} partícules virals d'ICOVIR5, d'ICOVIR8dE4 o amb PBS. El volum tumoral es va mesurar regularment. La gràfica mostra el tant per cent de creixement tumoral respecte el dia 0. # $p \leq 0,05$ respecte el grup PBS.

5.2. EFECTE DE LA INSERCIÓ DEL cDNA DE LA HIALURONIDASA PH20 SOBRE L'EFICÀCIA ANTITUMORAL DE L'ADENOVIRUS ICOVIR15.

Segons els resultats anteriors, el genoma de l'ICOVIR5 amb els ORF1,2 de la regió E4 deletionats, no semblava un entorn adequat per la inserció del cDNA de la hialuronidasa PH20. La generació en el nostre laboratori de l'ICOVIR15 durant la realització d'aquesta tesi, ens va permetre analitzar l'acció de la hialuronidasa PH20 sobre un nou entorn oncolític.

En aquest apartat, el casset PH20 es va inserir en el genoma de l'ICOVIR15 per tal de generar un nou adenovirus de replicació condicionada que expressés la hialuronidasa humana PH20, l'ICOVIR17. A continuació, s'analitza la producció i la citotoxicitat de l'ICOVIR17 *in vitro*, així com la seva eficàcia antitumoral *in vivo*.

5.2.1. Generació i caracterització de l'adenovirus ICOVIR17.

En l'adenovirus ICOVIR17, igual que en l'adenovirus ICOVIR15, l'expressió d'E1A- Δ 24 està controlada pel promotor endogen d'E1A modificat, mitjançant la inserció de 4 llocs d'unió a E2F i un lloc d'unió a Sp1. A més, l'ICOVIR17 conté el casset d'expressió per la PH20 inserit darrera el gen de la fibra adenoviral, sota el control del MLP de l'adenovirus (Fig. 30A). Degut a que la llargada del genoma de l'ICOVIR15 és pràcticament igual a la de l'adenovirus salvatge, no ha calgut deletionar cap gen adenoviral per tal d'inserir el cDNA de la PH20. L'ICOVIR17 es va generar per transfecció del genoma en les cèl·lules 293. L'amplificació de l'ICOVIR17 es va fer a

partir d'un clon seleccionat per l'assaig de formació de calbes, en les cèl·lules A549. La incorporació del cDNA de la proteïna PH20 es va analitzar per seqüenciació del genoma viral dels diferents clons aïllats.

Per tal de comprovar si la proteïna PH20 expressada per l'ICOVIR17 contenia activitat hialuronidasa es va analitzar la capacitat de sobrenedants de cultius infectats amb l'ICOVIR17 de digerir una solució d'HA. Tal i com es mostra a la Figura 30B, l'HA que es va incubar amb el sobrenedant dels cultius infectats amb ICOVIR17 va ser eficientment degradat a oligosacàrids de diferents mides.

A continuació, es va voler analitzar si la inserció del cDNA de la PH20 interferia en la replicació viral de l'ICOVIR17. La cinètica de producció i alliberament viral de l'ICOVIR17 en les cèl·lules A549 va ser pràcticament idèntica a la de l'ICOVIR15 (Fig. 30C). Tot i així, a les 24 h post-infecció es va detectar una disminució de 5 vegades en la quantitat d'ICOVIR17 en el sobrenedant, respecte l'ICOVIR15. Tot i que les diferències en aquest punt van ser significatives ($\# p \leq 0,02$), no es van detectar diferències en cap altre punt de la cinètica de producció.

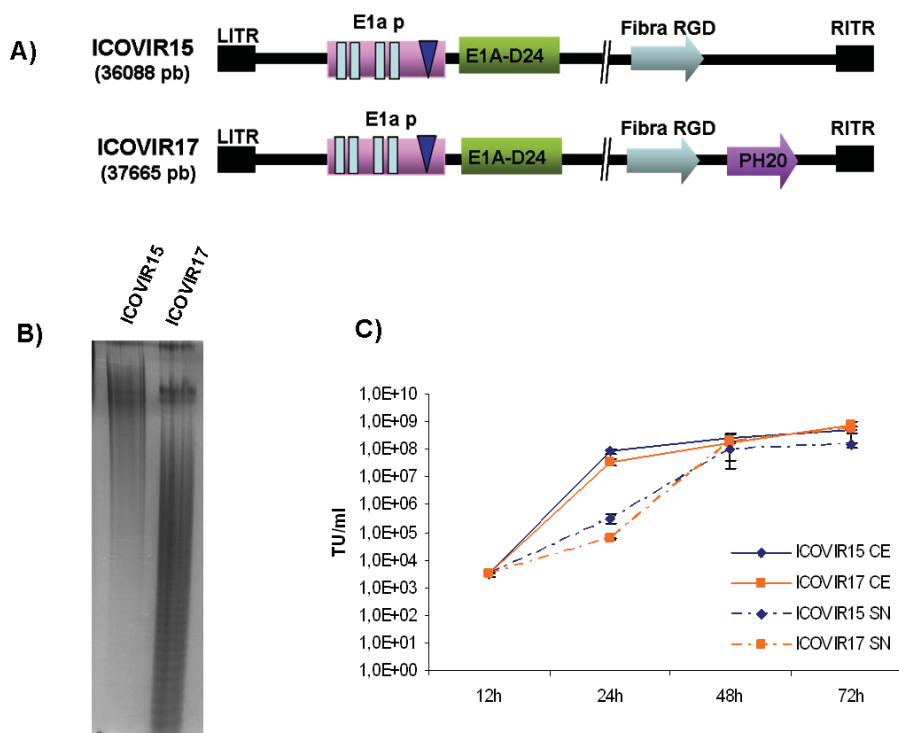


Figura 30. Generació i caracterització de l'adenovirus ICOVIR17. (A) Representació esquemàtica dels adenovirus utilitzats. Tan en l'ICOVIR15, com en l'ICOVIR16, la proteïna E1A- Δ 24 està controlada pel promotor endogen d'E1A modificat mitjançant la inserció de 4 llocs d'unió a E2F (rectangles blau-cel) i un lloc d'unió a Sp1 (triangle blau-mari). En l'ICOVIR17 s'ha inserit el casset PH20 darrera el gen de la fibra adenoviral modificada amb la inserció del motiu RD. (B) Anàlisi de l'activitat hialuronidasa de sobrenedants de cèl·lules infectades amb l'ICOVIR16. (C) Anàlisi de la producció i l'alliberament al sobrenedant de l'ICOVIR17 respecte l'ICOVIR15 en A549. $\# P \leq 0,02$ respecte l'alliberament al sobrenedant d'ICOVIR15.

5.2.2. Capacitat citotòxica de l'adenovirus ICOVIR17 respecte l'ICOVIR15.

Per tal d'analitzar l'efecte de l'expressió de la hialuronidasa PH20 sobre la capacitat oncolítica de l'ICOVIR17 *in vitro*, es va realitzar un assaig citotoxicitat. Un panell de línies tumorals, incloent cèl·lules de carcinoma de pulmó, carcinoma de pròstata i melanoma, es van infectar amb dilucions seriades de l'ICOVIR15 i l'ICOVIR17. Als temps indicats, es va determinar la viabilitat cel·lular dels cultius infectats respecte els cultius no infectats (Fig. 31A), i es va determinar la dosi IC₅₀ (Fig. 31B). En les SKMel28 i en les PC3 les IC₅₀ dels dos virus van ser molt similars. En canvi, en les A549, es requereix gairebé 8 vegades menys d'ICOVIR17 que d'ICOVIR15 per tal d'eliminar el 50 % de les cèl·lules tumorals en cultiu, confirmant els resultats que havíem obtingut amb l'AdwtRGD-PH20.

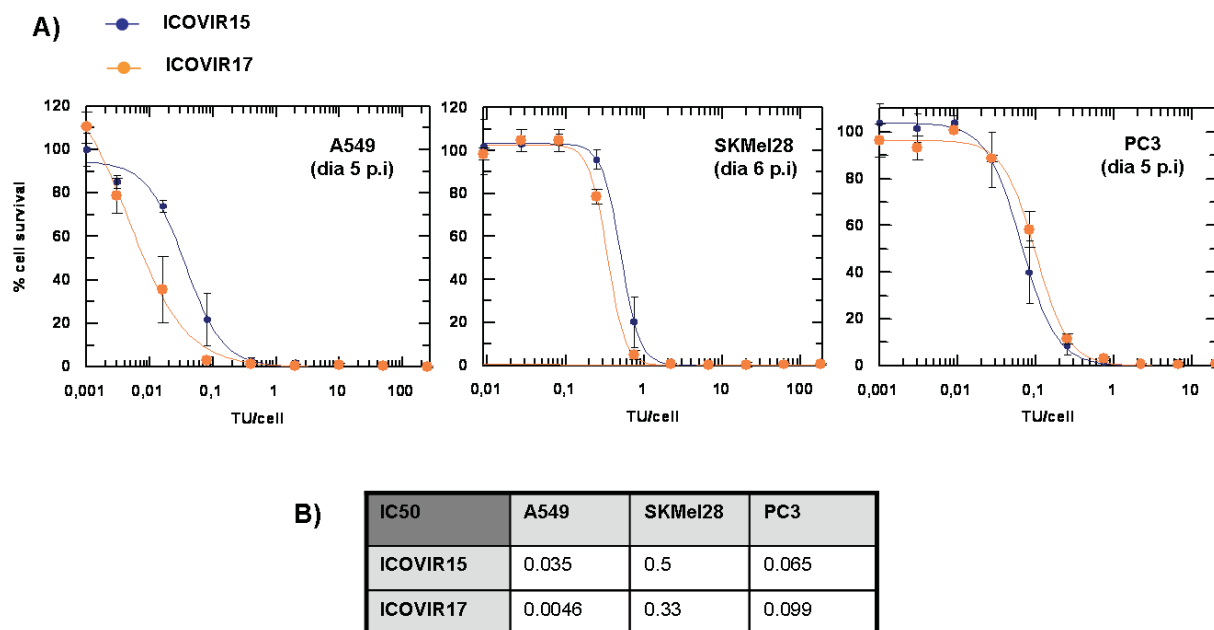


Figura 31. Perfil de citotoxicitat de l'adenovirus ICOVIR17 respecte l'adenovirus ICOVIR15. Les cèl·lules tumorals A549, SKMel28 i PC3 es van infectar amb dilucions seriades de l'ICOVIR15 i l'ICOVIR17. Als temps indicats, es va tenyir el contingut proteic de cada pou, i es va mesurar l'absorbància. (A) Corbes dosi-resposta. (B) Valors de la IC₅₀ per cada virus i cada línia cel·lular.

5.2.3. Anàlisi de l'eficàcia antitumoral de l'administració intratumoral de l'adenovirus ICOVIR17 respecte l'adenovirus ICOVIR15.

Per tal d'analitzar si l'expressió de la hialuronidasa PH20 podia millorar la distribució del virus pel tumor i augmentar, per tant, l'eficàcia antitumoral de l'ICOVIR17 respecte l'ICOVIR15 *in vivo*, varem injectar ratolins immunodeficients amb tumors subcutanis de la línia tumoral humana SKMel28 amb PBS o amb una dosi única de 1×10^8 TU d'ICOVIR15 o d'ICOVIR17. Tal i com es mostra a la Figura 32A, l'ICOVIR17 va ser capaç de controlar el creixement tumoral més

eficientment que l'adenovirus control, l'ICOVIR15. A dia 42 post-infecció, l'ICOVIR15 va induir una reducció del 60 % en el creixement dels tumors d'SKMel28 respecte el grup control (PBS) (# $p \leq 0.02$). En aquest mateix moment, la reducció del creixement dels tumors injectats amb ICOVIR17 respecte el PBS era de gairebé un 95% (* $p \leq 0.002$).

Al final de l'experiment, els tumors van ser extrets i pesats. El pes dels tumors injectats amb l'ICOVIR17 va ser significativament inferior al pes dels tumors injectats amb ICOVIR15 (& $p < 0.05$) o amb PBS (\$ $p < 0.05$). En la figura 32B es mostra una taula resum amb els volums tumorals a l'inici i el final del tractament, els creixements tumorals i el pes dels tumors al final del tractament.

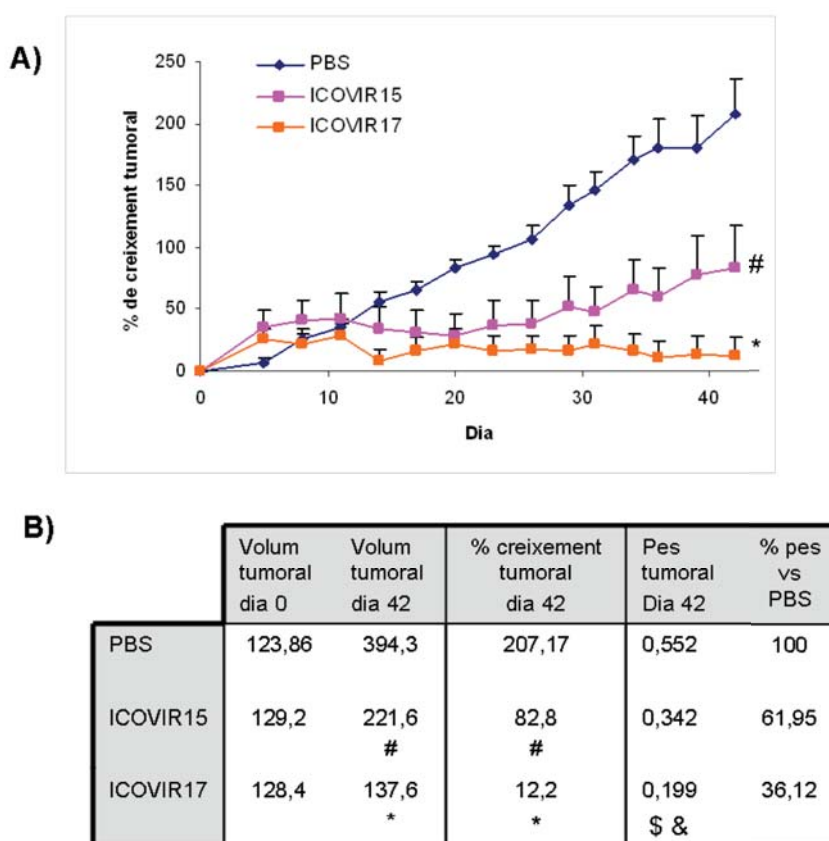


Figura 32. Eficàcia antitumoral de l'ICOVIR17 després de l'administració intratumoral en un model de melanoma. (A) Cèl·lules de la línia SKMel28 es van implantar en ratolins immunodeficients nu/nu. Quan els tumors van assolir una mitjana de 100 mm³, es van injectar amb PBS o amb una única dosi de 1x10⁸ tu d'ICOVIR15 i d'ICOVIR17 (n=10). La gràfica mostra la mitjana del creixement dels tumors de cada grup respecte el dia 0. Els resultats es presenten com la mitjana ± S.E. # $P \leq 0,02$, significativament diferent al grup injectat amb PBS (del dia 20 al dia 42). * $P \leq 0,002$, significativament diferent al grup injectat amb PBS (del dia 14 al dia 42). (B) Taula resum del volum tumoral, el creixement tumoral i el pes dels tumors 42 dies després de l'administració. # $P \leq 0,04$, significativament diferent al grup injectat amb PBS. * $P \leq 0,008$, significativament diferent al grup injectat amb PBS. & $P \leq 0,05$, significativament diferent al grup injectat amb ICOVIR15. \$ $P < 0,05$, significativament diferent al grup injectat amb PBS.

5.2.4. Anàlisi de l'eficàcia antitumoral de l'administració sistèmica d'ICOVIR17 respecte l'ICOVIR15.

A continuació, es va analitzar l'habilitat de l'ICOVIR17 d'inhibir el creixement tumoral de tumors xenògrafs de melanoma humà per administració sistèmica (Fig. 33A). En el model de melanoma, l'ICOVIR17 va demostrar una gran eficàcia antitumoral, molt superior a l'eficàcia demostrada per l'ICOVIR15 (* $p \leq 0,03$). Al final de l'experiment, dia 48 post-injecció, el 60 % dels tumors tractats amb ICOVIR17 havien disminuït entre un 20–40 % respecte el moment de l'administració. L'altre 40 % dels tumors tractats amb ICOVIR17 pràcticament no havien crescut des del moment de l'administració, presentant un 93 % d'inhibició del creixement tumoral respecte el grup tractat amb PBS. El grup tractat amb ICOVIR15 va induir una reducció del 30 % en el creixement tumoral respecte el grup PBS.

Aquests resultats es van confirmar en un model de càncer de pàncrees. Ratolins immunodeficients amb tumors de la línia NP18 es van administrar amb una dosi única de 5×10^{10} vp d'ICOVIR15 i ICOVIR17. En aquest model, l'ICOVIR17 va tornar a demostrar una gran capacitat terapèutica, significativament superior a la d'ICOVIR15 des de dia 3 post-administració (* $p \leq 0,02$). Al final de l'experiment (dia 30 post-administració), el 33 % dels tumors tractats amb ICOVIR17 estaven disminuint respecte el dia de l'administració viral. Com a mitjana, l'administració d'ICOVIR17 va induir una reducció del 92 % en el creixement tumoral respecte el grup tractat amb PBS (# $p \leq 0,03$). L'ICOVIR15 va demostrar millor eficàcia terapèutica que en el model de melanoma, induint una reducció del 77 % en el creixement dels tumors respecte el grup tractat amb PBS (& $p \leq 0,03$).

A continuació es va voler analitzar la presència de virus en els tumors d'SKMe128 dels ratolins tractats per administració sistèmica d'ICOVIR15 i ICOVIR17 per immunohistoquímica en talls tumorals congelats. Tots els tumors analitzats presentaven focus de replicació viral. Els tumors tractats amb l'adenovirus ICOVIR17 presentaven zones necròtiques molt extenses, i la majoria de les zones viables presentaven focus de replicació viral grans i ben distribuïts (Fig. 33C). En canvi, els tumors tractats amb ICOVIR15, tot i presentar zones de replicació viral, també hi havia zones viables de gran extensió on no es detectava virus. Aquests resultats indicaven que l'expressió de la hialuronidasa PH20 millorava la distribució del virus pel tumor, i n'augmentava l'eficàcia terapèutica.

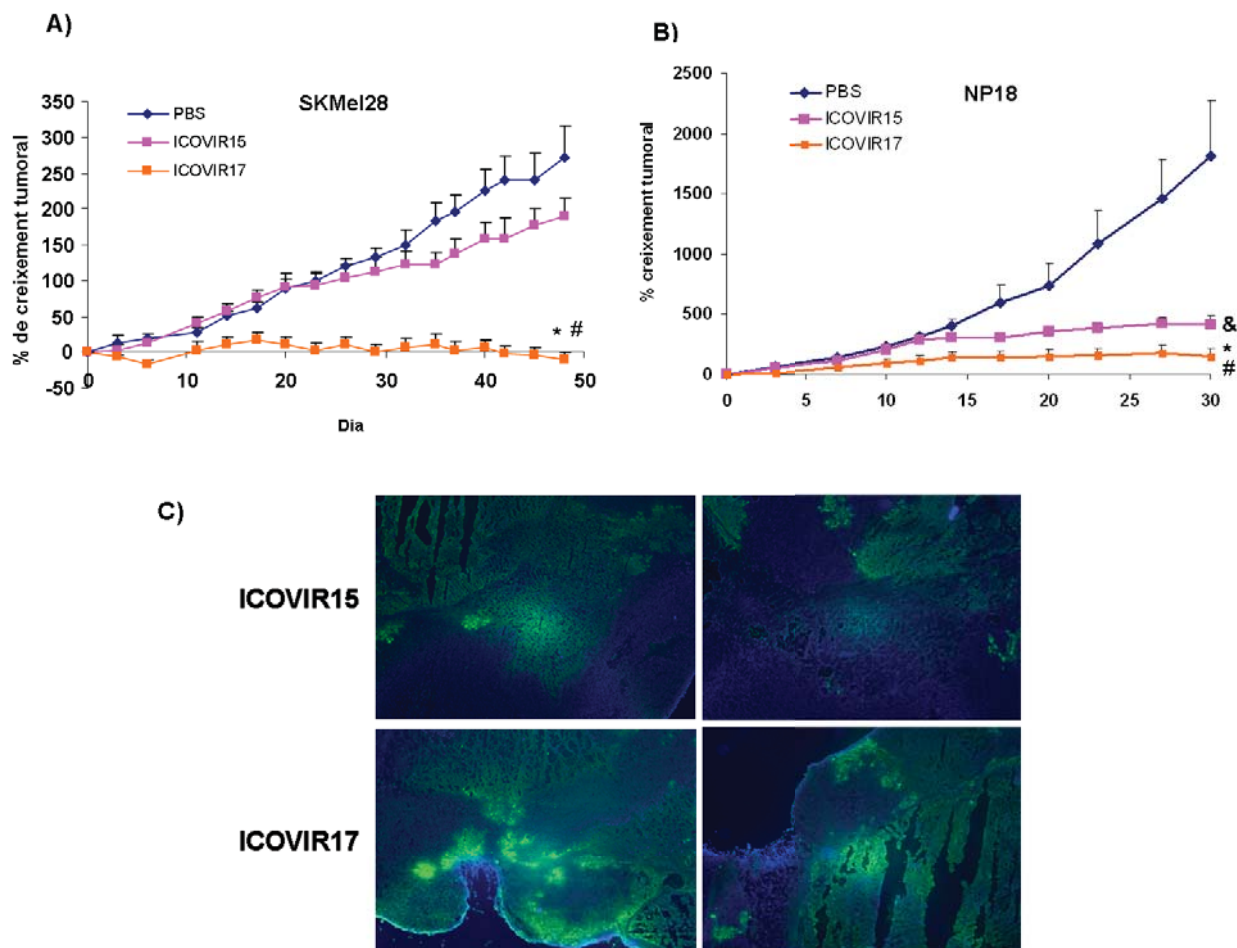


Figura 33. Eficàcia antitumoral de l'adenovirus ICOVIR17 després de l'administració sistèmica en dos models tumorals *in vivo*. (A) Cèl·lules de la línia SKMel28 es van implantar en ratolins immunodeficients nu/nu. Quan els tumors van assolir una mitjana de 100 mm³, es van injectar amb PBS o amb una única dosi de 5x10¹⁰ vp d'ICOVIR15 i d'ICOVIR17. Les gràfiques mostren la mitjana del creixement dels tumors de cada grup respecte el dia de l'administració del tractament (dia 0). Els resultats es presenten com la mitjana ± S.E. # P ≤ 0,02, significativament diferent al grup injectat amb PBS, des de dia 14 p.i. *P ≤ 0,03, significativament diferent al grup injectat amb ICOVIR15, des de dia 6 p.i. (B) Ratolins immunodeficients amb tumors NP18 (60 mm³ de mitjana) es van injectar per via endovenosa amb 5x10¹⁰ vp d'ICOVIR15 i d'ICOVIR17. La gràfica mostra el tant per cent de creixement respecte el dia 0. # P ≤ 0,03, significativament diferent al grup injectat amb PBS des de dia 3 p.i. *P ≤ 0,02, significativament diferent al grup injectat amb ICOVIR15, des de dia 3 p.i. & P ≤ 0,03, significativament diferent al grup injectat amb PBS des de dia 23 p.i. (C) Detecció immunohistoquímica de l'ICOVIR15 i l'ICOVIR17 en els tumors de SKMel28 extrets a dia 48 post-administració. La presència d'adenovirus en els tumors es va detectar per immunohistoquímica amb un anticòs anti-adenoviral, i la detecció dels nuclis de les cèl·lules tumorals es va realitzar per tinció amb DAPI. Les fotografies presenten una ampliació 4x.

5.2.5. Efecte de l'expressió de la hialuronidasa PH20 en l'angiogènesi tumoral.

Diferents estudis suggereixen que els productes de degradació de l'àcid hialurònic estimulen l'angiogènesi. Per tal d'analitzar si l'expressió de la hialuronidasa PH20 per part de l'adenovirus ICOVIR17 podia incrementar la vasculatura tumoral, varem analitzar l'endoteli vascular dels tumors de SKMel28 tractats per administració sistèmica de PBS, ICOVIR15 o ICOVIR17 (apartat 4.2.4). Els tumors extrets a dia 48 p.i es van analitzar per immunohistoquímica amb un anticòs contra el marcador endotelial CD31 (Fig. 34A). Es van analitzar de 7 a 9 tumors per grup, i es van fotografiar 5 camps per tumor. La intensitat de la senyal respecte el grup tractat amb PBS (Fig. 34B), i el número de vasos per camp (Fig. 34C) es van quantificar. Els tumors tractats amb ICOVIR17 van presentar un 84 % d'intensitat de marcatge respecte el grup PBS, mentre els tumors tractats amb ICOVIR15 van presentar una intensitat de marcatge vascular superior a la del PBS (111%). Les diferències entre grups no van ser significatives. El recompte de vasos per camp va revelar un menor número de vasos en els tumors administrats amb ICOVIR17, indicant que en aquestes condicions, l'expressió de la hialuronidasa PH20 no augmentava l'endoteli vascular dels tumors tractats.

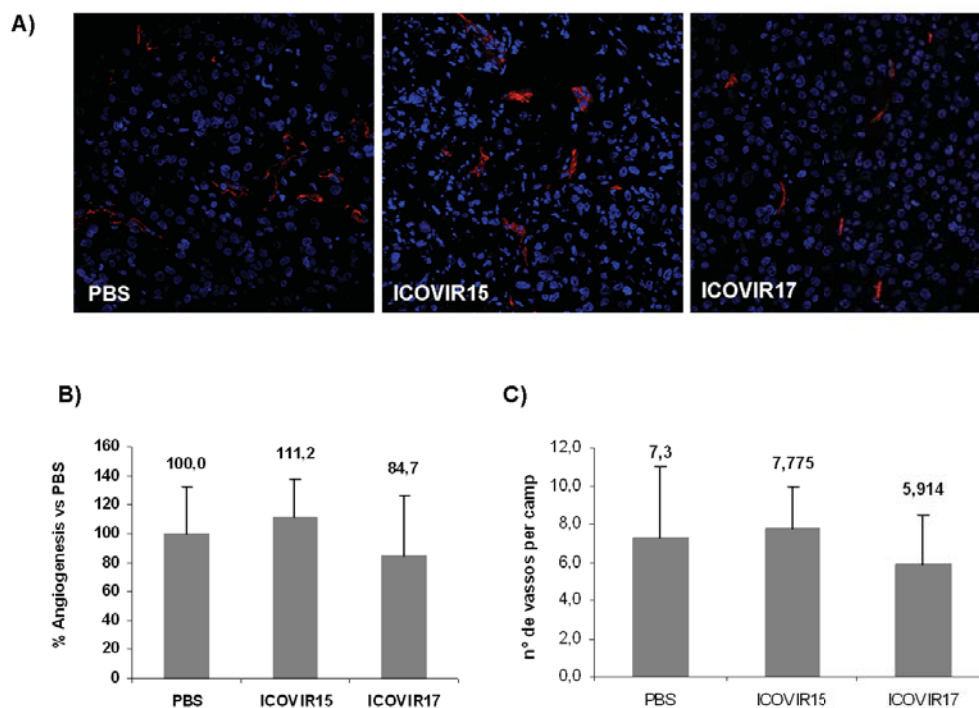


Figura 34. Anàlisi de l'endoteli vascular de tumors SKMel28 tractats per administració sistèmica amb l'adenovirus ICOVIR17. (A) Talls congelats de tumors SKMel28 tractats amb PBS, ICOVIR15 i ICOVIR17 es van analitzar amb un anticòs monoclonal pel marcador endotelial CD31, i un marcador secundari conjugat amb Alexa Fluor 546 (marcatge vermell). Els nuclis es van tenyir amb TROPO (marcatge blau). Les imatges tenen una ampliació 400x. (B) La intensitat de marcatge es va quantificar amb el *software* ImageJ, i el tan per cent d'angiogènesi per cada tumor tractat es va determinar respecte la intensitat de senyal mitjana dels tumors tractats amb PBS. (C) Número de vasos per camp. Cada camp es considera una fotografia presa amb ampliació 400x.

Discussió

1. ESTRATÈGIES PER ARMAR ADENOVIRUS ONCOLÍTIQS.

Una possible estratègia per tal d'augmentar l'eficàcia dels adenovirus oncolítics és l'expressió de transgens que millorin la capacitat citotòxica del virus, ja sigui perquè presentin un efecte citotòxic adjacent per les cèl·lules veïnes no infectades, un efecte immunoestimulador o millorin la distribució del virus pel tumor. Depenent de l'estratègia a utilitzar es necessitaran requeriments diferents pel que fa al temps i als nivells d'expressió del transgèn. El mode d'expressió del transgèn, i les modificacions del genoma viral necessàries per restringir la replicació del virus a les cèl·lules tumorals, i alhora permetre la inserció del transgèn sense afectar l'encapsidació viral, seran claus per l'èxit de la teràpia anticancerígena.

En aquesta tesi hem utilitzat l'expressió de dos tipus de transgens diferents per tal d'augmentar l'eficàcia terapèutica d'adenovirus replicatius: l'ús de proteïnes fusogèniques víriques de membrana (FMG), per la seva elevada citotoxicitat i pel seu efecte immunoestimulador; i la hialuronidasa, pel seu efecte de degradació de la matriu extracel·lular, disminució de la pressió intersticial i possible millora de la distribució viral.

La inserció de transgens en el genoma de l'AdwtRGD sota el control del MLP permet l'expressió del transgèn durant la fase tardana de la replicació i no interfereix en la replicació normal de l'adenovirus.

L'expressió del transgèn durant la fase tardana de la replicació evita interferències amb la replicació viral degudes a una mort prematura de la cèl·lula, i condiona l'expressió del transgèn a les cèl·lules on hi hagi replicació del DNA viral. En aquest treball, vam introduir els cDNA dels diferents transgens darrera la fibra adenoviral, sota el control del promotor principal tardà (MLP) de l'adenovirus. Davant dels cDNA, vam introduir l'acceptor de tall i lligació (SA) IIIa de l'adenovirus, que permet l'expressió del transgèn com una nova unitat d'*splicing* (L6). La inserció del transgèn darrera la fibra, en la unió entre la L5 i E4, es va escollir perquè és la regió més distal al promotor MLP, i per tant garanteix la màxima restricció de la replicació a les cèl·lules on no es dona la replicació viral. Aquesta estratègia ja l'havíem utilitzat, prèviament a l'inici d'aquesta tesi, per generar un adenovirus replicatiu que expressava la proteïna verda fluorescent (GFP) (Garcia-Castro *et al.*, 2005). Més tard, i en col·laboració amb el nostre grup, Cascante i col. van generar un adenovirus replicatiu que expressava la tat8-TK d'aquesta mateixa manera (Cascante *et al.*, 2007).

L'expressió tardana és especialment important quan es volen expressar transgens altament citotòxics, com les FMG o els gens suïcides, tant per prevenir la mort prematura de la

cèl·lula, com per restringir l'expressió del transgèn a les cèl·lules tumorals. Diferents treballs sugereixen que la generació d'un vector adenoviral que expressi la proteïna GALV és difícil degut a que una mort prematura de les cèl·lules 293, productores d'adenovirus, impediria l'obtenció del vector a títols suficientment elevats (Diaz *et al.*, 2000). Altres treballs demostren que l'expressió de gens suicides durant els primers moments del cicle viral pot interferir en la replicació del virus al convertir la prodroga en un metabolit tòxic per a les cèl·lules tumorals (Freytag *et al.*, 1998; Rogulski *et al.*, 2000). En aquesta tesi, l'expressió de la glicoproteïna GALV sota el MLP va permetre la generació de l'AdwtRGD-GALV a títols elevats, i va demostrar una elevada capacitat fusogènica, indicant que la proteïna GALV s'estava expressant correctament. Per altra banda, l'expressió de la proteïna F pel promotor MLP (AdwtRGD-F) va ser molt similar, o inclús superior, a l'expressió de la proteïna F pel promotor CMV (AdF). L'expressió de l'RNA de les proteïnes F i GALV es va poder detectar durant la fase tardana de la replicació, i la cinètica d'expressió de l'RNA GALV va demostrar ser pràcticament idèntica a la de la fibra. En un treball del nostre grup, la inserció de la proteïna GFP darrera la fibra adenoviral va disminuir lleugerament la quantitat de fibra adenoviral produïda (comunicació personal Juanjo Rojas). Tot i així, la quantitat de fibra incorporada en els virions purificats va ser igual a la de l'adenovirus salvatge que no expressava GFP. En aquesta tesi, els virions dels adenovirus salvatges que expressaven les proteïnes GALV i PH20 presentaven la mateixa composició de la càpsida proteica que l'adenovirus salvatge. Aquests resultats demostraven que tot i que la inserció d'un transgèn darrera la fibra pogués disminuir lleugerament la quantitat de fibra produïda, en ser una proteïna que es sintetitza en excés, aquesta disminució no afectava l'encapsidació dels virions. La inserció de les diferents FMG en l'AdwtRGD tampoc va afectar la replicació viral dels adenovirus armats en assajos de producció realitzats a altes dosis d'infecció.

Aquests resultats estan en acord amb un estudi realitzat per Jin i col. per identificar llocs addicionals d'inserció de transgens que no afectessin la replicació viral (Jin *et al.*, 2005). Aquest estudi es va realitzar amb un sistema basat en transposons que utilitzava el gen de la proteïna GFP amb un acceptor de tall i lligació al davant. Tots els llocs d'inserció identificats, que no afectaven la replicació viral, es localitzaven entre la regió E3 i la L5, o al voltant de la regió E4 i, en tots els casos, els transcrits s'originaven des del MLP. En aquest estudi, els possibles llocs d'inserció de la regió E3 no es van poder estudiar degut a que l'adenovirus replicatiu utilitzat tenia la regió E3 delecionada.

Altres grups han utilitzat sistemes semblants per expressar transgens durant la fase tardana de la replicació. La unió de transgens al gen de la fibra adenoviral mitjançant una seqüència IRES permet l'expressió del transgèn a temps i nivells semblants als de la fibra adenoviral (Fuerer and Iggo 2004; Lukashov *et al.*, 2005; Sauthoff *et al.*, 2002). Aquesta

aproximació ha estat molt utilitzada però té dos inconvenients principals. En primer lloc, la seqüència IRES del virus de l'encefalomiocarditis (EMCV), que ha estat la més utilitzada, té una llargada de 588 pb, i incorporada en un genoma adenoviral juntament amb el transgèn, pot superar fàcilment la mida màxima d'encapsidació del DNA. La seqüència de l'acceptor de tall i lligació IIIa, en canvi, té una llargada de només 26 pb, i permet optimitzar l'espai disponible d'inserció de DNA en el genoma. En segon lloc, els nivells d'expressió del transgèn expressat darrera una seqüència IRES són inferiors als nivells d'expressió del primer gen, obtenint uns nivells d'expressió del transgèn de com a màxim el 50 % de l'expressió del primer gen (Mizuguchi *et al.*, 2000). Altres grups han utilitzat acceptors de tall i lligació diferents al IIIa, com el de la fibra llarga de l'Ad40 i l'Ad41 (Carette *et al.*, 2005; Fuerer and Iggo 2004) o un acceptor de tall i lligació consens (Robinson *et al.*, 2008). En aquesta tesi vam escollir l'ús de l'acceptor de tall i lligació de la proteïna IIIa de l'adenovirus, de la regió L1, degut a que la seva activació es dona durant la fase tardana de la replicació viral, i requereix la síntesi de proteïnes virals tardanes (Muhlemann *et al.*, 2000). La comparació de les diferents estratègies d'expressió de transgens en un únic treball seria interessant per tal d'unificar esforços a l'hora de generar adenovirus oncolítics armats eficientment.

La deleció dels ORF1,2 o dels ORF1,2,3 de la regió E4 en el context d'un adenovirus salvatge pràcticament no afecta a la replicació viral. Quan la deleció es combina amb un genoma adenoviral modificat i la inserció d'un transgèn darrera la fibra, disminueix la producció viral i empitjora l'eficiència d'encapsidació.

La mida del genoma de l'adenovirus és molt propera al límit de DNA que pot ser encapsidat eficientment. S'ha descrit que la capacitat màxima d'encapsidació és un 105% del genoma adenoviral (1.8-2 Kb) (Ghosh-Choudhury *et al.*, 1987). Tot i així, s'han descrit insercions de DNA extern de fins a 2.2 kb (Graham 1984). La inserció dels cDNA que codifiquen per les proteïnes GALV i PH20 en el genoma de l'AdwtRGD no va superar la capacitat màxima d'encapsidació, permetent la generació d'adenovirus replicatius armats sense cap gen viral deletat.

A l'hora d'insertar els transgens en el genoma d'un adenovirus oncolític, com l'ICOVIR5, que conté gairebé 1 kb més que l'adenovirus salvatge, es requeria la deleció d'algun gen viral. L'estratègia més àmpliament utilitzada és la deleció d'una part o de tota la regió E3, ja que s'ha demostrat que aquesta regió no és essencial per la replicació viral *in vitro* (Bauzon *et al.*, 2003). La regió E3B de l'adenovirus es troba deletada en molts dels adenovirus oncolítics utilitzats en diferents laboratoris, incloent l'ONYX15, que està sent administrat en diferents assajos clínics. Tot i així, la deleció de la regió E3 ha demostrat ser perjudicial per l'activitat oncolítica dels

adenovirus *in vivo*. La retenció de la regió E3 augmenta l'eficàcia dels virus oncolítics en models xenografts de ratolí (Suzuki *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 1999), i la seva deleció incrementa l'eliminació del virus pel sistema immunitari (Wang *et al.*, 2003). Una altra possibilitat és la deleció del gen E1b-55K. Estudis inicials van proposar que la funció d'aquest gen era imprescindible en cèl·lules tumorals amb la via de p53 alterada (Bischoff *et al.*, 1996). Tot i així, la replicació dels adenovirus deleccionats en E1b-55K es troba atenuada en la majoria de línies tumorals respecte l'adenovirus salvatge, independentment de l'estat de p53, degut a defectes en l'exportació dels mRNA virals del nucli (Edwards *et al.*, 2002; Harada and Berk 1999; Rothmann *et al.*, 1998).

Fins ara, no s'han descrit estudis que deleccionin gens de la regió E4 per obtenir espai addicional per a la inserció de transgens en adenovirus oncolítics. En aquesta tesi, hem analitzat l'efecte de la deleció dels ORF1,2,3 i dels ORF1,2 de la regió E4 sobre la replicació i la citotoxicitat d'adenovirus salvatges i d'adenovirus oncolítics armats. Aquestes deleccions es van realitzar en base a un estudi presentat per Bridge i Ketner que analitzaven l'efecte de diferents mutacions i deleccions de la regió E4 sobre la síntesi de proteïnes tardanes, l'acumulació d'mRNA tardans al citoplasma, l'acumulació de DNA viral i la formació de calves. En aquest estudi, mutants deleccionats en els ORF1,2 o en els ORF1,2,3 i 3/4 no presentaven defectes en cap dels paràmetres analitzats (Bridge and Ketner 1989). En aquesta tesi, la delecció dels ORF1,2 en el contorn d'un adenovirus salvatge no va afectar la replicació viral ni la citotoxicitat del virus. Quan a més dels ORF1,2 es deleccionava l'ORF3 (Adwtorf123), es van detectar pèrdues de potència citotòxica i producció viral en la línia cel·lular A549 respecte l'adenovirus salvatge. La pèrdua de producció viral de l'Adwtorf123 en A549 no es va confirmar en els estudis de competició realitzats en aquesta mateixa línia. En altres línies tumorals, com les PC3, les NP9 i les SKMel28 no es van detectar pèrdues en la producció viral o en la citotoxicitat de l'Adwtorf123. Els nostres resultats es complementen amb els resultats obtinguts per Bridge i Ketner, i indiquen que les proteïnes ORF1, ORF2 i ORF3 no són essencials per a la replicació de l'adenovirus en presència de la resta de les proteïnes de la regió E4, i en el context d'un adenovirus replicatiu salvatge.

En canvi, quan la deleció dels ORF1,2,3 de la regió E4 es va aplicar sobre el genoma d'un adenovirus oncolític, com l'ICOVIR5, armat amb el gen GALV (ICOVIR9dE4), la producció de partícules virals funcionals es va veure greument perjudicada. La producció de partícules físiques d'ICOVIR9dE4 (genomes virals encapsidats), en canvi, va ser molt similar a la producció d'ICOVIR5, indicant que la disminució en la producció de partícules funcionals no es devia a una replicació incorrecta del DNA viral, sinó a defectes en l'encapsidació del virus. L'anàlisi de la composició de la càpside viral confirmava aquests resultats, indicant un dèficit en quantitat fibra present en les càpsides d'ICOVIR9dE4. Aquests defectes en l'encapsidació de l'ICOVIR9dE4 es

poden deure a la combinació de les diferents modificacions realitzades en l'ICOVIR9dE4, incloent la delecció dels ORF d'E4, la llargada del genoma, la inserció d'un transgèn darrera la fibra adenoviral, o la formació de sincitis. La contribució de la delecció dels ORF1,2,3 en la baixa producció de l'ICOVIR9dE4 és incerta, i es barreja amb tots els altres factors esmentats.

Per altra banda, la generació de l'ICOVIR8dE4 ens pot orientar una mica més en la contribució de les diferents modificacions en la disminució de la replicació viral de l'ICOVIR9dE4. En l'ICOVIR8dE4, el gen de la hialuronidasa es va insertar darrera la fibra adenoviral en el genoma de l'ICOVIR5. En aquest cas, la delecció dels ORF1,2 va ser suficient per permetre la inserció del transgèn. La producció de partícules funcionals d'ICOVIR8dE4 també es va veure greument perjudicada respecte la producció d'ICOVIR5, tot i que la quantitat de fibra present en els virions d'ICOVIR8dE4 purificats era igual a la d'ICOVIR5. Per altra banda, la quantitat de hialuronidasa expressada a les 48 h era inferior a la quantitat de hialuronidasa expressada per l'AdwtRGD-PH20¹, indicant un retràs o una disminució de la producció del transgen respecte l'adenovirus salvatge.

L'ICOVIR9dE4 i l'ICOVIR8dE4 tenen algunes característiques comuns que poden interferir en la replicació viral. La primera és un genoma molt més llarg que l'adenovirus salvatge (2038 pb i 1786 pb, respectivament), l'encapsidació del qual es podria veure afectada per motius d'espai. Per altra banda, ambdós virus presenten la inserció d'un transgèn darrera la fibra, que podria estar disminuint la quantitat de fibra produïda. En un adenovirus replicatiu armat, la disminució de la producció de fibra no afecta a la composició de la càpsida proteica, probablement perquè la fibra es produeix en excés. Igualment, l'ICOVIR8dE4 tampoc presenta una disminució de la quantitat de fibra present en els virions purificats. Així doncs, la inserció d'un transgen darrera la fibra no pot ser l'únic motiu pel qual els virions d'ICOVIR9dE4 presenten una càpsida viral amb menor quantitat de fibra. Finalment, tant l'ICOVIR9dE4 com l'ICOVIR8dE4 presenten els ORF 1 i 2 delecionats. A hores d'ara, la implicació de les proteïnes ORF1 i ORF2 en el cicle lític es desconeix. La funció de l'ORF 2 es desconeix completament. L'mRNA de l'ORF1 s'acumula durant la fase tardana de la replicació, suggerint que l'ORF1 podria tenir funcions lítiques tardanes. Per altra banda, s'ha demostrat que la proteïna ORF1 està implicada en l'activació de la via d'mTOR per la replicació viral en les cèl·lules quiescents primàries (O'Shea *et al.*, 2005). Els nostres resultats suggereixen que una de les dues proteïnes, més probablement la proteïna ORF1, presenta funcions en la replicació viral. Tot i que aquestes funcions poden ser prescindibles en un context d'adenovirus salvatge en altres situacions la presència d'aquestes proteïnes pot ser determinant per una replicació viral eficient.

¹ Els assajos per determinar l'activitat hialuronidasa dels sobrenadants d'AdwtRGD-PH20 i ICOVIR8dE4 es van realitzar en les mateixes condicions i simultàniament. Les mostres es van córrer i revelar en el mateix gel. L'activitat hialuronidasa dels dos assajos, es per tant comparable (Fig 22c respecte Fig 27c).

Per altra banda, la producció viral de l'ICOVIR9dE4 sembla més agreujada que la producció viral de l'ICOVIR8dE4, suggerint la implicació d'altres factors en l'empitjorament de la replicació viral i l'encapsidació del virus. Per una banda, el genoma de l'ICOVIR9dE4 és més llarg que el de l'ICOVIR8dE4, i per tant la seva encapsidació es podria veure més perjudicada. Per l'altra, l'ICOVIR9dE4 és un virus fusogènic. Les proteïnes de la càpside es sintetitzen al citoplasma del sinciti, i un cop sintetitzades tornen als diferents nuclis del sinciti on es dona l'encapsidació del DNA viral. La repartició de les proteïnes virals sintetitzades en els diferents nuclis del sinciti podria no ser equitativa, i per tant l'encapsidació viral podria no produir-se amb la mateixa eficiència a tots el nuclis del sinciti. Finalment, l'ICOVIR9dE4 presenta l'ORF3 delecionat. La proteïna ORF3 presenta diferents funcions crítiques per la replicació viral, com l'acumulació d'mRNA tardans al citoplasma i la síntesi de proteïnes virals tardanes. Tot i així, diferents estudis demostren la redundància de la gran majoria d'aquestes funcions amb les funcions de la proteïna ORF6 (Bridge and Ketner 1989).

La contribució dels diferents factors a la baixa producció dels adenovirus oncolítics armats esmentats és difícil de valorar amb els experiments realitzats, però la comparació d'aquests resultats amb els obtinguts amb els adenovirus salvatges modificats (ja siguin els adenovirus replicatius armats, o els delecionats en la regió E4) ens indica que és la combinació de les diferents modificacions el que afecta la replicació viral. Per tal d'analitzar la possible implicació de la formació de sincitis en l'encapsidació dels virus, seria interessant repetir els experiments realitzats amb un ICOVIR9dE4 amb la proteïna GALV mutada (incapaç de fusionar) o bé en cèl·lules de hámster, que són permissives a la replicació viral de l'Ad5, però no fusionen en presència de la proteïna GALV. La contribució de la delecció dels ORF 1,2,3 es podria analitzar comparant l'ICOVIR5 amb un ICOVIR5 amb els ORF1,2 o els ORF1,2,3 delecionats.

La inserció dels transgens GALV o PH20 en l'adenovirus ICOVIR15 permet la generació d'adenovirus oncolítics armats que presenten una gran eficàcia terapèutica.

En l'ICOVIR15, l'expressió d'E1A- Δ 24 està controlada pel promotor endogen d'E1A modificat mitjançant la inserció de quatre llocs d'unió al factor de transcripció E2F i un lloc d'unió al factor de transcripció Sp1. El resultat d'aquestes modificacions és un virus selectiu de cèl·lula tumoral, amb un genoma 150 pb més llarg que l'adenovirus salvatge. La inserció de les seqüències codificants per a les proteïnes GALV i PH20 en el genoma de l'ICOVIR15 va permetre la generació de dos adenovirus oncolítics armats, l'ICOVIR16 i l'ICOVIR17, sense la necessitat de delecionar cap gen viral. El genoma de l'ICOVIR16 era 2207 pb més llarg que el de l'Adwt, mentre el genoma de l'ICOVIR17 presentava 1731 pb més que el genoma de l'Adwt.

L'anàlisi de la producció viral dels nous adenovirus oncolítics armats va demostrar que, tot i contenir genomes tant o més llargs que l'ICOVIR9dE4 o l'ICOVIR8dE4, i tenir un transgèn inserit darrera el gen de la fibra adenoviral, la producció viral de l'ICOVIR16 i l'ICOVIR17 era pràcticament idèntica a la de l'ICOVIR15. Aquest resultat indicaven que la delecció dels ORF1, ORF2 i ORF3 jugava un paper molt important en la disminució de la producció viral dels adenovirus ICOVIR8dE4 i ICOVIR9dE4.

L'anàlisi de l'eficàcia antitumoral de l'ICOVIR16 i l'ICOVIR17 en diferents models xenògrafs en ratolins immunodeprimits va revelar una gran activitat oncolítica pels dos virus en totes les condicions testades. L'administració de l'ICOVIR16 i l'ICOVIR17, ja sigui intratumoral o endovenosa, va controlar el creixement tumoral més eficientment que l'administració de l'adenovirus control, l'ICOVIR15 i que el PBS. A diferència dels resultats obtinguts amb l'ICOVIR9dE4 i l'ICOVIR8dE4, les diferències de creixement tumoral dels grups tractats amb l'ICOVIR16 i l'ICOVIR17 respecte el grup control (PBS) van ser significatives en totes les condicions i models utilitzats.

Aquests resultats indicaven que l'ICOVIR15 era un entorn més adequat pel clonatge de transgens que l'ICOVIR5. Aquesta conclusió pot tenir implicacions importants a l'hora de dissenyar nous adenovirus oncolítics armats. L'ús de promotors que controlin l'expressió d'un o més gens primerencs, junt amb l'aïllament d'aquests gens amb aïllants com la DM o l'HS4 resulta en la generació d'adenovirus oncolítics altament selectius (Cascallo *et al.*, 2007; Majem *et al.*, 2006). L'augment de l'eficàcia antitumoral d'aquests virus mitjançant la inserció de transgens sol requerir l'eliminació d'algun gen viral, que pot presentar funcions importants per a la teràpia adenoviral. La delecció dels gens de la regió E3 facilita el reconeixement i per tant l'eliminació del virus pel sistema immune (Wang *et al.*, 2003). La delecció del gen E1B-55K s'associa a una disminució de la síntesi de proteïnes tardanes (Rothmann *et al.*, 1998), mentre que la delecció dels ORF1,2,3 de la regió E4 empitjora la replicació viral i l'encapsidació del DNA (aquest treball). Per tant, el guany en eficàcia terapèutica obtingut per l'expressió del transgèn es pot neutralitzar per la disminució de l'eficàcia oncolítica de l'adenovirus deguda a la delecció dels gens virals.

La inserció de llocs d'unió a factors de transcripció en els promotors endogens adenovirals és una bona alternativa a la inserció de promotors exògens per controlar l'expressió de gens primerencs. Aquesta estratègia ens permet conservar millor el genoma adenoviral, i economitza l'espai del genoma. El primer virus construït en aquesta línia va ser presentat per Fuerer i col. per al tractament del càncer de còlon. En el seu treball, Fuerer i col. modificaven el promotor d'E1A introduint quatre llocs d'unió al factor de transcripció Tcf, de manera que l'expressió d'E1A s'activés només en cèl·lules amb la via de Wnt activada (Fuerer and Iggo

2002). Per tal d'eliminar possibles interferències, els elements de control endogen presents a l'ITR i al senyal d'empaquetament van ser eliminats, i el senyal d'empaquetament es va introduir a l'ITR dret. Més tard, aquest mateix grup va generar un adenovirus oncolític armat que expressava la citosina deaminasa durant la fase tardana de la replicació, on l'expressió d'E1A depenia de l'estat d'activació de la via de Wnt (Fuerer and Iggo 2004). La inserció del gen de la citosina deaminasa unit a la seqüència IRES de l'EMCV no va requerir la deleció de cap gen viral. En el nostre treball, la inserció de llocs d'unió a E2F en el promotor endogen d'E1A permet l'ús de l'adenovirus oncolític en un ampli rang de cèl·lules tumorals. A més, els promotors amb llocs d'unió a E2F estan regulats a dos nivells: per activació i per repressió. Mentre la unió d'E2F lliure al promotor endogen d'E1A activa la transcripció en les cèl·lules tumorals, en les cèl·lules normals, la unió del complex E2F-pRb reprimeix la transcripció d'E1A.

Segons els nostres resultats, el disseny de nous adenovirus oncolítics armats haurà de passar per l'ús de promotors petits, o modificacions de promotors endògens, més que per l'ús de promotors aïllats amb deleccions de gens virals. Aquesta nova aproximació podria anar en detriment d'una elevada selectivitat, com la demostrada per ICOVIR5, i per tant la seva administració en pacients via endovenosa requerirà un seguiment molt precís de la toxicitat. La possible toxicitat d'aquests nous adenovirus oncolítics armats es podria disminuir mitjançant la introducció de seqüències d'unió a factors de transcripció en els promotors endògens d'altres gens virals primerencs, com els d'E1b o E4, o mitjançant la modificació del tropisme viral. L'eliminació de l'entrada a fetge mitjançant mutacions que eliminin la unió a factors en sang, i l'addició de lligands selectius de tumor seran claus en el disseny de nous adenovirus oncolítics armats.

2. L'EXPRESSIÓ DE FMG PER INCREMENTAR LA POTÈNCIA D'ADENOVIRUS ONCOLÍTICS.

Les proteïnes víriques fusogèniques de membrana són uns transgens molt interessants per a la teràpia gènica del càncer per dos motius principals. En primer lloc, l'expressió d'FMG és altament citotòxica, presentant un efecte adjacent com a mínim 10 vegades superior a l'efecte adjacent provocat pel sistema de la timidin quinasa del virus herpes simplex amb la prodroga ganciclovir (HSVtk/GCV) (Bateman *et al.*, 2000). Per altra banda, la mort associada a la formació de sincitis és altament immunoestimuladora (Bateman *et al.*, 2002).

En aquesta tesi hem analitzat la capacitat de dues FMG diferents d'augmentar la capacitat citotòxica d'adenovirus replicatius: la proteïna F del paramixovirus SV5, i la glicoproteïna GALV del virus de la leucèmia de gibó.

L'expressió de la proteïna F del paramixovirus SV5 per l'adenovirus AdwtRGD-F és capaç de generar sincitis de 3 o 4 nuclis, però no augmenta l'activitat oncolítica de l'adenovirus.

La inserció del cDNA de la proteïna F de la soca W3A del paramixovirus SV5 en el genoma de l'Adenovirus AdwtRGD va permetre la generació de l'AdwtRGD-F. L'anàlisi per immunofluorescència va indicar que la proteïna F s'estava expressant eficientment, i que aquesta es localitzava a la membrana de les cèl·lules infectades. Tot i així els sincitis detectats eren molt petits, incloent un màxim de 5 nuclis, i l'expressió de la proteïna F no va ser capaç d'augmentar la citotoxicitat de l'adenovirus *in vitro* ni tampoc *in vivo*.

En treballs anteriors, l'expressió de la proteïna F de la soca W3A pel sistema de vector SV40 en cèl·lules de ronyó de simi (CV-1) havia resultat en la formació de grans sincitis multinucleats en absència de la proteïna HN, tot i que es va observar que hi havia moltes més cèl·lules expressant la proteïna F a la seva membrana de les que estaven formant sincitis (Horvath *et al.*, 1992; Paterson *et al.*, 1984). La capacitat fusogènica de la proteïna F W3A en absència de la proteïna HN es va confirmar en altres treballs per transfecció de les cèl·lules de hámster BHK amb plasmidis que expressaven la proteïna F (Ito *et al.*, 1997; Paterson *et al.*, 2000). En canvi, quan la proteïna F W3A s'expressava en el virus vacunal, o amb el sistema T7-virus vacunal, la proteïna F no podia mediar la fusió cel·lular per ella mateixa, i requeria la proteïna HN (Heminway *et al.*, 1994; Horvath *et al.*, 1992). Aquests resultats es van atribuir a que el virus de la verola induïa un efecte citopàtic molt sever en les cèl·lules CV1, que s'arrodonien dificultant el contacte cèl·lula-cèl·lula necessari perquè la proteïna F induís la fusió per ella sola. En l'AdwtRGD-F, la proteïna F s'expressa durant la fase tardana de la replicació viral, moment en què l'efecte citopàtic ja es comença a fer evident. Aquest efecte citopàtic és la principal diferència entre els assajos realitzats amb l'AdwtRGD-F, i els resultats previs obtinguts amb l'AdF, un vector adenoviral no replicatiu que expressava el gen de la proteïna F (Gomez-Trevino *et al.*, 2003). L'expressió de la proteïna F per aquest vector sí que va ser capaç d'induir la fusió en les cèl·lules de simi CV1. La infecció de les cèl·lules tumorals humanes A431 amb l'AdF també va resultar en la formació de sincitis, tot i que la fusió va ser menys eficient que en les cèl·lules de simi CV1.

En la majoria dels paramixovirus perquè la fusió de membranes cel·lulars es dugui a terme cal que (i) la proteïna HN interaccioni amb el seu receptor de la cèl·lula hoste, l'àcid sialic (ii) la proteïna HN i la proteïna F interaccionin (iii) la proteïna HN aportin l'energia necessària perquè la proteïna F canvi la seva conformació i es doni la fusió. Per la proteïna F W3A, que no requereix la proteïna HN per fusionar, el canvi conformacional de la proteïna F es donaria mitjançant el contacte amb la membrana de la cèl·lula hoste, o mitjançant la unió a un receptor

de membrana no identificat (Lamb 1993). Per tant, l'eficiència de la fusió podria dependre de la proximitat de les membranes, de la composició lípida de la membrana cel·lular i de la quantitat de receptors presents a la membrana de la cèl·lula diana. Aquests factors poden variar considerablement segons la línia cel·lular utilitzada.

Per tal d'avaluar quins factors poden influir en la baixa capacitat fusogènica de la proteïna F expressada per l'adenovirus AdwtRGD-F, primer caldria demostrar que la proteïna F és capaç de fusionar les cèl·lules tumorals humanes emprades en aquest treball en absència d'efecte citopàtic. Això es podria analitzar mitjançant la infecció d'aquestes cèl·lules amb l'AdF, o mitjançant la transfecció amb plasmidis d'expressió. També seria interessant avaluar si l'AdwtRGD-F és capaç d'induir la fusió en les cèl·lules CV1 i BHK. Degut a que aquestes cèl·lules són cèl·lules de ronyó de simi i h`amster, respectivament, primer caldria comprovar que les proteïnes tardanes de l'adenovirus humà s'expressen correctament en aquestes línies cel·lulars.

Tot i que la proteïna F pot mediar la fusió cel·lular per ella mateixa, diferents estudis demostren que la coexpressió de la proteïna HN augmenta la fusió. Tot i així, ens els nostres experiments de coinfecció de l'AdwtRGD-F i l'AdHN no vam observar una millora de la citotoxicitat. Aquests resultats, junt amb la dificultat d'incloure dos transgens en un adenovirus oncolític, ens va fer descartar la possibilitat d'augmentar la capacitat fusogènica de l'AdwtRGD-F per coexpressió de la proteïna HN. Una possible estratègia per augmentar la capacitat citotòxica de l'AdwtRGD-F seria la introducció de mutacions que augmentin la capacitat fusogènica de la proteïna F en absència de la proteïna HN. En aquest sentit, s'ha descrit que les mutacions dels residus S443, L447 i I449 de la proteïna F W3A causen hiperfusió de forma independent a la unió de HN (Paterson *et al.*, 2000; Russell *et al.*, 2003).

L'expressió de la glicoproteïna GALV en adenovirus replicatius indueix la formació de grans masses multinucleades i augmenta la citotoxicitat *in vitro*.

Al contrari del què va ocórrer amb la proteïna F del paramixovirus SV5, l'expressió de la forma hiperfusogènica de la glicoproteïna GALV per l'adenovirus replicatiu AdwtRGD-GALV va resultar en la formació de grans sincitis multinucleats. La replicació viral i la citotoxicitat dels virus armats amb GALV va diferir segons la dosi infectiva de virus.

Quan les cèl·lules tumorals s'infectaven amb dosis elevades d'AdwtRGD-GALV la formació de grans masses multinucleades apareixia a les 24-36 hores post-infecció. En aquestes condicions, les cèl·lules fusionades formaven unes pilotes que es desenganxaven ràpidament de la placa i morien. Els assajos de producció viral a altes dosis d'infecció indicaven que

l'adenovirus fusogènic AdwtRGD-GALV es produïa tan eficientment com l'AdwtRGD i s'alliberava inclús més eficientment. L'augment de l'alliberació viral es pot atribuir a que, després de la infecció amb altes m.o.i de virus, totes les cèl·lules en cultiu estan infectades, i per tant estan expressant la proteïna GALV en la seva membrana. Degut a què el procés de fusió de membranes crea porus en la membrana de les cèl·lules (Gomez-Trevino *et al.*, 2003), probablement aquests sincitis presenten membranes molt perturbades i altament permeables. En aquestes condicions, l'alliberació viral es veu, molt probablement, afavorida, i la citotoxicitat cel·lular es veu incrementada.

El fet que l'expressió d'una FMG per un adenovirus replicatiu augmentava l'alliberament del virus ja havia estat descrit anteriorment per Li i col. Aquests autors van utilitzar un adenovirus replicatiu prèviament descrit (Dewar *et al.*, 1989) que expressava la proteïna de fusió del virus de la immunodeficiència humana (HIV) per al tractament de cèl·lules tumorals CD4⁺ (Li *et al.*, 2001a). Els seus resultats indicaven que l'expressió de la proteïna fusogènica de l'HIV augmentava la producció viral total, i l'alliberament de virus al sobrenadant. En aquesta tesi, no s'ha detectat un augment de la producció viral en cap dels virus fusogènics generats. Una possible explicació per aquesta divergència en els resultats és que tots els adenovirus fusogènics generats en aquesta tesi han presentat genomes amb grandàries molt properes al límit de l'encapsidació viral, a diferència del virus utilitzat per Li i col. que presentava la regió E3 delecionada. A més, els seus estudis utilitzen una proteïna fusogènica diferent, i unes cèl·lules tumorals diferents, i per tant els nostres resultats són difícilment comparables amb els seus.

En els assajos realitzats a baixa m.o.i. i temps llargs, l'AdwtRGD-GALV es va produir a títols significativament inferiors als de l'AdwtRGD, i l'alliberament viral es va veure encara més disminuït. Els sincitis formats a baixes m.o.i, a partir d'una sola cèl·lula infectada, poden arribar a contenir de 15 a 100 nuclis, depenent de la línia cel·lular. Els resultats obtinguts amb l'anàlisi per FISH indiquen que, dels diferents nuclis que constitueixen un sinciti, només el nucli inicialment infectat serà capaç de replicar el DNA, i per tant tots els altres 15-100 nuclis moriran sense produir virus. Aquests resultats estan en desacord amb el treball presentat per Li i col. on els autors detecten càpsides virals en tots els nuclis del sinciti i proposen que els adenovirus es poden dispersar i replicar en els diferents nuclis del sincitis (Li *et al.*, 2001a). Posteriorment, i en acord amb els nostres resultats, Horn i col. van utilitzar un vector adenoviral que expressa les proteïnes F i H del xarmpió per demostrar que la replicació del DNA només es dona en un nucli del sinciti (Horn *et al.*, 2005). El treball presentat per Horn i col. suggereix que perquè el virus es repliqui eficientment, les noves partícules formades han de sortir de la cèl·lula inicialment infectada i tornar a començar el cicle viral lític en una altra cèl·lula. Tot i que el DNA només es va detectar en un sol nucli del sinciti, aquests autors van detectar la proteïna de l'hexó en

pràcticament tots els nuclis, suggerint que les càpsides virals que havien detectat Li i col. eren càpsides buides.

El fet que a l'interior d'un sinciti format a baixes m.o.i. el DNA viral només es repliqui en un sol nucli, però en canvi tots els nuclis del sinciti continguin càpsides virals podria anar en detriment d'una producció viral eficient. Segons aquesta hipòtesi, les proteïnes de la càpsida viral sintetitzades al citoplasma del sinciti es podrien dispersar pels diferents nuclis, disminuint la quantitat de proteïnes de la càpsida disponibles en el nucli on es donarà l'encapsidació viral. Aquesta hipòtesi podria explicar la disminució de la producció de l'AdwtRGD-GALV després de la infecció a baixes m.o.i.

Per altra banda, tot i els baixos títols obtinguts en la producció viral, en els assajos de citotoxicitat l'AdwtRGD-GALV va matar les cèl·lules en cultiu més eficientment que l'AdwtRGD. Aquest augment de citotoxicitat produït per l'expressió de la glicoproteïna GALV també es va fer manifest en als assajos de citotoxicitat realitzats amb l'ICOVIR9dE4 i amb l'ICOVIR16. Tot i que l'augment en la citotoxicitat va ser significatiu en totes les línies cel·lulars testades, les diferències en citotoxicitat respecte els adenovirus controls no van ser tan grans com s'esperava veient les dimensions dels sincitis formats, i tenint en compte que una sola cèl·lula infectada que expressi la glicoproteïna GALV pot eliminar 100 cèl·lules en cultiu. Aquest resultat es deuen, probablement a dos factors principals. En primer lloc, la disminució de la producció viral compensaria l'elevada citotoxicitat, resultant en un guany net de citotoxicitat inferior a l'esperat. En segon lloc, els sincitis formats a baixes m.o.i. moren més lentament que els sincitis formats a alta m.o.i., i probablement més lentament que les cèl·lules infectades per un adenovirus no fusogènic. Aquesta mort lenta dels sincitis formats a baixes m.o.i també podria explicar l'alentiment de l'alliberament de l'AdwtRGD-GALV en els assajos de producció.

L'adenovirus oncolític fusogènic ICOVIR16 presenta una gran eficàcia antitumoral *in vivo*, i pot ser un ferm candidat pel seu desenvolupament clínic.

En aquesta tesi, l'administració d'ICOVIR16 en diferents models tumorals va demostrar una elevada activitat terapèutica. Probablement, els resultats més espectaculars es van obtenir després de l'administració intratumoral en un model de melanoma, on 42 dies després de l'administració viral el 70 % dels tumors havien regressat respecte el dia d'inici del tractament. L'administració sistèmica d'una única dosi d'ICOVIR16 en tumors de melanoma, pàncrees i pròstata va induir una reducció en el creixement respecte el grup PBS d'un 75%, 90% i 60 % respectivament. Tot i l'elevada eficàcia antitumoral demostrada per l'ICOVIR16, no es van observar regressions tumoral completes en cap dels tres models utilitzats.

La inhabilitat dels adenovirus oncolítics d'erradicar els tumors ha estat demostrada en diferents estudis. En general, administracions repetides d'adenovirus oncolítics armats en tumors xenografts preestablerts, ja sigui via intratumoral o via intravenosa, aturen o redueixen significativament el creixement tumoral, però els tumors rarament desapareixen (Kim *et al.*, 2006; Lukashov *et al.*, 2005; Post *et al.*, 2007). Un treball presentat per Sauthoff i col. demostra que la replicació de l'adenovirus salvatge en tumors xenografts pot persistir fins als 100 dies després de la seva administració intratumoral, tot i que aquesta replicació no es tradueix en una erradicació completa del tumor (Sauthoff *et al.*, 2003). Aquests autors demostren que els foci d'infecció viral estan envoltats de cèl·lules del teixit connectiu murí, i suggereixen que l'onada de replicació viral s'atura quan el virus troba aquest teixit connectiu murí, on es incapaç de replicar-se. En un model xenograft de ratolí, l'ICOVIR16 és incapaç d'eliminar les cèl·lules del teixit connectiu perquè l'adenovirus humà és incapaç de replicar-se en cèl·lules de ratolí, i perquè la glicoproteïna GALV no indueix la fusió de cèl·lules murines. En canvi, els nostres resultats *in vitro* demostren que l'ICOVIR16 és capaç de fusionar i eliminar eficientment fibroblasts humans associats a carcinoma (CAF) inclús després de la infecció a baixes m.o.i. Aquests resultats indiquen que en humans la presència de fibroblasts no representaria una barrera tan important per a la distribució de l'ICOVIR16 com ho representa en un model murí. Un altre factor que pot desafavorir l'eficàcia antitumoral de l'ICOVIR16 en tumors xenografts de ratolí és que algunes línies cel·lulars, com les PC3, presenten un creixement molt més ràpid en ratolins del que s'esperaria en un tumor humà. Considerant que la mort del sinciti format a baixes m.o.i. és relativament lenta, i que probablement l'alliberació del virus de l'interior del sinciti es pot veure alentida *in vivo*, aquest creixement cel·lular descontrolat podria provocar que una part del tumor fos capaç d'escapar de la teràpia viral. Degut a que els tumors en els pacients humans creixen a un ritme més lent que en els ratolins, seria d'esperar que l'ICOVIR16 es veiés afavorit, i fos capaç d'eliminar el tumor més eficientment. Finalment, cal tenir en compte que la mort del sinciti és altament immunoestimuladora. La fusió de cèl·lules tumorals s'associa amb l'alliberament d'antígens tumorals que són eficientment transferits a les cèl·lules presentadores d'antígens per a la presentació creuada a les cèl·lules T, i la conseqüent generació d'una resposta immunitària a nivell sistèmic (Bateman *et al.*, 2002; Linardakis *et al.*, 2002). L'efecte de la resposta immunològica induïda pel tractament amb ICOVIR16 no ha pogut ser avaluat degut a la falta de models preclínic adequats. Recentment s'ha proposat l'ús de hámsters de Síria com a model immunocompetent i permissiu per a la replicació d'adenovirus humans (Thomas *et al.*, 2008). Aquest model, però, no és vàlid per analitzar l'efecte de l'expressió de la glicoproteïna GALV degut a la manca de receptors per aquesta glicoproteïna en les cèl·lules de hámster.

3. L'EXPRESSIÓ DE HIALURONIDASA PER MILLORAR L'EFICÀCIA TERAPÈUTICA D'ADENOVIRUS ONCOLÍTIQS.

Tot i que cada cèl·lula tumoral infectada amb un adenovirus replicatiu produeix milers de partícules infectives, ni tan sols l'administració d'adenovirus salvatge a l'interior del tumor és capaç d'erradicar totalment una massa tumoral sòlida tridimensional (Harrison *et al.*, 2001). Segons una anàlisi matemàtica d'un model tumoral tridimensional infectat per virus replicatius, la replicació viral pot ser suficientment potent per erradicar fins i tot tumors de creixement ràpid, en absència d'un sistema immunitari que neutralitzi el virus. Segons aquest estudi, una àmplia distribució espacial del virus és molt més important que concentracions elevades de virus, i suggereix que l'administració viral ha de ser extremadament agressiva des d'un punt de vista geogràfic. Una regió mil·limètrica d'un tumor de creixement ràpid sense infectar pot resultar en una evasió del virus en la massa tumoral (Wein *et al.*, 2003). En un altre estudi, Harrison i col. van demostrar que si barrejaven cèl·lules infectades amb adenovirus salvatge amb cèl·lules no infectades, i les implantaven en ratolins, una cèl·lula infectada per cada 100 cèl·lules no infectades era suficient per prevenir l'establiment del tumor (Harrison *et al.*, 2001). En canvi, quan tumors preestablerts es tractaven amb dosis elevades de virus injectades en quatre punts del tumor, els tumors rarament desapareixien. Els autors van atribuir aquest fet, en part, a la dificultat del virus de difondre per l'estroma tumoral.

En aquesta tesi hem demostrat que l'expressió de la hialuronidasa PH20 és capaç de millorar la distribució intratumoral d'adenovirus replicatiu, i que això es tradueix en un augment de l'eficàcia terapèutica.

La coadministració de hialuronidasa amb l'adenovirus oncolític ICOVIR5 millora la distribució viral per la massa tumoral i n'augmenta l'eficàcia terapèutica en un model de melanoma.

Degut a l'elevada expressió d'àcid hialurònic per les cèl·lules SKMel28, tant *in vitro* com *in vivo*, aquesta línia cel·lular es va escollir per analitzar l'efecte de la hialuronidasa sobre la dispersió d'adenovirus replicatiu *in vivo*. Altres línies cel·lulars, com les A549 (pulmó), les HCT116 (còlon), les NP9 i les BxPC3 (pàncrees) van mostrar nivells baixos d'expressió d'HA *in vitro*, inclús inferiors a aquells expressats per les 293 i les BZR d'origen no tumoral. Aquests resultats es poden atribuir a que, tot i que la síntesis d'HA es troba incrementada en cèl·lules tumorals malignes (Calabro *et al.*, 2002; Kimata *et al.*, 1983; Zhang *et al.*, 1995), la majoria de l'HA és produït per les cèl·lules de l'estroma (Bertrand *et al.*, 1992; Toole *et al.*, 1979). La producció d'HA per les cèl·lules de l'estroma depèn de les interaccions amb les cèl·lules tumorals

(Asplund *et al.*, 1993; Knudson *et al.*, 1984), i no ha pogut ser determinada en els experiments *in vitro* realitzats en aquesta tesi.

La coadministració intratumoral de 100 U de hialuronidasa i 1×10^9 vp d'ICOVIR5 en un model de melanoma va millorar l'eficàcia terapèutica de l'ICOVIR5 administrat com a monoteràpia. Brekken i col. van demostrar que l'administració de hialuronidasa intratumoral digereix l'àcid hialurònic i disminueix la pressió intersticial durant la primera hora després de la seva administració, i que aquesta es recupera durant les primeres 48 h post-injecció (Brekken and de Lange Davies 1998). En un altre treball, aquests mateixos autors demostraven que administracions periòdiques de hialuronidasa a l'interior d'un tumor disminuïen la pressió intersticial i afavorien la distribució d'anticossos monoclonals en els tumors sòlids (Brekken *et al.*, 2000b). En un treball realitzat per Bookbinder i col., l'administració subcutània de hialuronidasa incrementava la dispersió de colorants administrats intradèrmicament durant les primeres hores després de l'administració de hialuronidasa. Si els colorants s'administraven 24 h després de l'administració de hialuronidasa no s'observava una millora de la distribució (Bookbinder *et al.*, 2006). Segons aquests estudis, la millora de l'eficàcia antitumoral de l'ICOVIR5 coadministrat amb la hialuronidasa soluble observada en els nostres resultats es deu probablement a una millora en la distribució de l'ICOVIR5 en el moment de l'administració. Això podria explicar que les diferències entre el tractament amb ICOVIR5 amb o sense hialuronidasa només fossin significatives a dies curts post-administració (dies 11 i 14 p.i). Aquests resultats estan en acord amb un treball presentat recentement per Ganesh i col. En el seu treball, aquests autors demostren que l'administració de 50 U de hialuronidasa a dies alterns millora l'eficàcia terapèutica d'adenovirus oncolítics injectats intratumoralment en un model xenògraft subcutani de pròstata (PC3) i un model metastàtic de melanoma (A375-mIn1.luc). El tractament combinat de virus oncolítics i hialuronidasa va millorar la supervivència dels animals sense augmentar el potencial metastàtic dels tumors (Ganesh *et al.*, 2008).

Per altra banda, en el nostre treball, l'administració de hialuronidasa sola no va presentar activitat antitumoral, i els tumors tractats amb hialuronidasa van créixer tant o més ràpid que els tumors tractats amb PBS. Aquests resultats van en contra dels resultats presentats per Shuster i col., segons els quals l'administració de 300 U de hialuronidasa via retro-orbital en tumors ortotòpics de mama xenògrafts en ratolins disminuïa el volum tumoral en un 50% en quatre dies (Shuster *et al.*, 2002). En l'embrió, la digestió de l'àcid hialurònic inicia programes de diferenciació, que són irreversibles. Aquests autors proposaven que el tractament de les cèl·lules tumorals amb hialuronidasa induïa un canvi irreversible en la cinètica del cicle cel·lular, semblant al que es dona en l'embrió. Per aquests autors, la hialuronidasa, a part de millorar l'eficàcia terapèutica d'altres drogues quimioterapèutiques, té activitat antitumoral per ella mateixa (Shuster

et al., 2002). En un altre treball realitzat amb cèl·lules de carcinoma de còlon de rata, la transfecció estable del cDNA de la hialuronan sintasa Has2 en les cèl·lules tumorals de colon incrementava el creixement de tumors singènics en rata, mentre que la transfecció del cDNA de la Hyal1 inhibia el creixement tumoral i augmentava les zones necròtiques, validant l'efecte antitumoral de la hialuronidasa (Jacobson *et al.*, 2002). En aquesta tesi l'eficàcia antitumoral de la hialuronidasa no s'ha pogut observar en monoteràpia. Tampoc en el treball presentat per Ganesh i col. s'observen diferències entre el creixement dels tumors injectats amb hialuronidasa sola o amb PBS (Ganesh *et al.*, 2008). Una possible explicació per l'efecte antitumoral observat per Shuster i col. podria residir en un treball presentat per Brekken i col. pel qual la pressió intersticial en tumors ortotòpics és pràcticament el doble d'alta que en tumors subcutanis de la mateixa grandària. En el treball presentat per Brekken i col., l'administració de hialuronidasa va reduir la pressió intersticial de forma similar en els dos models. En canvi, mentre els nivells d'HA dels tumors subcutanis administrats amb hialuronidasa van començar a augmentar una hora després de l'administració de hialuronidasa, la quantitat d'HA present en els tumors ortotòpics va romandre invariable (Brekken *et al.*, 2000a). Aquests resultats suggereixen que probablement els tumors ortotòpics (utilitzats per Shuster i col) són més sensibles a l'administració de hialuronidasa que els tumors subcutanis (utilitzats per Ganesh i col. i en aquesta tesi).

Els adenovirus replicatius armats amb el cDNA de la hialuronidasa PH20 expressen una proteïna soluble amb activitat hialuronidasa a pH neutre.

L'administració de dosis repetides intratumorals de hialuronidasa, com les presentades per Ganesh i col., és una aproximació difícilment aplicable a la clínica degut a que la majoria de tumors no són accessibles per una administració intratumoral. En canvi, l'administració sistèmica permet que les drogues antitumorals arribin a zones no operables i a múltiples metàstasis. En aquest treball, la inserció del gen de la hialuronidasa PH20 en el genoma d'adenovirus replicatius permet l'administració sistèmica del virus, i l'expressió de la hialuronidasa en el lloc i en el moment en que es dona la replicació viral.

L'expressió de la hialuronidasa soluble es va obtenir mitjançant el clonatge del cDNA de la hialuronidasa PH20 amb la delecció de la seqüència que codifica per la cua d'anclatge a la membrana citoplasmàtica. Aquesta estratègia també ha estat utilitzada per l'empresa *Halozyme therapeutics* per la preparació de la forma comercial soluble de la hialuronidasa recombinant humana de testicles (rHuPH20) (Bookbinder *et al.*, 2006). En aquesta tesi, l'anàlisi de l'activitat hialuronidasa dels sobrenadants de cèl·lules infectades amb adenovirus recombinants que expressen la hialuronidasa PH20 indiquen que la delecció de la cua d'anclatge a la membrana citoplasmàtica permet l'obtenció d'una hialuronidasa soluble amb activitat enzimàtica a pH

neutre. Aquests resultats són especialment rellevants degut a que totes les hialuronidases humanes solubles, incloent la forma soluble de la hialuronidasa PH20 de l'esperma humà, presenten activitat enzimàtica a pH àcid (entre 3 i 4).

L'expressió de la hialuronidasa PH20 per adenovirus replicatius augmenta la citotoxicitat *in vitro* en una de les quatre de línies cel·lulars analitzades.

En aquesta tesi els adenovirus replicatius armats amb la hialuronidasa PH20 no van presentar una citotoxicitat augmentada respecte els mateixos adenovirus no armats en la majoria de les línies tumorals testades, incloent les cèl·lules PC3 i les SKMel28, productores d'elevades concentracions d'HA. En canvi, en les cèl·lules A549 les IC50 dels adenovirus AdwtRGD-PH20 i ICOVIR17 van ser entre 8 i 12 vegades inferiors a les dels adenovirus control, AdwtRGD i ICOVIR15. *In vitro*, els adenovirus oncolítics infecten eficientment les cèl·lules tumorals disposades en monocapes. En aquestes condicions, l'expressió de la hialuronidasa no aporta cap avantatge en la distribució dels adenovirus, explicant els resultats obtinguts en les SKMel28, les PC3 i les NP18. Per altra banda, diferents estudis demostren que l'expressió de hialuronidases *in vitro* induïx apoptosi en diferents tipus cel·lulars, tot i que el mecanisme pel qual s'indueix aquesta apoptosi no està clar del tot. En un treball presentat per Chang i col. el tractament de fibroblastes murins amb hialuronidasa testicular bovina augmentava la citotoxicitat induïda pel factor de necrosi tumoral (TNF), mitjançant la sobreexpressió de la proteïna proapoptòtica WOX1 i l'activació perllongada de NFκB (Chang *et al.*, 2001). La inducció de l'apoptosi per la proteïna WOX1 és independent de p53, i es basa en l'activació de WOX1 per fosforilació (WOX1^P-Tyr33), la translocació de WOX1 a la mitocòndria i la down-regulació de les proteïnes apoptòtiques Bcl2 i Bclx_L (Chang *et al.*, 2003). En un treball més recent Lokeshwar i col. van generar clons de cèl·lules tumorals de pròstata que expressaven diferents nivells de Hyal1 i van observar que les cèl·lules que expressen majors nivells de Hyal1 moren per inducció de l'apoptosi (Lokeshwar *et al.*, 2005). Segons aquests autors, en l'apoptosi induïda per Hyal1 hi ha un augment de la permeabilitat de les membranes mitocondrials, probablement mediat per l'activació de WOX1. És possible, doncs, que l'augment de citotoxicitat observat en les A549 es degui a una inducció de l'apoptosi provocada per l'expressió de la hialuronidasa PH20. Segons l'estudi presentat per Lokeshwar, la inducció de l'apoptosi seria dependent de la concentració de hialuronidasa. Concentracions elevades de hialuronidasa inhibeixen la progressió tumoral mitjançant la inducció de l'apoptosi, mentre que concentracions baixes, l'estimulen. Les A549 són unes cèl·lules molt permissives a la infecció i replicació viral *in vitro*, i per tant és possible que a les dosis utilitzades per a la determinació de la IC50 (dosis baixes) estiguin expressant les concentracions de PH20 necessàries per a la inducció de l'apoptosi. En canvi, altres cèl·lules,

com les NP18 i les SKMel28, que són menys permissives a la replicació viral, podrien estar expressant nivells inferiors de hialuronidasa, no suficients per induir l'apoptosi.

L'expressió de hialuronidasa en els adenovirus replicatius armats augmenta la dispersió dels adenovirus pel tumor i augmenta la seva eficàcia terapèutica.

Els adenovirus replicatius que expressen la hialuronidasa PH20 generats en aquesta tesi han presentat una elevada eficàcia terapèutica *in vivo*. La injecció intratumoral d'AdwtRGD-PH20 en tumors d'SKMel28 va induir la regressió parcial del 100% dels tumors tractats. L'administració d'ICOVIR17 intratumoral o sistèmica va induir més d'un 90% d'inhibició del creixement respecte el grup no tractat en tots els models analitzats. L'anàlisi de la dispersió del virus pel tumor va revelar una millora de la distribució espacial dels adenovirus que expressen la hialuronidasa PH20 respecte els adenovirus control. Aquests resultats demostren que la degradació de la matriu extracel·lular mitjançant l'expressió de hialuronidases és un mètode efectiu per millorar la distribució del virus per la massa tumoral i incrementar-ne l'eficàcia terapèutica. Durant el transcurs d'aquesta tesi, Kim i col. van generar un adenovirus replicatiu que expressava relaxina, un enzim que disminueix la quantitat de col·lagen de la matriu extracel·lular (Kim *et al.*, 2006). En el seu treball demostraven que la degradació de la matriu extracel·lular augmentava la distribució de vectors adenovirals pel tumor, i que l'expressió de relaxina per adenovirus replicatius inhibia el creixement tumoral i les metàstasis i incrementava la supervivència del ratolí. Els resultats presentats en aquest treball són difícils de comparar amb els nostres, degut a les diferències existents en els adenovirus utilitzats (delecions de la regió E1b i E3), les diferències en les dosis utilitzades (75 vegades superiors a les nostres, per injecció intratumoral) i en els models tumorals utilitzats. La relaxina és una hormona peptídica que disminueix la síntesi de col·lagen i augmenta l'expressió de metaloproteïnases i procol·lagenases. Una possible avantatge de la hialuronidasa sobre la relaxina la trobaríem en un treball presentat per Bookbinder i col. (Bookbinder *et al.*, 2006). Segons aquests autors, la hialuronidasa PH20 només millora la difusió d'agents amb grandàries inferiors als 200 nm, incloent les proteïnes d'alt pes molecular, els anticossos monoclonals i els adenovirus. En canvi, la difusió d'altres agents amb grandàries superiors als 200 nm, com les cèl·lules tumorals, no es veu afavorida degut a què les fibres de col·làgen impedeixen la seva difusió. Tot i que en el seu estudi Kim i col. no veuen un augment en el número de metàstasis, aquest efecte es pot deure a la reducció de la grandària dels tumors, i per tant els autors no poden concloure que l'expressió de relaxina no augmenti les metàstasis tumorals. La hialuronidasa PH20 ha estat administrada en diferents estudis preclínics en ratolins i clínics en humans, i no ha estat mai relacionada amb l'aparició de metàstasis (Ganesh *et al.*, 2008; Klocker *et al.*, 1995; Shuster *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 1997; Spruss *et al.*, 1995). A més, la hialuronidasa PH20 ha estat utilitzada en la clínica durant més de 50 anys sense que es

detectessin efectes secundaris greus. Per altra banda, diferents estudis han demostrat que l'expressió de hialuronidasa pot presentar efecte antitumoral per ella mateixa (Ganesh *et al.*, 2008; Jacobson *et al.*, 2002). La baixa toxicitat de la hialuronidasa, junt amb la seva elevada eficàcia, validen la seva expressió en adenovirus oncolítics, i el seu possible ús pel tractament de pacients amb càncer.

L'expressió de la hialuronidasa PH20 per l'ICOVIR17 no incrementa l'angiogenesi en tumors de melanoma.

Diferents estudis han demostrat que els productes de degradació de l'HA estimulen la proliferació de les cèl·lules endotelials mitjançant la unió als receptors RHAMM i l'activació de la via de la MAP quinasa (Lokeshwar and Selzer 2000). La presència de fragments d'HA angiogènics s'ha detectat en tumors que sobreexpressen HA i Hyal1 (Lokeshwar *et al.*, 2001; Lokeshwar *et al.*, 1998).

En aquest treball no s'ha detectat un augment del número de vasos per àrea de tumor viable, ni tampoc un augment en la grandària d'aquests vasos. Tot i que no s'han trobat diferències significatives entre grups, els tumors tractats amb ICOVIR17, que expressa la hialuronidasa, han presentat una menor irrigació que els tumors tractats amb ICOVIR15 o PBS. Una possible explicació és que els tumors tractats amb ICOVIR17 tinguin menys vasos perquè són més petits, com a conseqüència de l'elevada eficàcia terapèutica de l'ICOVIR17 en el model de melanoma. Per una altra banda, s'ha demostrat que la grandària dels fragments d'HA determina la seva capacitat angiogènica. Fragments de 4-25 unitats de disacàrids són angiogènics i augmenten la invasió tumoral (Fujisaki *et al.*, 1999; Lokeshwar *et al.*, 1997), fragments de 3-12 disacàrids inhibeixen la proliferació cel·lular de cèl·lules de melanoma *in vitro* i tumors subcutanis implantats *in vivo* (Zeng *et al.*, 1998). Fragments encara més petits, de 6-7 sacàrids, inhibeixen el creixement de diferents tipus tumorals (Stern *et al.*, 2006). La Hyal1 és la hialuronidasa principal sobreexpressada en tumors. Degut a què aquesta hialuronidasa és activa a pH àcid (3-4), la formació de fragments angiogènics de 4-25 unitats de disacàrids podria associar-se a una digestió incompleta de la l'HA a un pH no òptim per l'activitat hialuronidasa de la Hyal. Per altra banda, és possible que l'expressió de la hialuronidasa PH20 per l'ICOVIR15 doni lloc a fragments més petits amb activitat antitumoral. Per tal d'excloure la possibilitat que els fragments d'HA induïts per l'expressió de la PH20 per l'ICOVIR17 siguin proangiogènics, caldria una anàlisi més exhaustiva en diferents tipus tumorals.

4. GALV o PH20?

Tant l'ICOVIR16 (GALV) com l'ICOVIR17 (PH20) semblen bons candidats per ser utilitzats pel tractament de tumors malignes en pacients. Tot i així, l'elevat cost que suposa la preparació d'un assaig clínic, tant en temps com en diners, fa necessari escollir quin dels dos virus pot ser el millor candidat per entrar a la clínica.

En la majoria d'experiments *in vivo* realitzats en aquesta tesi, l'ICOVIR16 i l'ICOVIR17 s'han administrat en paral·lel, i per tant els resultats obtinguts per aquests dos virus són comparables. Per tal de facilitar la comparació entre els dos virus, en la figura 1 es mostren els tres experiments *in vivo* realitzats amb l'ICOVIR15, l'ICOVIR16 i l'ICOVIR17.

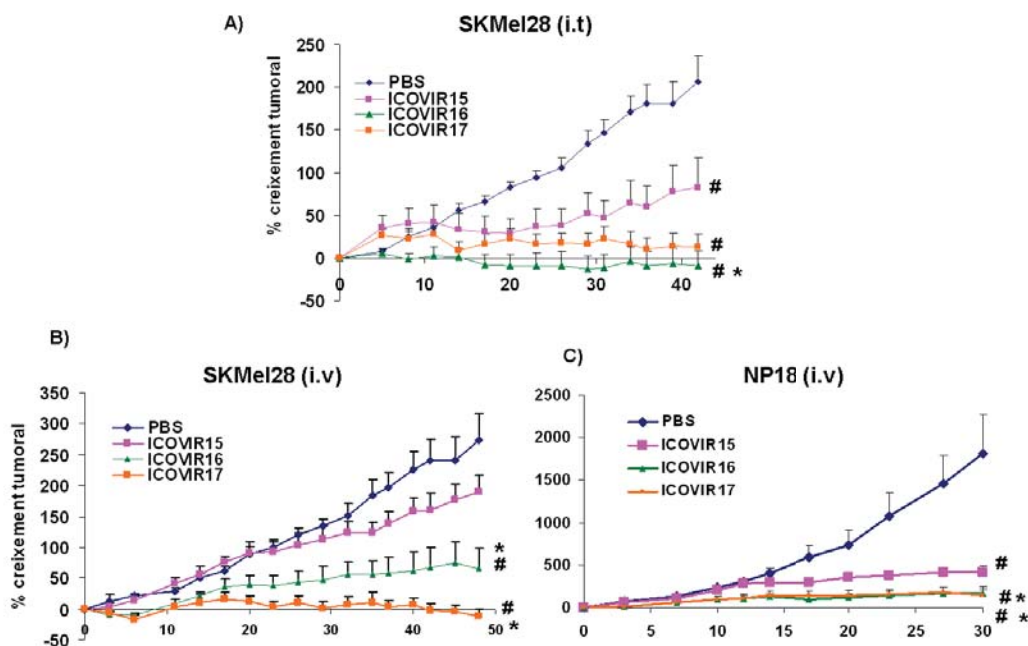


Figura 1. Eficàcia antitumoral dels adenovirus ICovir15, ICovir16 i ICovir17. # $p \leq 0.05$, significativament diferent al grup injectat amb PBS. * $p \leq 0.05$, significativament diferent al grup injectat amb ICovir15.

En el model de melanoma, l'administració intratumoral d'ICOVIR16 va controlar el creixement tumoral més eficientment que l'administració d'ICOVIR17. En el mateix model, quan els virus es van administrar sistèmicament, l'expressió de PH20 va ser més beneficiosa que l'expressió de GALV. En el model de NP18, les corbes de creixement dels grups injectats amb ICovir16 i ICovir17 van ser pràcticament idèntiques. Així doncs, si ens basem en els resultats obtinguts en els experiments realitzats *in vivo* en el transcurs d'aquesta tesi, escollir entre GALV o PH20 es planteja difícil.

Un possible factor que pot decantar la balança cap a un cantó o cap a l'altre és la possible toxicitat associada a l'expressió dels transgens per part dels adenovirus oncolítics. La determinació de la toxicitat de les proteïnes GALV i PH20 expressades per adenovirus oncolítics en ratolins immunocompetents és difícil, degut a que aquestes proteïnes s'expressen durant la fase tardana de la replicació viral. En les cèl·lules hepàtiques murines, on els adenovirus són incapaços de replicar-se, l'expressió de les proteïnes tardanes, com la GALV o la PH20 probablement no es durà a terme. A més, en cas que la proteïna GALV s'arribés a expressar en les cèl·lules hepàtiques murines, la toxicitat associada a la formació de sincitis no es podria determinar per la manca de receptors per la glicoproteïna GALV en les cèl·lules d'origen murí.

En el fetge humà, l'expressió dels transgens sota el control del promotor principal tardà dependrà del grau de selectivitat de l'adenovirus oncolíctic. De totes maneres, l'experiència clínica amb la hialuronidasa PH20 ens indica que, en cas que la proteïna s'arribés a expressar en el fetge humà, probablement els efectes secundaris serien mínims, acreditant el possible ús de l'ICOVIR17 per a l'administració sistèmica. En canvi, la glicoproteïna GALV és una proteïna viral, tòxica per les cèl·lules humanes que expressen el receptor Pit1, i altament immunogènica, tant pel seu origen viral com pel tipus de mort que indueix. En cas que l'ICOVIR16 no fos suficientment selectiu en el fetge humà, la reacció immunològica induïda per l'expressió de la glicoproteïna GALV en el fetge, juntament amb l'activació de la resposta innata induïda per les càpsides virals injectades sistèmicament, podria resultar en una reacció inflamatòria massa tòxica pel seu ús en humans. Una possibilitat per evitar aquesta inflamació és que l'increment de l'eficàcia terapèutica aconseguit per l'expressió de la glicoproteïna GALV, degut a la seva alta citotoxicitat, l'efecte adjacent i la capacitat immunoestimuladora, permeti injectar dosis inferiors de virus que siguin menys tòxiques pel fetge. Una segona possibilitat seria disminuir la infectivitat dels adenovirus oncolítics a fetge mitjançant la modificació de les proteïnes de la càpsida viral. En aquest sentit, s'ha demostrat que l'eliminació de les interaccions de l'adenovirus amb els factors en sang disminueix l'entrada del virus als hepatòcits, tot i que l'entrada del virus al tumor també es veu afectada (Gimenez-Alejandre *et al.*, 2008). Caldrà, doncs, que l'eliminació dels llocs d'unió de l'adenovirus als factors en sang es combini amb la incorporació de lligands d'alta afinitat per a les cèl·lules tumorals. Finalment, una altra possibilitat seria l'avaluació de l'ús de l'ICOVIR16 per injecció intratumoral en pacients.

En aquesta tesi es va comparar la toxicitat de l'ICOVIR8dE4 respecte l'ICOVIR5, i de l'ICOVIR17 respecte l'ICOVIR15 cinc dies després de l'administració sistèmica de 5×10^{10} vp de virus en ratolins immunocompetents (aquests resultats no es mostren). En cap cas, la inserció del gen de la hialuronidasa va incrementar la toxicitat hepàtica dels adenovirus oncolítics, sent la toxicitat induïda per l'ICOVIR8dE4 molt similar a la toxicitat induïda per l'ICOVIR5; i la toxicitat

induïda per l'ICOVIR17 molt similar a la induïda per l'ICOVIR15. Tot i així, degut a que no es va analitzar si hi havia expressió de la hialuronidasa PH20 a fetge, no podem concloure que l'expressió de la hialuronidasa PH20 no augmenti la toxicitat dels adenovirus oncolítics. Les diferències en la toxicitat dels adenovirus ICOVIR5 i ICOVIR15 no s'han analitzat en aquest treball degut a que aquest anàlisi forma part d'una altra tesi doctoral duta a terme per l'estudiant de doctorat Juanjo Rojas.

Un altre factor clau que ens pot fer decidir entre un virus o l'altre és l'eficàcia terapèutica. L'expressió de la hialuronidasa és una estratègia purament viroterapèutica, on l'expressió del transgèn augmenta la distribució del virus, però és el virus el que matarà la cèl·lula tumoral. Una possible avantatge d'aquesta estratègia es troba en la combinació del virus amb els agents quimioterapèutics convencionals. La combinació de virus oncolítics amb quimioteràpia ha mostrat sinergisme en diferents assajos clínics sense un augment significatiu de la toxicitat (Khuri *et al.*, 2000; Lamont *et al.*, 2000). A més, l'administració de hialuronidasa ha demostrat augmentar l'eficàcia de diferents drogues quimioteràpiques en diversos assajos clínics (Civalleri *et al.*, 1997; Klocker *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 1997; Spruss *et al.*, 1995). Aquests resultats suggereixen que l'elevada citotoxicitat de l'ICOVIR17 en monoteràpia, combinat amb l'increment de l'eficàcia terapèutica de les drogues quimioterapèutiques induïda per la degradació de la matriu extracel·lular i la disminució la pressió intersticial, pot resultar en una activitat terapèutica eficaç.

Per altra banda, l'expressió de la glicoproteïna GALV és una estratègia més immunoterapèutica. En aquesta tesi, l'expressió de la glicoproteïna GALV per part d'adenovirus replicatius ha demostrat ser altament citotòxica per les cèl·lules tumorals tant *in vitro* com *in vivo*. Tot i així, en aquest treball no hem pogut analitzar els possibles efectes terapèutics deguts a l'estimulació d'una resposta immunitària antitumoral induïda per la mort sinciti. Diferents estudis preclínics han demostrat que la immunoestimulació pot potenciar la teràpia d'adenovirus oncolítics. Tot i així, l'efecte que la immunoestimulació pot tenir en la clínica no està clar del tot. Per un cantó, els immunocèntrics creuen que el sistema immunitari és un aliat del virus. La resposta inflamatòria que el virus indueix en el tumor, juntament amb la mort del sinciti, podria trencar la intensa immunosupressió que presenten els tumors i generar una resposta immunitària contra els antígens tumorals, capaç d'eliminar els diferents foci tumorals disseminats per l'organisme. Per altra banda, els virocèntrics veuen el sistema immunitari com un enemic. Segons els virocèntrics, els virus són altment immunogènics, i per tant l'activació del sistema immunitari induirà una resposta antiviral més que una resposta antitumoral. Una possible estratègia per potenciar la resposta immunitària contra el tumor, és la inserció d'epítops tumorals en les proteïnes de la càpsida viral. La inserció d'epítops tumorals en l'ICOVIR16 podria resultar

en un adenovirus oncolític fusogènic altament citotòxic, capaç d'induir una potent resposta immunitària contra el tumor.

Tot i que l'ICOVIR16 presenta un gran potencial com a possible agent terapèutic per la teràpia del càncer, el possible augment de la toxicitat induït per l'expressió de la glicoproteïna GALV al fetge, junt amb els dubtes que genera l'activació de la resposta immunitària, decanten la balança cap a l'ús de l'ICOVIR17 com a nou agent terapèutic pel tractament del càncer.

Conclusions

1. La inserció del cDNA de glicoproteïnes fusogèniques de membrana (FMG) o de hialuronidasa darrera el gen de la fibra adenoviral d'adenovirus replicatius permet l'expressió del transgèn durant la fase tardana de la replicació viral i no interfereix en la replicació normal de l'adenovirus.
2. La deleció dels ORF1,2,3 o dels ORF1,2 de la regió E4 en l'adenovirus salvatge no afecta ni la replicació ni la citotoxicitat dels virus. En canvi, la incorporació d'aquestes deleccions en adenovirus oncolítics armats, amb un genoma llarg i un transgèn insertat darrera la fibra, empitjora l'eficàcia d'encapsidació i disminueix la producció viral.
3. El genoma de l'ICOVIR5 no és un bon entorn pel clonatge de transgens degut a que requereix la delecció de gens virals que poden ser necessaris per una replicació viral eficient. En canvi, la inserció de transgens en el genoma de l'ICOVIR15 ha permès la generació efectiva d'adenovirus oncolítics armats sense la necessitat de deleccionar gens adenovirals.
4. L'expressió de la proteïna F de la soca W3A del paramixovirus SV5 per un adenovirus replicatiu presenta una baixa capacitat fusogènica i no augmenta la citotoxicitat de l'adenovirus. En canvi, l'expressió de la glicoproteïna GALV ha demostrat una elevada capacitat fusogènica i ha augmentat la citotoxicitat de tots els adenovirus replicatius fusogènics generats.
5. L'adenovirus oncolític fusogènic ICOVIR16, que expressa la glicoproteïna GALV, ha demostrat una elevada eficàcia terapèutica en diferents models tumorals xenògrafts en ratolins, tan per administració intratumoral, com per administració sistèmica, i és un clar candidat per ser avaluat en la clínica.
6. La coadministració de hialuronidasa soluble millora la distribució intratumoral de l'adenovirus oncolític ICOVIR5 i augmenta l'eficàcia terapèutica respecte l'administració del virus en monoteràpia.
7. L'expressió de la hialuronidasa testicular humana PH20 per un adenovirus replicatiu no augmenta la citotoxicitat *in vitro* en la majoria de línies tumorals testades, però en millora l'activitat antitumoral *in vivo*.
8. L'adenovirus oncolític ICOVIR17, que expressa la hialuronidasa humana PH20, es distribueix més eficientment per la massa tumoral que l'adenovirus control, l'ICOVIR15, i presenta una elevada eficàcia antitumoral en tots els models tumorals xenògrafts analitzats. L'ICOVIR17 és un ferm candidat per ser avaluat en estudis clínics en pacients.

Bibliografia

- ADACHI Y, REYNOLDS PN, YAMAMOTO M, WANG M, TAKAYAMA K, MATSUBARA S, MURAMATSU T, CURIEL DT. (2001). A midkine promoter-based conditionally replicative adenovirus for treatment of pediatric solid tumors and bone marrow tumor purging. *Cancer Res* 61,7882-8.
- ADAMIA S, MAXWELL CA, PILARSKI LM. (2005). Hyaluronan and hyaluronan synthases: potential therapeutic targets in cancer. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord* 5,3-14.
- AHMED A, JEVREMOVIC D, SUZUKI K, KOTTKE T, THOMPSON J, EMERY S, HARRINGTON K, BATEMAN A, VILE R. (2003). Intratumoral expression of a fusogenic membrane glycoprotein enhances the efficacy of replicating adenovirus therapy. *Gene Ther* 10,1663-71.
- AKBULUT H, ZHANG L, TANG Y, DEISSEROTH A. (2003). Cytotoxic effect of replication-competent adenoviral vectors carrying L-plastin promoter regulated E1A and cytosine deaminase genes in cancers of the breast, ovary and colon. *Cancer Gene Ther* 10,388-95.
- ALEMANY R. (2007). Cancer selective adenoviruses. *Mol Aspects Med* 28,42-58.
- ALEMANY R, BALAGUE C, CURIEL DT. (2000). Replicative adenoviruses for cancer therapy. *Nat Biotechnol* 18,723-7.
- ARAKAWA S, JR., HAMAMI G, UMEZU K, KAMIDONO S, ISHIGAMI J, ARAKAWA S. (1987). Clinical trial of attenuated vaccinia virus AS strain in the treatment of advanced adenocarcinoma. Report on two cases. *J Cancer Res Clin Oncol* 113,95-8.
- ASADA T. (1974). Treatment of human cancer with mumps virus. *Cancer* 34,1907-28.
- ASPLUND T, VERSNEL MA, LAURENT TC, HELDIN P. (1993). Human mesothelioma cells produce factors that stimulate the production of hyaluronan by mesothelial cells and fibroblasts. *Cancer Res* 53,388-92.
- AUVINEN P, TAMMI R, PARKKINEN J, TAMMI M, AGREN U, JOHANSSON R, HIRVIKOSKI P, ESKELINEN M, KOSMA VM. (2000). Hyaluronan in peritumoral stroma and malignant cells associates with breast cancer spreading and predicts survival. *Am J Pathol* 156,529-36.
- BABISS LE, GINSBERG HS, DARNELL JE, JR. (1985). Adenovirus E1B proteins are required for accumulation of late viral mRNA and for effects on cellular mRNA translation and transport. *Mol Cell Biol* 5,2552-8.
- BASU S, BINDER RJ, SUTO R, ANDERSON KM, SRIVASTAVA PK. (2000). Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF-kappa B pathway. *Int Immunol* 12,1539-46.
- BATEMAN A, BULLOUGH F, MURPHY S, EMILIUSEN L, LAVILLETTE D, COSSET FL, CATTANEO R, RUSSELL SJ, VILE RG. (2000). Fusogenic membrane glycoproteins as a novel class of genes for the local and immune-mediated control of tumor growth. *Cancer Res* 60,1492-7.
- BATEMAN AR, HARRINGTON KJ, KOTTKE T, AHMED A, MELCHER AA, GOUGH MJ, LINARDAKIS E, RIDDLE D, DIETZ A, LOHSE CM and others. (2002). Viral fusogenic membrane glycoproteins kill solid tumor cells by nonapoptotic mechanisms that promote cross presentation of tumor antigens by dendritic cells. *Cancer Res* 62,6566-78.
- BAUERSCHMITZ GJ, LAM JT, KANERVA A, SUZUKI K, NETTELBECK DM, DMITRIEV I, KRASNYKH V, MIKHEEVA GV, BARNES MN, ALVAREZ RD and others. (2002). Treatment of ovarian cancer with a tropism modified oncolytic adenovirus. *Cancer Res* 62,1266-70.
- BAUMGARTNER G, GOMAR-HOSS C, SAKR L, ULSPERGER E, WOGRITSCH C. (1998). The impact of extracellular matrix on the chemoresistance of solid tumors--experimental and clinical results of hyaluronidase as additive to cytostatic chemotherapy. *Cancer Lett* 131,85-99.
- BAUZON M, CASTRO D, KARR M, HAWKINS LK, HERMISTON TW. (2003). Multigene expression from a replicating adenovirus using native viral promoters. *Mol Ther* 7,526-34.
- BECKENLEHNER K, BANNKE S, SPRUSS T, BERNHARDT G, SCHONENBERG H, SCHIESS W. (1992). Hyaluronidase enhances the activity of adriamycin in breast cancer models in vitro and in vivo. *J Cancer Res Clin Oncol* 118,591-6.

- BERTRAND P, GIRARD N, DELPECH B, DUVAL C, D'ANJOU J, DAUCE JP. (1992). Hyaluronan (hyaluronic acid) and hyaluronectin in the extracellular matrix of human breast carcinomas: comparison between invasive and non-invasive areas. *Int J Cancer* 52,1-6.
- BETT AJ, PREVEC L, GRAHAM FL. (1993). Packaging capacity and stability of human adenovirus type 5 vectors. *J Virol* 67,5911-21.
- BIERMAN HR, CRILE DM, DOD KS, KELLY KH, PETRAKIS NL, WHITE LP, SHIMKIN MB. (1953). Remissions in leukemia of childhood following acute infectious disease: staphylococcus and streptococcus, varicella, and feline panleukopenia. *Cancer* 6,591-605.
- BIRNBOIM HC, DOLY J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7,1513-23.
- BISCHOFF JR, KIRN DH, WILLIAMS A, HEISE C, HORN S, MUNA M, NG L, NYE JA, SAMPSON-JOHANNES A, FATTAEY A and others. (1996). An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells. *Science* 274,373-6.
- BLUMING AZ, ZIEGLER JL. (1971). Regression of Burkitt's lymphoma in association with measles infection. *Lancet* 2,105-6.
- BOOKBINDER LH, HOFER A, HALLER MF, ZEPEDA ML, KELLER GA, LIM JE, EDGINGTON TS, SHEPARD HM, PATTON JS, FROST GI. (2006). A recombinant human enzyme for enhanced interstitial transport of therapeutics. *J Control Release* 114,230-41.
- BOURGUIGNON LY, ZHU H, ZHOU B, DIEDRICH F, SINGLETON PA, HUNG MC. (2001). Hyaluronan promotes CD44v3-Vav2 interaction with Grb2-p185(HER2) and induces Rac1 and Ras signaling during ovarian tumor cell migration and growth. *J Biol Chem* 276,48679-92.
- BRANTON PE, ROOPCHAND DE. (2001). The role of adenovirus E4orf4 protein in viral replication and cell killing. *Oncogene* 20,7855-65.
- BREKKEN C, BRULAND OS, DE LANGE DAVIES C. (2000a). Interstitial fluid pressure in human osteosarcoma xenografts: significance of implantation site and the response to intratumoral injection of hyaluronidase. *Anticancer Res* 20,3503-12.
- BREKKEN C, DE LANGE DAVIES C. (1998). Hyaluronidase reduces the interstitial fluid pressure in solid tumours in a non-linear concentration-dependent manner. *Cancer Lett* 131,65-70.
- BREKKEN C, HJELSTUEN MH, BRULAND OS, DE LANGE DAVIES C. (2000b). Hyaluronidase-induced periodic modulation of the interstitial fluid pressure increases selective antibody uptake in human osteosarcoma xenografts. *Anticancer Res* 20,3513-9.
- BRIDGE E, KETNER G. (1989). Redundant control of adenovirus late gene expression by early region 4. *J Virol* 63,631-8.
- BRIDGE E, KETNER G. (1990). Interaction of adenoviral E4 and E1b products in late gene expression. *Virology* 174,345-53.
- BRISTOL JA, ZHU M, JI H, MINA M, XIE Y, CLARKE L, FORRY-SCHAUDIES S, ENNIST DL. (2003). In vitro and in vivo activities of an oncolytic adenoviral vector designed to express GM-CSF. *Mol Ther* 7,755-64.
- BRUNORI M, MALERBA M, KASHIWAZAKI H, IGGO R. (2001). Replicating adenoviruses that target tumors with constitutive activation of the wnt signaling pathway. *J Virol* 75,2857-65.
- CALABRO A, OKEN MM, HASCALL VC, MASELLIS AM. (2002). Characterization of hyaluronan synthase expression and hyaluronan synthesis in bone marrow mesenchymal progenitor cells: predominant expression of HAS1 mRNA and up-regulated hyaluronan synthesis in bone marrow cells derived from multiple myeloma patients. *Blood* 100,2578-85.
- CARETTE JE, GRAAT HC, SCHAGEN FH, ABOU EL HASSAN MA, GERRITSEN WR, VAN BEUSECHEM VW. (2005). Replication-dependent transgene expression from a conditionally replicating adenovirus via alternative splicing to a heterologous splice-acceptor site. *J Gene Med* 7,1053-62.
- CASCALLO M, ALONSO MM, ROJAS JJ, PEREZ-GIMENEZ A, FUEYO J, ALEMANY R. (2007). Systemic toxicity-efficacy profile of ICOVIR-5, a potent and selective oncolytic adenovirus based on the pRB pathway. *Mol Ther* 15,1607-15.
- CASCANTE A, ABATE-DAGA D, GARCIA-RODRIGUEZ L, GONZALEZ JR, ALEMANY R, FILLAT C. (2007). GCV modulates the antitumoural efficacy of a replicative adenovirus expressing the Tat8-TK as a late gene in a pancreatic tumour model. *Gene Ther* 14,1471-80.

- CIVALLERI D, ESPOSITO M, DE CIAN F, BALLETO N, VANNOZZI MO, MONDINI G, CARRABETTA S, BOCCHIO MM. (1997). [Effects of adjuvant hyaluronidase in tumors refractory to chemotherapy. Review of the literature and pharmacokinetics of cisplatin after regional administration in animals and humans]. *G Chir* 18,175-81.
- CROIX BS, RAK JW, KAPITAIN S, SHEEHAN C, GRAHAM CH, KERBEL RS. (1996). Reversal by hyaluronidase of adhesion-dependent multicellular drug resistance in mammary carcinoma cells. *J Natl Cancer Inst* 88,1285-96.
- CSATARY LK. (1971). Viruses in the treatment of cancer. *Lancet* 2,825.
- CSOKA AB, FROST GI, STERN R. (2001). The six hyaluronidase-like genes in the human and mouse genomes. *Matrix Biol* 20,499-508.
- CUEVAS Y, HERNANDEZ-ALCOCEBA R, ARAGONES J, NARANJO-SUAREZ S, CASTELLANOS MC, ESTEBAN MA, MARTIN-PUIG S, LANDAZURI MO, DEL PESO L. (2003). Specific oncolytic effect of a new hypoxia-inducible factor-dependent replicative adenovirus on von Hippel-Lindau-defective renal cell carcinomas. *Cancer Res* 63,6877-84.
- CHANG NS, DOHERTY J, ENSIGN A, LEWIS J, HEATH J, SCHULTZ L, CHEN ST, OPPERMANN U. (2003). Molecular mechanisms underlying WOX1 activation during apoptotic and stress responses. *Biochem Pharmacol* 66,1347-54.
- CHANG NS, PRATT N, HEATH J, SCHULTZ L, SLEVE D, CAREY GB, ZEVOTEK N. (2001). Hyaluronidase induction of a WW domain-containing oxidoreductase that enhances tumor necrosis factor cytotoxicity. *J Biol Chem* 276,3361-70.
- CHERR GN, YUDIN AI, OVERSTREET JW. (2001). The dual functions of GPI-anchored PH-20: hyaluronidase and intracellular signaling. *Matrix Biol* 20,515-25.
- CHOMCZYNSKI P, SACCHI N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162,156-9.
- CHU RL, POST DE, KHURI FR, VAN MEIR EG. (2004). Use of replicating oncolytic adenoviruses in combination therapy for cancer. *Clin Cancer Res* 10,5299-312.
- DEWAR RL, NATARAJAN V, VASUDEVACHARI MB, SALZMAN NP. (1989). Synthesis and processing of human immunodeficiency virus type 1 envelope proteins encoded by a recombinant human adenovirus. *J Virol* 63,129-36.
- DEWEESE TL, VAN DER POEL H, LI S, MIKHAK B, DREW R, GOEMANN M, HAMPER U, DEJONG R, DETORIE N, RODRIGUEZ R and others. (2001). A phase I trial of CV706, a replication-competent, PSA selective oncolytic adenovirus, for the treatment of locally recurrent prostate cancer following radiation therapy. *Cancer Res* 61,7464-72.
- DIAZ RM, BATEMAN A, EMILIUSEN L, FIELDING A, TRONO D, RUSSELL SJ, VILE RG. (2000). A lentiviral vector expressing a fusogenic glycoprotein for cancer gene therapy. *Gene Ther* 7,1656-63.
- DIX I, LEPPARD KN. (1995). Expression of adenovirus type 5 E4 Orf2 protein during lytic infection. *J Gen Virol* 76 (Pt 4),1051-5.
- DOUCAS V, ISHOV AM, ROMO A, JUGUILON H, WEITZMAN MD, EVANS RM, MAUL GG. (1996). Adenovirus replication is coupled with the dynamic properties of the PML nuclear structure. *Genes Dev* 10,196-207.
- DUNN WA, JR. (1994). Autophagy and related mechanisms of lysosome-mediated protein degradation. *Trends Cell Biol* 4,139-43.
- EBERT O, SHINOZAKI K, KOURNIOTI C, PARK MS, GARCIA-SASTRE A, WOO SL. (2004). Syncytia induction enhances the oncolytic potential of vesicular stomatitis virus in virotherapy for cancer. *Cancer Res* 64,3265-70.
- EDWARDS SJ, DIX BR, MYERS CJ, DOBSON-LE D, HUSCHTSCHA L, HIBMA M, ROYDS J, BRAITHWAITE AW. (2002). Evidence that replication of the antitumor adenovirus ONYX-015 is not controlled by the p53 and p14(ARF) tumor suppressor genes. *J Virol* 76,12483-90.
- EIKENES L, TARI M, TUFTO I, BRULAND OS, DE LANGE DAVIES C. (2005). Hyaluronidase induces a transcapillary pressure gradient and improves the distribution and uptake of liposomal doxorubicin (Caelyx) in human osteosarcoma xenografts. *Br J Cancer* 93,81-8.
- ERRINGTON F, BATEMAN A, KOTTKE T, THOMPSON J, HARRINGTON K, MERRICK A, HATFIELD P, SELBY P, VILE R, MELCHER A. (2006). Allogeneic tumor cells expressing

- fusogenic membrane glycoproteins as a platform for clinical cancer immunotherapy. *Clin Cancer Res* 12,1333-41.
- EVERETT RD. (2001). DNA viruses and viral proteins that interact with PML nuclear bodies. *Oncogene* 20,7266-73.
- FIELDING AK, CHAPEL-FERNANDES S, CHADWICK MP, BULLOUGH FJ, COSSET FL, RUSSELL SJ. (2000). A hyperfusogenic gibbon ape leukemia envelope glycoprotein: targeting of a cytotoxic gene by ligand display. *Hum Gene Ther* 11,817-26.
- FRANZMANN EJ, SCHROEDER GL, GOODWIN WJ, WEED DT, FISHER P, LOKESHWAR VB. (2003). Expression of tumor markers hyaluronic acid and hyaluronidase (HYAL1) in head and neck tumors. *Int J Cancer* 106,438-45.
- FREYTAG SO, KHIL M, STRICKER H, PEABODY J, MENON M, DEPERALTA-VENTURINA M, NAFZIGER D, PEGG J, PAIELLI D, BROWN S and others. (2002). Phase I study of replication-competent adenovirus-mediated double suicide gene therapy for the treatment of locally recurrent prostate cancer. *Cancer Res* 62,4968-76.
- FREYTAG SO, ROGULSKI KR, PAIELLI DL, GILBERT JD, KIM JH. (1998). A novel three-pronged approach to kill cancer cells selectively: concomitant viral, double suicide gene, and radiotherapy. *Hum Gene Ther* 9,1323-33.
- FREYTAG SO, STRICKER H, PEGG J, PAIELLI D, PRADHAN DG, PEABODY J, DEPERALTA-VENTURINA M, XIA X, BROWN S, LU M and others. (2003). Phase I study of replication-competent adenovirus-mediated double-suicide gene therapy in combination with conventional-dose three-dimensional conformal radiation therapy for the treatment of newly diagnosed, intermediate- to high-risk prostate cancer. *Cancer Res* 63,7497-506.
- FU X, TAO L, JIN A, VILE R, BRENNER MK, ZHANG X. (2003). Expression of a fusogenic membrane glycoprotein by an oncolytic herpes simplex virus potentiates the viral antitumor effect. *Mol Ther* 7,748-54.
- FUERER C, IGGO R. (2002). Adenoviruses with Tcf binding sites in multiple early promoters show enhanced selectivity for tumour cells with constitutive activation of the wnt signalling pathway. *Gene Ther* 9,270-81.
- FUERER C, IGGO R. (2004). 5-Fluorocytosine increases the toxicity of Wnt-targeting replicating adenoviruses that express cytosine deaminase as a late gene. *Gene Ther* 11,142-51.
- FUEYO J, GOMEZ-MANZANO C, ALEMANY R, LEE PS, MCDONNELL TJ, MITLIANGA P, SHI YX, LEVIN VA, YUNG WK, KYRITSIS AP. (2000). A mutant oncolytic adenovirus targeting the Rb pathway produces anti-glioma effect in vivo. *Oncogene* 19,2-12.
- FUJISAKI T, TANAKA Y, FUJII K, MINE S, SAITO K, YAMADA S, YAMASHITA U, IRIMURA T, ETO S. (1999). CD44 stimulation induces integrin-mediated adhesion of colon cancer cell lines to endothelial cells by up-regulation of integrins and c-Met and activation of integrins. *Cancer Res* 59,4427-34.
- GALLUCCI S, LOLKEMA M, MATZINGER P. (1999). Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells. *Nat Med* 5,1249-55.
- GANESH S, GONZALEZ-EDICK M, GIBBONS D, VAN ROEY M, JOOSS K. (2008). Intratumoral coadministration of hyaluronidase enzyme and oncolytic adenoviruses enhances virus potency in metastatic tumor models. *Clin Cancer Res* 14,3933-41.
- GANLY I, KIRN D, ECKHARDT G, RODRIGUEZ GI, SOUTAR DS, OTTO R, ROBERTSON AG, PARK O, GULLEY ML, HEISE C and others. (2000). A phase I study of Onyx-015, an E1B attenuated adenovirus, administered intratumorally to patients with recurrent head and neck cancer. *Clin Cancer Res* 6,798-806.
- GARBER K. (2006). China approves world's first oncolytic virus therapy for cancer treatment. *J Natl Cancer Inst* 98,298-300.
- GARCIA-CASTRO J, MARTINEZ-PALACIO J, LILLO R, GARCIA-SANCHEZ F, ALEMANY R, MADERO L, BUEREN JA, RAMIREZ M. (2005). Tumor cells as cellular vehicles to deliver gene therapies to metastatic tumors. *Cancer Gene Ther* 12,341-9.
- GEOERGER B, VAN BEUSECHEM VW, OPOLON P, MORIZET J, LAUDANI L, LECLUSE Y, BARROIS M, IDEMA S, GRILL J, GERRITSEN WR and others. (2005). Expression of p53, or targeting towards EGFR, enhances the oncolytic potency of conditionally replicative adenovirus against neuroblastoma. *J Gene Med* 7,584-94.

- GEOERGER B, VASSAL G, OPOLON P, DIRVEN CM, MORIZET J, LAUDANI L, GRILL J, GIACCONE G, VANDERTOP WP, GERRITSEN WR and others. (2004). Oncolytic activity of p53-expressing conditionally replicative adenovirus AdDelta24-p53 against human malignant glioma. *Cancer Res* 64,5753-9.
- GHOSH-CHOUDHURY G, HAJ-AHMAD Y, GRAHAM FL. (1987). Protein IX, a minor component of the human adenovirus capsid, is essential for the packaging of full length genomes. *EMBO J* 6,1733-9.
- GIETZ RD, WOODS RA. (2002). Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods Enzymol* 350,87-96.
- GIMENEZ-ALEJANDRE M, CASCALLO M, BAYO-PUXAN N, ALEMANY R. (2008). Coagulation factors determine tumor transduction in vivo. *Hum Gene Ther*.
- GIRISH KS, KEMPARAJU K. (2006). Inhibition of *Naja naja* venom hyaluronidase: role in the management of poisonous bite. *Life Sci* 78,1433-40.
- GIRISH KS, KEMPARAJU K. (2007). The magic glue hyaluronan and its eraser hyaluronidase: a biological overview. *Life Sci* 80,1921-43.
- GOMEZ-TREVINO A, CASTEL S, LOPEZ-IGLESIAS C, CORTADELLAS N, COMAS-RIU J, MERCADE E. (2003). Effects of adenovirus-mediated SV5 fusogenic glycoprotein expression on tumor cells. *J Gene Med* 5,483-92.
- GOUGH MJ, MELCHER AA, AHMED A, CRITTENDEN MR, RIDDLE DS, LINARDAKIS E, RUCHATZ AN, EMILIUSEN LM, VILE RG. (2001). Macrophages orchestrate the immune response to tumor cell death. *Cancer Res* 61,7240-7.
- GRAHAM FL. (1984). Covalently closed circles of human adenovirus DNA are infectious. *EMBO J* 3,2917-22.
- GREEN N, SHINNICK TM, WITTE O, PONTICELLI A, SUTCLIFFE JG, LERNER RA. (1981). Sequence-specific antibodies show that maturation of Moloney leukemia virus envelope polyprotein involves removal of a COOH-terminal peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78,6023-7.
- GREENTREE LB. (1983). Hodgkin's disease: therapeutic role of measles vaccine. *Am J Med* 75,928.
- HALBERT DN, CUTT JR, SHENK T. (1985). Adenovirus early region 4 encodes functions required for efficient DNA replication, late gene expression, and host cell shutoff. *J Virol* 56,250-7.
- HALL CL, WANG C, LANGE LA, TURLEY EA. (1994). Hyaluronan and the hyaluronan receptor RHAMM promote focal adhesion turnover and transient tyrosine kinase activity. *J Cell Biol* 126,575-88.
- HALLENBECK PL, CHANG YN, HAY C, GOLIGHTLY D, STEWART D, LIN J, PHIPPS S, CHIANG YL. (1999). A novel tumor-specific replication-restricted adenoviral vector for gene therapy of hepatocellular carcinoma. *Hum Gene Ther* 10,1721-33.
- HANSEN RM, LIBNOCH JA. (1978). Remission of chronic lymphocytic leukemia after smallpox vaccination. *Arch Intern Med* 138,1137-8.
- HARADA JN, BERK AJ. (1999). p53-Independent and -dependent requirements for E1B-55K in adenovirus type 5 replication. *J Virol* 73,5333-44.
- HARADA JN, SHEVCHENKO A, PALLAS DC, BERK AJ. (2002). Analysis of the adenovirus E1B-55K-anchored proteome reveals its link to ubiquitination machinery. *J Virol* 76,9194-206.
- HARRISON D, SAUTHOFF H, HEITNER S, JAGIRDAR J, ROM WN, HAY JG. (2001). Wild-type adenovirus decreases tumor xenograft growth, but despite viral persistence complete tumor responses are rarely achieved--deletion of the viral E1b-19-kD gene increases the viral oncolytic effect. *Hum Gene Ther* 12,1323-32.
- HAUTMANN SH, LOKESHWAR VB, SCHROEDER GL, CIVANTOS F, DUNCAN RC, GNANN R, FRIEDRICH MG, SOLOWAY MS. (2001). Elevated tissue expression of hyaluronic acid and hyaluronidase validates the HA-HAase urine test for bladder cancer. *J Urol* 165,2068-74.
- HAWKINS LK, HERMISTON T. (2001a). Gene delivery from the E3 region of replicating human adenovirus: evaluation of the E3B region. *Gene Ther* 8,1142-8.
- HAWKINS LK, HERMISTON TW. (2001b). Gene delivery from the E3 region of replicating human adenovirus: evaluation of the ADP region. *Gene Ther* 8,1132-41.

- HAWKINS LK, JOHNSON L, BAUZON M, NYE JA, CASTRO D, KITZES GA, YOUNG MD, HOLT JK, TROWN P, HERMISTON TW. (2001). Gene delivery from the E3 region of replicating human adenovirus: evaluation of the 6.7 K/gp19 K region. *Gene Ther* 8,1123-31.
- HAYEN W, GOEBELER M, KUMAR S, RIESSEN R, NEHLS V. (1999). Hyaluronan stimulates tumor cell migration by modulating the fibrin fiber architecture. *J Cell Sci* 112 (Pt 13),2241-51.
- HEARING P, SHENK T. (1983). The adenovirus type 5 E1A transcriptional control region contains a duplicated enhancer element. *Cell* 33,695-703.
- HEISE C, HERMISTON T, JOHNSON L, BROOKS G, SAMPSON-JOHANNES A, WILLIAMS A, HAWKINS L, KIRN D. (2000). An adenovirus E1A mutant that demonstrates potent and selective systemic anti-tumoral efficacy. *Nat Med* 6,1134-9.
- HEMINWAY BR, YU Y, GALINSKI MS. (1994). Paramyxovirus mediated cell fusion requires co-expression of both the fusion and hemagglutinin-neuraminidase glycoproteins. *Virus Res* 31,1-16.
- HERNANDEZ-ALCOCEBA R, PIHALJA M, QIAN D, CLARKE MF. (2002). New oncolytic adenoviruses with hypoxia- and estrogen receptor-regulated replication. *Hum Gene Ther* 13,1737-50.
- HERNANDEZ-ALCOCEBA R, PIHALJA M, WICHA MS, CLARKE MF. (2000). A novel, conditionally replicative adenovirus for the treatment of breast cancer that allows controlled replication of E1a-deleted adenoviral vectors. *Hum Gene Ther* 11,2009-24.
- HOBARTH K, MAIER U, MARBERGER M. (1992). Topical chemoprophylaxis of superficial bladder cancer with mitomycin C and adjuvant hyaluronidase. *Eur Urol* 21,206-10.
- HORN GP, VONGPUNSAWAD S, KORNMANN E, FRITZ B, DITTMER DP, CATTANEO R, DOBBELSTEIN M. (2005). Enhanced cytotoxicity without internuclear spread of adenovirus upon cell fusion by measles virus glycoproteins. *J Virol* 79,1911-7.
- HORVATH CM, PATERSON RG, SHAUGHNESSY MA, WOOD R, LAMB RA. (1992). Biological activity of paramyxovirus fusion proteins: factors influencing formation of syncytia. *J Virol* 66,4564-9.
- HSIEH CL, YANG L, MIAO L, YEUNG F, KAO C, YANG H, ZHAU HE, CHUNG LW. (2002). A novel targeting modality to enhance adenoviral replication by vitamin D(3) in androgen-independent human prostate cancer cells and tumors. *Cancer Res* 62,3084-92.
- HU JC, COFFIN RS, DAVIS CJ, GRAHAM NJ, GROVES N, GUEST PJ, HARRINGTON KJ, JAMES ND, LOVE CA, MCNEISH I and others. (2006). A phase I study of OncoVEXGM-CSF, a second-generation oncolytic herpes simplex virus expressing granulocyte macrophage colony-stimulating factor. *Clin Cancer Res* 12,6737-47.
- HUANG XF, REN W, ROLLINS L, PITTMAN P, SHAH M, SHEN L, GU Q, STRUBE R, HU F, CHEN SY. (2003). A broadly applicable, personalized heat shock protein-mediated oncolytic tumor vaccine. *Cancer Res* 63,7321-9.
- HUEBNER RJ, ROWE WP, SCHATTEN WE, SMITH RR, THOMAS LB. (1956). Studies on the use of viruses in the treatment of carcinoma of the cervix. *Cancer* 9,1211-8.
- HUNTER E, SWANSTROM R. (1990). Retrovirus envelope glycoproteins. *Curr Top Microbiol Immunol* 157,187-253.
- HUNTER-CRAIG I, NEWTON KA, WESTBURY G, LACEY BW. (1970). Use of vaccinia virus in the treatment of metastatic malignant melanoma. *Br Med J* 2,512-5.
- IKEGAMI-KAWAI M, TAKAHASHI T. (2002). Microanalysis of hyaluronan oligosaccharides by polyacrylamide gel electrophoresis and its application to assay of hyaluronidase activity. *Anal Biochem* 311,157-65.
- ITANO N, ATSUMI F, SAWAI T, YAMADA Y, MIYAISHI O, SENGA T, HAMAGUCHI M, KIMATA K. (2002). Abnormal accumulation of hyaluronan matrix diminishes contact inhibition of cell growth and promotes cell migration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99,3609-14.
- ITANO N, SAWAI T, MIYAISHI O, KIMATA K. (1999). Relationship between hyaluronan production and metastatic potential of mouse mammary carcinoma cells. *Cancer Res* 59,2499-504.
- ITO M, NISHIO M, KAWANO M, KUSAGAWA S, KOMADA H, ITO Y, TSURUDOME M. (1997). Role of a single amino acid at the amino terminus of the simian virus 5 F2 subunit in syncytium formation. *J Virol* 71,9855-8.

- JACOBSON A, RAHMANIAN M, RUBIN K, HELDIN P. (2002). Expression of hyaluronan synthase 2 or hyaluronidase 1 differentially affect the growth rate of transplantable colon carcinoma cell tumors. *Int J Cancer* 102,212-9.
- JAKUBCZAK JL, RYAN P, GORZIGLIA M, CLARKE L, HAWKINS LK, HAY C, HUANG Y, KALOSS M, MARINOV A, PHIPPS S and others. (2003). An oncolytic adenovirus selective for retinoblastoma tumor suppressor protein pathway-defective tumors: dependence on E1A, the E2F-1 promoter, and viral replication for selectivity and efficacy. *Cancer Res* 63,1490-9.
- JANG SH, WIENTJES MG, LU D, AU JL. (2003). Drug delivery and transport to solid tumors. *Pharm Res* 20,1337-50.
- JAVIER RT. (1994). Adenovirus type 9 E4 open reading frame 1 encodes a transforming protein required for the production of mammary tumors in rats. *J Virol* 68,3917-24.
- JIN F, KRETSCHMER PJ, HERMISTON TW. (2005). Identification of novel insertion sites in the Ad5 genome that utilize the Ad splicing machinery for therapeutic gene expression. *Mol Ther* 12,1052-63.
- JOHNSON L, SHEN A, BOYLE L, KUNICH J, PANDEY K, LEMMON M, HERMISTON T, GIEDLIN M, MCCORMICK F, FATTAEY A. (2002). Selectively replicating adenoviruses targeting deregulated E2F activity are potent, systemic antitumor agents. *Cancer Cell* 1,325-37.
- KALYUZHNIY O, DI PAOLO NC, SILVESTRY M, HOFHERR SE, BARRY MA, STEWART PL, SHAYAKHMETOV DM. (2008). Adenovirus serotype 5 hexon is critical for virus infection of hepatocytes in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105,5483-8.
- KANOPKA A, MUHLEMANN O, AKUSJARVI G. (1996). Inhibition by SR proteins of splicing of a regulated adenovirus pre-mRNA. *Nature* 381,535-8.
- KANOPKA A, MUHLEMANN O, PETERSEN-MAHRT S, ESTMER C, OHRMALM C, AKUSJARVI G. (1998). Regulation of adenovirus alternative RNA splicing by dephosphorylation of SR proteins. *Nature* 393,185-7.
- KAWA A, ARAKAWA S. (1987). The effect of attenuated vaccinia virus AS strain on multiple myeloma; a case report. *Jpn J Exp Med* 57,79-81.
- KEMENY N, BROWN K, COVEY A, KIM T, BHARGAVA A, BRODY L, GUILFOYLE B, HAAG NP, KARRASCH M, GLASSCHROEDER B and others. (2006). Phase I, open-label, dose-escalating study of a genetically engineered herpes simplex virus, NV1020, in subjects with metastatic colorectal carcinoma to the liver. *Hum Gene Ther* 17,1214-24.
- KHURI FR, NEMUNAITIS J, GANLY I, ARSENEAU J, TANNOCK IF, ROMEL L, GORE M, IRONSDIE J, MACDOUGALL RH, HEISE C and others. (2000). a controlled trial of intratumoral ONYX-015, a selectively-replicating adenovirus, in combination with cisplatin and 5-fluorouracil in patients with recurrent head and neck cancer. *Nat Med* 6,879-85.
- KIM JH, LEE YS, KIM H, HUANG JH, YOON AR, YUN CO. (2006). Relaxin expression from tumor-targeting adenoviruses and its intratumoral spread, apoptosis induction, and efficacy. *J Natl Cancer Inst* 98,1482-93.
- KIMATA K, HONMA Y, OKAYAMA M, OGURI K, HOZUMI M, SUZUKI S. (1983). Increased synthesis of hyaluronic acid by mouse mammary carcinoma cell variants with high metastatic potential. *Cancer Res* 43,1347-54.
- KIRN D. (2000). Replication-selective oncolytic adenoviruses: virotherapy aimed at genetic targets in cancer. *Oncogene* 19,6660-9.
- KLEINBERGER T. (2004). Induction of transformed cell-specific apoptosis by the adenovirus E4orf4 protein. *Prog Mol Subcell Biol* 36,245-67.
- KLEINBERGER T, SHENK T. (1993). Adenovirus E4orf4 protein binds to protein phosphatase 2A, and the complex down regulates E1A-enhanced junB transcription. *J Virol* 67,7556-60.
- KLOCKER J, SABITZER H, RAUNIK W, WIESER S, SCHUMER J. (1995). Combined application of cisplatin, vindesine, hyaluronidase and radiation for treatment of advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. *Am J Clin Oncol* 18,425-8.
- KNUDSON W. (1996). Tumor-associated hyaluronan. Providing an extracellular matrix that facilitates invasion. *Am J Pathol* 148,1721-6.

- KNUDSON W, BISWAS C, TOOLE BP. (1984). Interactions between human tumor cells and fibroblasts stimulate hyaluronate synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81,6767-71.
- KOSAKI R, WATANABE K, YAMAGUCHI Y. (1999). Overproduction of hyaluronan by expression of the hyaluronan synthase Has2 enhances anchorage-independent growth and tumorigenicity. *Cancer Res* 59,1141-5.
- KUMAR S, WEST DC, PONTING JM, GATTAMANENI HR. (1989). Sera of children with renal tumours contain low-molecular-mass hyaluronic acid. *Int J Cancer* 44,445-8.
- KURIHARA T, BROUGH DE, KOVESDI I, KUFÉ DW. (2000). Selectivity of a replication-competent adenovirus for human breast carcinoma cells expressing the MUC1 antigen. *J Clin Invest* 106,763-71.
- LAMB RA. (1993). Paramyxovirus fusion: a hypothesis for changes. *Virology* 197,1-11.
- LAMBRIGHT ES, AMIN K, WIEWRODT R, FORCE SD, LANUTI M, PROPERT KJ, LITZKY L, KAISER LR, ALBELDA SM. (2001). Inclusion of the herpes simplex thymidine kinase gene in a replicating adenovirus does not augment antitumor efficacy. *Gene Ther* 8,946-53.
- LAMONT JP, NEMUNAITIS J, KUHN JA, LANDERS SA, MCCARTY TM. (2000). A prospective phase II trial of ONYX-015 adenovirus and chemotherapy in recurrent squamous cell carcinoma of the head and neck (the Baylor experience). *Ann Surg Oncol* 7,588-92.
- LEE YS, KIM JH, CHOI KJ, CHOI IK, KIM H, CHO S, CHO BC, YUN CO. (2006). Enhanced antitumor effect of oncolytic adenovirus expressing interleukin-12 and B7-1 in an immunocompetent murine model. *Clin Cancer Res* 12,5859-68.
- LI H, HAVIV YS, DERDEYN CA, LAM J, COOLIDGE C, HUNTER E, CURIEL DT, BLACKWELL JL. (2001a). Human immunodeficiency virus type 1-mediated syncytium formation is compatible with adenovirus replication and facilitates efficient dispersion of viral gene products and de novo-synthesized virus particles. *Hum Gene Ther* 12,2155-65.
- LI Y, CHEN Y, DILLEY J, ARROYO T, KO D, WORKING P, YU DC. (2003). Carcinoembryonic antigen-producing cell-specific oncolytic adenovirus, OV798, for colorectal cancer therapy. *Mol Cancer Ther* 2,1003-9.
- LI Y, YU DC, CHEN Y, AMIN P, ZHANG H, NGUYEN N, HENDERSON DR. (2001b). A hepatocellular carcinoma-specific adenovirus variant, CV890, eliminates distant human liver tumors in combination with doxorubicin. *Cancer Res* 61,6428-36.
- LIANG XH, JACKSON S, SEAMAN M, BROWN K, KEMPKE B, HIBSHOOSH H, LEVINE B. (1999). Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature* 402,672-6.
- LINARDAKIS E, BATEMAN A, PHAN V, AHMED A, GOUGH M, OLIVIER K, KENNEDY R, ERRINGTON F, HARRINGTON KJ, MELCHER A and others. (2002). Enhancing the efficacy of a weak allogeneic melanoma vaccine by viral fusogenic membrane glycoprotein-mediated tumor cell-tumor cell fusion. *Cancer Res* 62,5495-504.
- LIU N, GAO F, HAN Z, XU X, UNDERHILL CB, ZHANG L. (2001a). Hyaluronan synthase 3 overexpression promotes the growth of TSU prostate cancer cells. *Cancer Res* 61,5207-14.
- LIU N, LAPCEVICH RK, UNDERHILL CB, HAN Z, GAO F, SWARTZ G, PLUM SM, ZHANG L, GREEN SJ. (2001b). Metastatin: a hyaluronan-binding complex from cartilage that inhibits tumor growth. *Cancer Res* 61,1022-8.
- LIU TC, GALANIS E, KIRN D. (2007). Clinical trial results with oncolytic virotherapy: a century of promise, a decade of progress. *Nat Clin Pract Oncol* 4,101-17.
- LIU Y, YE T, MAYNARD J, AKBULUT H, DEISSEROTH A. (2006). Engineering conditionally replication-competent adenoviral vectors carrying the cytosine deaminase gene increases the infectivity and therapeutic effect for breast cancer gene therapy. *Cancer Gene Ther* 13,346-56.
- LOKESHWAR VB, CERWINKA WH, ISOYAMA T, LOKESHWAR BL. (2005). HYAL1 hyaluronidase in prostate cancer: a tumor promoter and suppressor. *Cancer Res* 65,7782-9.
- LOKESHWAR VB, OBEK C, SOLOWAY MS, BLOCK NL. (1997). Tumor-associated hyaluronic acid: a new sensitive and specific urine marker for bladder cancer. *Cancer Res* 57,773-7.

- LOKESHWAR VB, RUBINOWICZ D, SCHROEDER GL, FORGACS E, MINNA JD, BLOCK NL, NADJI M, LOKESHWAR BL. (2001). Stromal and epithelial expression of tumor markers hyaluronic acid and HYAL1 hyaluronidase in prostate cancer. *J Biol Chem* 276,11922-32.
- LOKESHWAR VB, SELZER MG. (2000). Differences in hyaluronic acid-mediated functions and signaling in arterial, microvessel, and vein-derived human endothelial cells. *J Biol Chem* 275,27641-9.
- LOKESHWAR VB, SOLOWAY MS, BLOCK NL. (1998). Secretion of bladder tumor-derived hyaluronidase activity by invasive bladder tumor cells. *Cancer Lett* 131,21-7.
- LOKESHWAR VB, YOUNG MJ, GOUDARZI G, IIDA N, YUDIN AI, CHERR GN, SELZER MG. (1999). Identification of bladder tumor-derived hyaluronidase: its similarity to HYAL1. *Cancer Res* 59,4464-70.
- LU W, ZHENG S, LI XF, HUANG JJ, ZHENG X, LI Z. (2004). Intra-tumor injection of H101, a recombinant adenovirus, in combination with chemotherapy in patients with advanced cancers: a pilot phase II clinical trial. *World J Gastroenterol* 10,3634-8.
- LUKASHEV AN, FUERER C, CHEN MJ, SEARLE P, IGGO R. (2005). Late expression of nitroreductase in an oncolytic adenovirus sensitizes colon cancer cells to the prodrug CB1954. *Hum Gene Ther* 16,1473-83.
- MA L, BLUYSSSEN HA, DE RAEYMAEKER M, LAURYSSENS V, VAN DER BEEK N, PAVLISKA H, VAN ZONNEVELD AJ, TOMME P, VAN ES HH. (2001). Rapid determination of adenoviral vector titers by quantitative real-time PCR. *J Virol Methods* 93,181-8.
- MACE AT, GANLY I, SOUTAR DS, BROWN SM. (2008). Potential for efficacy of the oncolytic Herpes simplex virus 1716 in patients with oral squamous cell carcinoma. *Head Neck* 30,1045-51.
- MACKIE RM, STEWART B, BROWN SM. (2001). Intralesional injection of herpes simplex virus 1716 in metastatic melanoma. *Lancet* 357,525-6.
- MAJEM M, CASCALLO M, BAYO-PUXAN N, MESIA R, GERMA JR, ALEMANY R. (2006). Control of E1A under an E2F-1 promoter insulated with the myotonic dystrophy locus insulator reduces the toxicity of oncolytic adenovirus Ad-Delta24RGD. *Cancer Gene Ther* 13,696-705.
- MARCELLUS RC, CHAN H, PAQUETTE D, THIRLWELL S, BOIVIN D, BRANTON PE. (2000). Induction of p53-independent apoptosis by the adenovirus E4orf4 protein requires binding to the Balph subunit of protein phosphatase 2A. *J Virol* 74,7869-77.
- MARCELLUS RC, LAVOIE JN, BOIVIN D, SHORE GC, KETNER G, BRANTON PE. (1998). The early region 4 orf4 protein of human adenovirus type 5 induces p53-independent cell death by apoptosis. *J Virol* 72,7144-53.
- MARKERT JM, MEDLOCK MD, RABKIN SD, GILLESPIE GY, TODO T, HUNTER WD, PALMER CA, FEIGENBAUM F, TORNATORE C, TUFARO F and others. (2000). Conditionally replicating herpes simplex virus mutant, G207 for the treatment of malignant glioma: results of a phase I trial. *Gene Ther* 7,867-74.
- MARKOVIC-HOUSLEY Z, MIGLIERINI G, SOLDATOVA L, RIZKALLAH PJ, MULLER U, SCHIRMER T. (2000). Crystal structure of hyaluronidase, a major allergen of bee venom. *Structure* 8,1025-35.
- MARTIN-DUQUE P, JEZZARD S, KAFTANSIS L, VASSAUX G. (2004). Direct comparison of the insulating properties of two genetic elements in an adenoviral vector containing two different expression cassettes. *Hum Gene Ther* 15,995-1002.
- MATSUBARA S, WADA Y, GARDNER TA, EGAWA M, PARK MS, HSIEH CL, ZHAU HE, KAO C, KAMIDONO S, GILLENWATER JY and others. (2001). A conditional replication-competent adenoviral vector, Ad-OC-E1a, to cotarget prostate cancer and bone stroma in an experimental model of androgen-independent prostate cancer bone metastasis. *Cancer Res* 61,6012-9.
- MAUL GG. (1998). Nuclear domain 10, the site of DNA virus transcription and replication. *Bioessays* 20,660-7.
- MELCHER A, GOUGH M, TODRYK S, VILE R. (1999). Apoptosis or necrosis for tumor immunotherapy: what's in a name? *J Mol Med* 77,824-33.

- MELCHER A, TODRYK S, HARDWICK N, FORD M, JACOBSON M, VILE RG. (1998). Tumor immunogenicity is determined by the mechanism of cell death via induction of heat shock protein expression. *Nat Med* 4,581-7.
- MILTON GW, BROWN MM. (1966). The limited role of attenuated smallpox virus in the management of advanced malignant melanoma. *Aust N Z J Surg* 35,286-90.
- MISRA S, GHATAK S, ZOLTAN-JONES A, TOOLE BP. (2003). Regulation of multidrug resistance in cancer cells by hyaluronan. *J Biol Chem* 278,25285-8.
- MIZUGUCHI H, XU Z, ISHII-WATABE A, UCHIDA E, HAYAKAWA T. (2000). IRES-dependent second gene expression is significantly lower than cap-dependent first gene expression in a bicistronic vector. *Mol Ther* 1,376-82.
- MOREY SS, KIRAN KM, GADAG JR. (2006). Purification and properties of hyaluronidase from *Palamneus gravimanus* (Indian black scorpion) venom. *Toxicon* 47,188-95.
- MORRIS JC, WILDNER O. (2000). Therapy of head and neck squamous cell carcinoma with an oncolytic adenovirus expressing HSV-tk. *Mol Ther* 1,56-62.
- MSAOUEL P, DISPENZIERI A, GALANIS E. (2009). Clinical testing of engineered oncolytic measles virus strains in the treatment of cancer: an overview. *Curr Opin Mol Ther* 11,43-53.
- MUHLEMANN O, YUE BG, PETERSEN-MAHRT S, AKUSJARVI G. (2000). A novel type of splicing enhancer regulating adenovirus pre-mRNA splicing. *Mol Cell Biol* 20,2317-25.
- NADAL M, PERA G, PUJADAS J, ABRIL J, GONZALEZ L, AGUILO F, CONDOM E, GOMEZ-ZAERA M, NUNES V. (2007). Aneuploidy of chromosome Y in prostate tumors and seminal vesicles: a possible sign of aging rather than an indicator of carcinogenesis? *Mol Carcinog* 46,543-52.
- NAGARAJU S, MAHADESWARASWAMY YH, GIRISH KS, KEMPARAJU K. (2006). Venom from spiders of the genus *Hippasa*: biochemical and pharmacological studies. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 144,1-9.
- NEMUNAITIS J, GANLY I, KHURI F, ARSENEAU J, KUHN J, MCCARTY T, LANDERS S, MAPLES P, ROMEL L, RANDLEV B and others. (2000). Selective replication and oncolysis in p53 mutant tumors with ONYX-015, an E1B-55kD gene-deleted adenovirus, in patients with advanced head and neck cancer: a phase II trial. *Cancer Res* 60,6359-66.
- NEMUNAITIS J, SENZER N, SARMIENTO S, ZHANG YA, ARZAGA R, SANDS B, MAPLES P, TONG AW. (2007a). A phase I trial of intravenous infusion of ONYX-015 and enbrel in solid tumor patients. *Cancer Gene Ther* 14,885-93.
- NEMUNAITIS J, VORHIES JS, PAPPEN B, SENZER N. (2007b). 10-year follow-up of gene-modified adenoviral-based therapy in 146 non-small-cell lung cancer patients. *Cancer Gene Ther* 14,762-3.
- NETTELBECK DM, RIVERA AA, BALAGUE C, ALEMANY R, CURIEL DT. (2002). Novel oncolytic adenoviruses targeted to melanoma: specific viral replication and cytolysis by expression of E1A mutants from the tyrosinase enhancer/promoter. *Cancer Res* 62,4663-70.
- NETTI PA, BERK DA, SWARTZ MA, GRODZINSKY AJ, JAIN RK. (2000). Role of extracellular matrix assembly in interstitial transport in solid tumors. *Cancer Res* 60,2497-503.
- O'CONNOR RJ, HEARING P. (2000). The E4-6/7 protein functionally compensates for the loss of E1A expression in adenovirus infection. *J Virol* 74,5819-24.
- O'SHEA C, KLUPSCH K, CHOI S, BAGUS B, SORIA C, SHEN J, MCCORMICK F, STOKOE D. (2005). Adenoviral proteins mimic nutrient/growth signals to activate the mTOR pathway for viral replication. *EMBO J* 24,1211-21.
- PARATO KA, SENGER D, FORSYTH PA, BELL JC. (2005). Recent progress in the battle between oncolytic viruses and tumours. *Nat Rev Cancer* 5,965-76.
- PARK BH, HWANG T, LIU TC, SZE DY, KIM JS, KWON HC, OH SY, HAN SY, YOON JH, HONG SH and others. (2008). Use of a targeted oncolytic poxvirus, JX-594, in patients with refractory primary or metastatic liver cancer: a phase I trial. *Lancet Oncol* 9,533-42.
- PARKER AL, WADDINGTON SN, NICOL CG, SHAYAKHMETOV DM, BUCKLEY SM, DENBY L, KEMBALL-COOK G, NI S, LIEBER A, MCVEY JH and others. (2006). Multiple vitamin K-dependent coagulation zymogens promote adenovirus-mediated gene delivery to hepatocytes. *Blood* 108,2554-61.

- PASQUINUCCI G. (1971). Possible effect of measles on leukaemia. *Lancet* 1,136.
- PATERSON RG, HARRIS TJ, LAMB RA. (1984). Fusion protein of the paramyxovirus simian virus 5: nucleotide sequence of mRNA predicts a highly hydrophobic glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81,6706-10.
- PATERSON RG, RUSSELL CJ, LAMB RA. (2000). Fusion protein of the paramyxovirus SV5: destabilizing and stabilizing mutants of fusion activation. *Virology* 270,17-30.
- PETER I, GRAF C, DUMMER R, SCHAFFNER W, GREBER UF, HEMMI S. (2003). A novel attenuated replication-competent adenovirus for melanoma therapy. *Gene Ther* 10,530-9.
- PHAN V, ERRINGTON F, CHEONG SC, KOTTKE T, GOUGH M, ALTMANN S, BRANDENBURGER A, EMERY S, STROME S, BATEMAN A and others. (2003). A new genetic method to generate and isolate small, short-lived but highly potent dendritic cell-tumor cell hybrid vaccines. *Nat Med* 9,1215-9.
- PILDER S, MOORE M, LOGAN J, SHENK T. (1986). The adenovirus E1B-55K transforming polypeptide modulates transport or cytoplasmic stabilization of viral and host cell mRNAs. *Mol Cell Biol* 6,470-6.
- PIRINEN R, TAMMI R, TAMMI M, HIRVIKOSKI P, PARKKINEN JJ, JOHANSSON R, BOHM J, HOLLMEN S, KOSMA VM. (2001). Prognostic value of hyaluronan expression in non-small-cell lung cancer: Increased stromal expression indicates unfavorable outcome in patients with adenocarcinoma. *Int J Cancer* 95,12-7.
- PONTA H, SHERMAN L, HERRLICH PA. (2003). CD44: from adhesion molecules to signalling regulators. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4,33-45.
- POST DE, SANDBERG EM, KYLE MM, DEVI NS, BRAT DJ, XU Z, TIGHIOUART M, VAN MEIR EG. (2007). Targeted cancer gene therapy using a hypoxia inducible factor dependent oncolytic adenovirus armed with interleukin-4. *Cancer Res* 67,6872-81.
- QUERIDO E, BLANCHETTE P, YAN Q, KAMURA T, MORRISON M, BOIVIN D, KAELIN WG, CONAWAY RC, CONAWAY JW, BRANTON PE. (2001). Degradation of p53 by adenovirus E4orf6 and E1B55K proteins occurs via a novel mechanism involving a Cullin-containing complex. *Genes Dev* 15,3104-17.
- RAMESH N, GE Y, ENNIST DL, ZHU M, MINA M, GANESH S, REDDY PS, YU DC. (2006). CG0070, a conditionally replicating granulocyte macrophage colony-stimulating factor-armed oncolytic adenovirus for the treatment of bladder cancer. *Clin Cancer Res* 12,305-13.
- RAMPLING R, CRUICKSHANK G, PAPANASTASSIOU V, NICOLL J, HADLEY D, BRENNAN D, PETTY R, MACLEAN A, HARLAND J, MCKIE E and others. (2000). Toxicity evaluation of replication-competent herpes simplex virus (ICP 34.5 null mutant 1716) in patients with recurrent malignant glioma. *Gene Ther* 7,859-66.
- RANDALL RE, YOUNG DF, GOSWAMI KK, RUSSELL WC. (1987). Isolation and characterization of monoclonal antibodies to simian virus 5 and their use in revealing antigenic differences between human, canine and simian isolates. *J Gen Virol* 68 (Pt 11),2769-80.
- REITER I, KRAMMER B, SCHWAMBERGER G. (1999). Cutting edge: differential effect of apoptotic versus necrotic tumor cells on macrophage antitumor activities. *J Immunol* 163,1730-2.
- ROBINSON M, GE Y, KO D, YENDLURI S, LAFLAMME G, HAWKINS L, JOOSS K. (2008). Comparison of the E3 and L3 regions for arming oncolytic adenoviruses to achieve a high level of tumor-specific transgene expression. *Cancer Gene Ther* 15,9-17.
- RODRIGUEZ R, SCHUUR ER, LIM HY, HENDERSON GA, SIMONS JW, HENDERSON DR. (1997). Prostate attenuated replication competent adenovirus (ARCA) CN706: a selective cytotoxic for prostate-specific antigen-positive prostate cancer cells. *Cancer Res* 57,2559-63.
- ROENIGK HH, JR., DEODHAR S, ST JACQUES R, BURDICK K. (1974). Immunotherapy of malignant melanoma with vaccinia virus. *Arch Dermatol* 109,668-73.
- ROGULSKI KR, WING MS, PAIELLI DL, GILBERT JD, KIM JH, FREYTAG SO. (2000). Double suicide gene therapy augments the antitumor activity of a replication-competent lytic adenovirus through enhanced cytotoxicity and radiosensitization. *Hum Gene Ther* 11,67-76.

- ROPPONEN K, TAMMI M, PARKKINEN J, ESKELINEN M, TAMMI R, LIPPONEN P, AGREN U, ALHAVA E, KOSMA VM. (1998). Tumor cell-associated hyaluronan as an unfavorable prognostic factor in colorectal cancer. *Cancer Res* 58,342-7.
- ROTHMANN T, HENGSTERMANN A, WHITAKER NJ, SCHEFFNER M, ZUR HAUSEN H. (1998). Replication of ONYX-015, a potential anticancer adenovirus, is independent of p53 status in tumor cells. *J Virol* 72,9470-8.
- RUSSELL CJ, KANTOR KL, JARDETZKY TS, LAMB RA. (2003). A dual-functional paramyxovirus F protein regulatory switch segment: activation and membrane fusion. *J Cell Biol* 163,363-74.
- RUSSELL WC. (2000). Update on adenovirus and its vectors. *J Gen Virol* 81,2573-604.
- RYAN PC, JAKUBCZAK JL, STEWART DA, HAWKINS LK, CHENG C, CLARKE LM, GANESH S, HAY C, HUANG Y, KALOSS M and others. (2004). Antitumor efficacy and tumor-selective replication with a single intravenous injection of OAS403, an oncolytic adenovirus dependent on two prevalent alterations in human cancer. *Cancer Gene Ther* 11,555-69.
- SARKAR D, LEBEDEVA IV, SU ZZ, PARK ES, CHATMAN L, VOZHILLA N, DENT P, CURIEL DT, FISHER PB. (2007). Eradication of therapy-resistant human prostate tumors using a cancer terminator virus. *Cancer Res* 67,5434-42.
- SARKAR D, SU ZZ, VOZHILLA N, PARK ES, GUPTA P, FISHER PB. (2005). Dual cancer-specific targeting strategy cures primary and distant breast carcinomas in nude mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102,14034-9.
- SAUTHOFF H, HU J, MACA C, GOLDMAN M, HEITNER S, YEE H, PIPIYA T, ROM WN, HAY JG. (2003). Intratumoral spread of wild-type adenovirus is limited after local injection of human xenograft tumors: virus persists and spreads systemically at late time points. *Hum Gene Ther* 14,425-33.
- SAUTHOFF H, PIPIYA T, HEITNER S, CHEN S, NORMAN RG, ROM WN, HAY JG. (2002). Late expression of p53 from a replicating adenovirus improves tumor cell killing and is more tumor cell specific than expression of the adenoviral death protein. *Hum Gene Ther* 13,1859-71.
- SAVILL J, FADOK V. (2000). Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* 407,784-8.
- SCHATTNER A. (1984). Therapeutic role of measles vaccine in Hodgkin's disease. *Lancet* 1,171.
- SERRA M, RABANAL RM, MIQUEL L, DOMENZAIN C, BASSOLS A. (2004). Differential expression of CD44 in canine melanocytic tumours. *J Comp Pathol* 130,171-80.
- SETALA LP, TAMMI MI, TAMMI RH, ESKELINEN MJ, LIPPONEN PK, AGREN UM, PARKKINEN J, ALHAVA EM, KOSMA VM. (1999). Hyaluronan expression in gastric cancer cells is associated with local and nodal spread and reduced survival rate. *Br J Cancer* 79,1133-8.
- SHAYAKHMETOV DM, GAGGAR A, NI S, LI ZY, LIEBER A. (2005). Adenovirus binding to blood factors results in liver cell infection and hepatotoxicity. *J Virol* 79,7478-91.
- SHIMIZU Y, HASUMI K, OKUDAIRA Y, YAMANISHI K, TAKAHASHI M. (1988). Immunotherapy of advanced gynecologic cancer patients utilizing mumps virus. *Cancer Detect Prev* 12,487-95.
- SHIRAKAWA T, HAMADA K, ZHANG Z, OKADA H, TAGAWA M, KAMIDONO S, KAWABATA M, GOTOH A. (2004). A cox-2 promoter-based replication-selective adenoviral vector to target the cox-2-expressing human bladder cancer cells. *Clin Cancer Res* 10,4342-8.
- SHUSTER S, FROST GI, CSOKA AB, FORMBY B, STERN R. (2002). Hyaluronidase reduces human breast cancer xenografts in SCID mice. *Int J Cancer* 102,192-7.
- SIMPSON GR, HAN Z, LIU B, WANG Y, CAMPBELL G, COFFIN RS. (2006). Combination of a fusogenic glycoprotein, prodrug activation, and oncolytic herpes simplex virus for enhanced local tumor control. *Cancer Res* 66,4835-42.
- SIMPSON MA, WILSON CM, MCCARTHY JB. (2002). Inhibition of prostate tumor cell hyaluronan synthesis impairs subcutaneous growth and vascularization in immunocompromised mice. *Am J Pathol* 161,849-57.
- SMALL EJ, CARDUCCI MA, BURKE JM, RODRIGUEZ R, FONG L, VAN UMMERSEN L, YU DC, AIMI J, ANDO D, WORKING P and others. (2006). A phase I trial of intravenous CG7870,

- a replication-selective, prostate-specific antigen-targeted oncolytic adenovirus, for the treatment of hormone-refractory, metastatic prostate cancer. *Mol Ther* 14,107-17.
- SMITH KJ, SKELTON HG, TURIANSKY G, WAGNER KF. (1997). Hyaluronidase enhances the therapeutic effect of vinblastine in intralesional treatment of Kaposi's sarcoma. Military Medical Consortium for the Advancement of Retroviral Research (MMCARR). *J Am Acad Dermatol* 36,239-42.
- SMITH T, IDAMAKANTI N, KYLEFJORD H, ROLLENCE M, KING L, KALOSS M, KALEKO M, STEVENSON SC. (2002). In vivo hepatic adenoviral gene delivery occurs independently of the coxsackievirus-adenovirus receptor. *Mol Ther* 5,770-9.
- SOHARA Y, ISHIGURO N, MACHIDA K, KURATA H, THANT AA, SENGA T, MATSUDA S, KIMATA K, IWATA H, HAMAGUCHI M. (2001). Hyaluronan activates cell motility of v-Src-transformed cells via Ras-mitogen-activated protein kinase and phosphoinositide 3-kinase-Akt in a tumor-specific manner. *Mol Biol Cell* 12,1859-68.
- SOUTHAM CM, MOORE AE. (1951). West Nile, Ilheus, and Bunyamwera virus infections in man. *Am J Trop Med Hyg* 31,724-41.
- SOVA P, REN XW, NI S, BERNT KM, MI J, KIVIAT N, LIEBER A. (2004). A tumor-targeted and conditionally replicating oncolytic adenovirus vector expressing TRAIL for treatment of liver metastases. *Mol Ther* 9,496-509.
- SPRUSS T, BERNHARDT G, SCHONENBERGER H, SCHIESS W. (1995). Hyaluronidase significantly enhances the efficacy of regional vinblastine chemotherapy of malignant melanoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 121,193-202.
- STEINWAERDER DS, LIEBER A. (2000). Insulation from viral transcriptional regulatory elements improves inducible transgene expression from adenovirus vectors in vitro and in vivo. *Gene Ther* 7,556-67.
- STERN R, ASARI AA, SUGAHARA KN. (2006). Hyaluronan fragments: an information-rich system. *Eur J Cell Biol* 85,699-715.
- STRACKER TH, CARSON CT, WEITZMAN MD. (2002). Adenovirus oncoproteins inactivate the Mre11-Rad50-NBS1 DNA repair complex. *Nature* 418,348-52.
- STUHLER G, TREFZER U, WALDEN P. (1998). Hybrid cell vaccination in cancer immunotherapy. Recruitment and activation of T cell help for induction of anti tumour cytotoxic T cells. *Adv Exp Med Biol* 451,277-82.
- STUHLER G, WALDEN P. (1994). Recruitment of helper T cells for induction of tumour rejection by cytolytic T lymphocytes. *Cancer Immunol Immunother* 39,342-5.
- SU C, PENG L, SHAM J, WANG X, ZHANG Q, CHUA D, LIU C, CUI Z, XUE H, WU H and others. (2006). Immune gene-viral therapy with triplex efficacy mediated by oncolytic adenovirus carrying an interferon-gamma gene yields efficient antitumor activity in immunodeficient and immunocompetent mice. *Mol Ther* 13,918-27.
- SUZUKI K, ALEMANY R, YAMAMOTO M, CUIEL DT. (2002). The presence of the adenovirus E3 region improves the oncolytic potency of conditionally replicative adenoviruses. *Clin Cancer Res* 8,3348-59.
- TAMURA Y, PENG P, LIU K, DAOU M, SRIVASTAVA PK. (1997). Immunotherapy of tumors with autologous tumor-derived heat shock protein preparations. *Science* 278,117-20.
- TAQI AM, ABDURRAHMAN MB, YAKUBU AM, FLEMING AF. (1981). Regression of Hodgkin's disease after measles. *Lancet* 1,1112.
- TAUBER B, DOBNER T. (2001). Molecular regulation and biological function of adenovirus early genes: the E4 ORFs. *Gene* 278,1-23.
- THOMAS MA, SPENCER JF, TOTH K, SAGARTZ JE, PHILLIPS NJ, WOLD WS. (2008). Immunosuppression enhances oncolytic adenovirus replication and antitumor efficacy in the Syrian hamster model. *Mol Ther* 16,1665-73.
- THORNE RF, LEGG JW, ISACKE CM. (2004). The role of the CD44 transmembrane and cytoplasmic domains in co-ordinating adhesive and signalling events. *J Cell Sci* 117,373-80.
- TOOLE BP. (2001). Hyaluronan in morphogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 12,79-87.
- TOOLE BP. (2004). Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue. *Nat Rev Cancer* 4,528-39.

- TOOLE BP, BISWAS C, GROSS J. (1979). Hyaluronate and invasiveness of the rabbit V2 carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76,6299-303.
- TSUKUDA K, WIEWRODT R, MOLNAR-KIMBER K, JOVANOVIĆ VP, AMIN KM. (2002). An E2F-responsive replication-selective adenovirus targeted to the defective cell cycle in cancer cells: potent antitumoral efficacy but no toxicity to normal cell. *Cancer Res* 62,3438-47.
- TURLEY EA, NOBLE PW, BOURGUIGNON LY. (2002). Signaling properties of hyaluronan receptors. *J Biol Chem* 277,4589-92.
- ULLMAN AJ, REICH NC, HEARING P. (2007). Adenovirus E4 ORF3 protein inhibits the interferon-mediated antiviral response. *J Virol* 81,4744-52.
- UNDERHILL CB, NGUYEN HA, SHIZARI M, CULTY M. (1993). CD44 positive macrophages take up hyaluronan during lung development. *Dev Biol* 155,324-36.
- VAN BEUSECHEM VW, VAN DEN DOEL PB, GRILL J, PINEDO HM, GERRITSEN WR. (2002). Conditionally replicative adenovirus expressing p53 exhibits enhanced oncolytic potency. *Cancer Res* 62,6165-71.
- VERMA IM, WEITZMAN MD. (2005). Gene therapy: twenty-first century medicine. *Annu Rev Biochem* 74,711-38.
- VILLANUEVA A, GARCIA C, PAULES AB, VICENTE M, MEGIAS M, REYES G, DE VILLALONGA P, AGELL N, LLUIS F, BACHS O and others. (1998). Disruption of the antiproliferative TGF-beta signaling pathways in human pancreatic cancer cells. *Oncogene* 17,1969-78.
- VOLPERS C, KOCHANEK S. (2004). Adenoviral vectors for gene transfer and therapy. *J Gene Med* 6 Suppl 1,S164-71.
- WADDINGTON SN, MCVEY JH, BHELLA D, PARKER AL, BARKER K, ATODA H, PINK R, BUCKLEY SM, GREIG JA, DENBY L and others. (2008). Adenovirus serotype 5 hexon mediates liver gene transfer. *Cell* 132,397-409.
- WANG Y, HALLDEN G, HILL R, ANAND A, LIU TC, FRANCIS J, BROOKS G, LEMOINE N, KIRN D. (2003). E3 gene manipulations affect oncolytic adenovirus activity in immunocompetent tumor models. *Nat Biotechnol* 21,1328-35.
- WANG ZG, ZHAO W, RAMACHANDRA M, SETH P. (2006). An oncolytic adenovirus expressing soluble transforming growth factor-beta type II receptor for targeting breast cancer: in vitro evaluation. *Mol Cancer Ther* 5,367-73.
- WEIDEN MD, GINSBERG HS. (1994). Deletion of the E4 region of the genome produces adenovirus DNA concatemers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91,153-7.
- WEIN LM, WU JT, KIRN DH. (2003). Validation and analysis of a mathematical model of a replication-competent oncolytic virus for cancer treatment: implications for virus design and delivery. *Cancer Res* 63,1317-24.
- WEITZMAN MD, ORNELLES DA. (2005). Inactivating intracellular antiviral responses during adenovirus infection. *Oncogene* 24,7686-96.
- WEST AG, GASZNER M, FELSENFELD G. (2002). Insulators: many functions, many mechanisms. *Genes Dev* 16,271-88.
- WHITE JM, DELOS SE, BRECHER M, SCHORNBURG K. (2008). Structures and mechanisms of viral membrane fusion proteins: multiple variations on a common theme. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 43,189-219.
- WILDNER O, BLAESE RM, MORRIS JC. (1999a). Therapy of colon cancer with oncolytic adenovirus is enhanced by the addition of herpes simplex virus-thymidine kinase. *Cancer Res* 59,410-3.
- WILDNER O, MORRIS JC, VAHANIAN NN, FORD H, JR., RAMSEY WJ, BLAESE RM. (1999b). Adenoviral vectors capable of replication improve the efficacy of HSVtk/GCV suicide gene therapy of cancer. *Gene Ther* 6,57-62.
- WIRTH T, ZENDER L, SCHULTE B, MUNDT B, PLENTZ R, RUDOLPH KL, MANNS M, KUBICKA S, KUHNEL F. (2003). A telomerase-dependent conditionally replicating adenovirus for selective treatment of cancer. *Cancer Res* 63,3181-8.
- WOBUS M, RANGWALA R, SHEYN I, HENNIGAN R, COILA B, LOWER EE, YASSIN RS, SHERMAN LS. (2002). CD44 associates with EGFR and erbB2 in metastasizing mammary carcinoma cells. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 10,34-9.

- WOHLFAHRT ME, BEARD BC, LIEBER A, KIEM HP. (2007). A capsid-modified, conditionally replicating oncolytic adenovirus vector expressing TRAIL Leads to enhanced cancer cell killing in human glioblastoma models. *Cancer Res* 67,8783-90.
- WORGALL S, WOLFF G, FALCK-PEDERSEN E, CRYSTAL RG. (1997). Innate immune mechanisms dominate elimination of adenoviral vectors following in vivo administration. *Hum Gene Ther* 8,37-44.
- XIA ZJ, CHANG JH, ZHANG L, JIANG WQ, GUAN ZZ, LIU JW, ZHANG Y, HU XH, WU GH, WANG HQ and others. (2004). [Phase III randomized clinical trial of intratumoral injection of E1B gene-deleted adenovirus (H101) combined with cisplatin-based chemotherapy in treating squamous cell cancer of head and neck or esophagus.]. *Ai Zheng* 23,1666-70.
- YU DC, CHEN Y, SENG M, DILLEY J, HENDERSON DR. (1999). The addition of adenovirus type 5 region E3 enables calydon virus 787 to eliminate distant prostate tumor xenografts. *Cancer Res* 59,4200-3.
- ZENG C, TOOLE BP, KINNEY SD, KUO JW, STAMENKOVIC I. (1998). Inhibition of tumor growth in vivo by hyaluronan oligomers. *Int J Cancer* 77,396-401.
- ZHAN J, GAO Y, WANG W, SHEN A, ASPELUND A, YOUNG M, LAQUERRE S, POST L, SHEN Y. (2005). Tumor-specific intravenous gene delivery using oncolytic adenoviruses. *Cancer Gene Ther* 12,19-25.
- ZHANG L, UNDERHILL CB, CHEN L. (1995). Hyaluronan on the surface of tumor cells is correlated with metastatic behavior. *Cancer Res* 55,428-33.
- ZHANG Y, BERGELSON JM. (2005). Adenovirus receptors. *J Virol* 79,12125-31.
- ZHANG YA, NEMUNAITIS J, SAMUEL SK, CHEN P, SHEN Y, TONG AW. (2006). Antitumor activity of an oncolytic adenovirus-delivered oncogene small interfering RNA. *Cancer Res* 66,9736-43.
- ZHANG ZL, ZOU WG, LUO CX, LI BH, WANG JH, SUN LY, QIAN QJ, LIU XY. (2003). An armed oncolytic adenovirus system, ZD55-gene, demonstrating potent antitumoral efficacy. *Cell Res* 13,481-9.
- ZHU M, BRISTOL JA, XIE Y, MINA M, JI H, FERRY-SCHAUDIES S, ENNIST DL. (2005). Linked tumor-selective virus replication and transgene expression from E3-containing oncolytic adenoviruses. *J Virol* 79,5455-65.

Annex

SHORT COMMUNICATION

Syncytia formation affects the yield and cytotoxicity of an adenovirus expressing a fusogenic glycoprotein at a late stage of replication

S Guedan^{1,2}, A Gros¹, M Cascallo¹, R Vile³, E Mercade^{2,4} and R Alemany^{1,4}

¹Translational Research Laboratory, IDIBELL-Institut Català d'Oncologia, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain; ²Department of Microbiology, University of Barcelona, Barcelona, Spain and ³Molecular Medicine program, Mayo Clinic, Rochester, MN, USA

Fusogenic membrane glycoproteins (FMGs) may enhance the cytotoxicity of conditionally replicative adenoviruses. However, expression at early stages of infection impairs virus replication. We have inserted the hyperfusogenic form of the gibbon ape leukemia virus (GALV) envelope glycoprotein as a new splice unit of the major late promoter (MLP) to generate a replication-competent adenovirus expressing

this protein. At high multiplicity of infection (MOI), this virus replicated efficiently forming clumps of fused cells and showing a faster release. In contrast, at low MOI, infected cells formed syncytia where only one nucleus contained virus DNA, decreasing total virus production but increasing cytotoxicity. Gene Therapy advance online publication, 29 May 2008; doi:10.1038/gt.2008.94

Keywords: replicative adenovirus; syncytia; fusogenic membrane glycoproteins

Conditional replicative adenoviruses hold great promise for treating malignant solid tumors, because of their ability to replicate selectively within the tumor and kill neighboring cancer cells upon tumor cell lysis and secondary infection.¹ However, the oncolytic activity of these viruses needs to be improved substantially for effective cancer treatment.^{2,3} One possible method to enhance the efficacy of replicating adenovirus is arming the viruses with therapeutic transgenes.^{4–7} In this respect, it has been previously shown that expression of FMGs efficiently kills tumoral cells by inducing cell–cell fusion and massive syncytia formation.^{8–11} Various FMGs have been evaluated as a means to increase the potency of oncolytic viruses.^{4,6,12–16} Expression of the HIV gp120 FMG by a replicative adenovirus enhanced viral release and facilitated dispersion of virus particles through a culture of tumor cells *in vitro*.⁴ In addition, a more recent report demonstrated that coinjection of plasmid DNA encoding the hyperfusogenic form of the GALV envelope glycoprotein significantly enhanced the *in vivo* efficacy of the adenovirus therapy.⁶ However, despite the interest on generating a replicative adenovirus expressing the GALV glycoprotein, previous attempts to produce adenoviral vectors encoding the GALV fusogenic protein have proven difficult, possibly due to premature cell fusion precluding virus replication. To overcome this problem the use of the modified human HSP70b promoter, a hyperthermia responsive promoter,¹⁷ or the

use of metalloproteinase-cleavable linkers to target the cytotoxicity of GALV-expressing adenoviral vectors against gliomas¹⁸ has been reported. Here, we address this problem expressing GALV under the MLP. Further, GALV expression under the control of the MLP in a conditionally replicative adenovirus is desirable to prevent GALV expression in normal cells and uncontrolled induction of syncytia formation, because GALV receptor Pit-1 is ubiquitously expressed in human cells. In this paper, we describe a new replication-competent adenovirus that expresses the GALV glycoprotein in the late stage of virus replication. We have used this virus to evaluate how fusogenesis affects adenovirus production and cytotoxicity for future application in conditionally replicative adenoviruses.

Generation and characterization of AdwtRGD-GALV, a replicative adenovirus expressing the GALV FMG

When dealing with replication-competent adenoviruses, it is desirable to express cytotoxic transgenes late in the viral life cycle to avoid early cell death.⁵ Therefore, we cloned the coding sequence of the hyperfusogenic form of the GALV glycoprotein in the AdwtRGD genome under the control of the MLP. The adenovirus IIIa splicing acceptor was placed upstream of the GALV cDNA, and a polyA site downstream. This cassette was placed directly downstream of the *fiber* gene, as an L6 unit (Figure 1a). This strategy has been used previously^{7,19} and cloning strategies are available upon request. Transfection of the AdwtRGD-GALV genome into 293 cells led to massive syncytia formation (Figure 1b) and virus generation. The new fusogenic adenovirus,

Correspondence: Dr R Alemany, Translational Research Laboratory, Institut Català d'Oncologia-IDIBELL, Av Gran Via S/N Km2,7, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona 8907, Spain.
E-mail: ralemany@iconcologia.net

⁴These authors contributed equally to this work.

Received 8 January 2008; revised 17 April 2008; accepted 19 April 2008

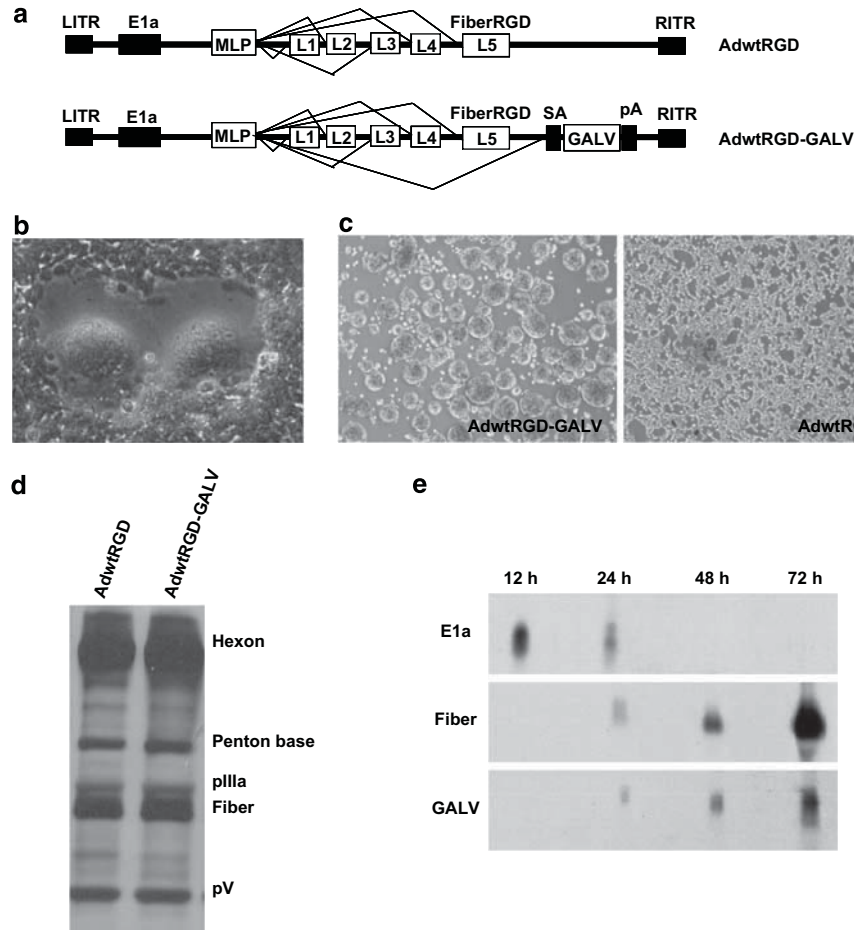


Figure 1 Generation and characterization of AdwtRGD-GALV. (a) Schematic representation of viruses used in this study. The AdwtRGD genome encodes a fiber protein with the RGD peptide inserted in the HI loop of the knob. To drive GALV expression in AdwtRGD-GALV from the MLP, an expression cassette consisting of a splice acceptor (SA) in front of the *GALV* cDNA and a polyA sequence (pA) is inserted downstream of the fiber in the AdwtRGD genome. The total length of the inserted *GALV*-splice cassette is 2053 pb. (b) Cell morphology upon transfection of AdwtRGD-GALV genome. 293 cells were transfected with linearized plasmid containing AdwtRGD-GALV genome. Extensive syncytia formation was observed 5 days after transfection. (c) Characterization of cytopathic effects induced by infection of 293 cells with high MOI of AdwtRGD-GALV and AdwtRGD. (d) Protein content of purified adenoviruses. Adenoviral vectors were purified by CsCl gradients and dialyzed in PBS/Cl/Mg (PBS⁺⁺) with 5% glycerol, and the particle titer was determined by OD. About 5×10^{10} vp of purified virions were boiled and separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and then stained with silver nitrate. (e) Time course of *E1a*, *Fiber* and *GALV* RNA expression from AdwtRGD-GALV. A549 cells were infected with AdwtRGD-GALV at MOI of 10 and total RNA was isolated at indicated time points. Extracted RNA were subjected to northern blot analysis with specific probes for *E1a*, *Fiber* and *GALV*. GALV, gibbon ape leukemia virus; MLP, major late promoter; MOI, multiplicity of infection; OD, optical density; PBS, phosphate-buffered saline.

AdwtRGD-GALV, and the control virus, AdwtRGD,²⁰ were efficiently propagated in 293 cells at high MOI. Whereas AdwtRGD induced a typical cytopathic effect characterized by cell rounding, swelling and loss of cell-cell contact, cells infected at high MOI with AdwtRGD-GALV formed large spherical clumps of fused cells (Figure 1c). The transducing units per ml of each cell extract were determined by α -hexon staining-based method,²¹ and high-titer stocks were obtained for both viruses: 625 TU per cell for AdwtRGD-GALV and 486 TU per cell for AdwtRGD, indicating that *GALV* late expression was not impairing effective virus production. Because it was possible that the insertion of the *GALV* cassette downstream of the *fiber* gene reduced fiber expression, protein content of purified adenoviral vectors was confirmed by silver nitrate staining. Figure 1d shows that no differences in capsid composition were

detected. To confirm the late expression of the *GALV* gene, A549 cells were infected at MOI of 10 with AdwtRGD-GALV. Total RNA from cell lysates was isolated at 12, 24, 48 and 72 h post infection, and was subjected to northern blot analysis with specific probes for *E1a*, *Fiber* and *GALV* RNAs. As shown in Figure 1e, *E1a* RNA was detected early in viral replication, whereas *GALV* RNA was expressed in the late phase, reproducing the pattern of fiber RNA.

Virus replication

To determine whether the insertion of the *GALV* transgene in the adenovirus genome and syncytium formation is detrimental to virus replication, we compared the one-step growth curves of AdwtRGD-GALV and AdwtRGD. A549 cells were infected at MOI of 10 with AdwtRGD and AdwtRGD-GALV, and the amount

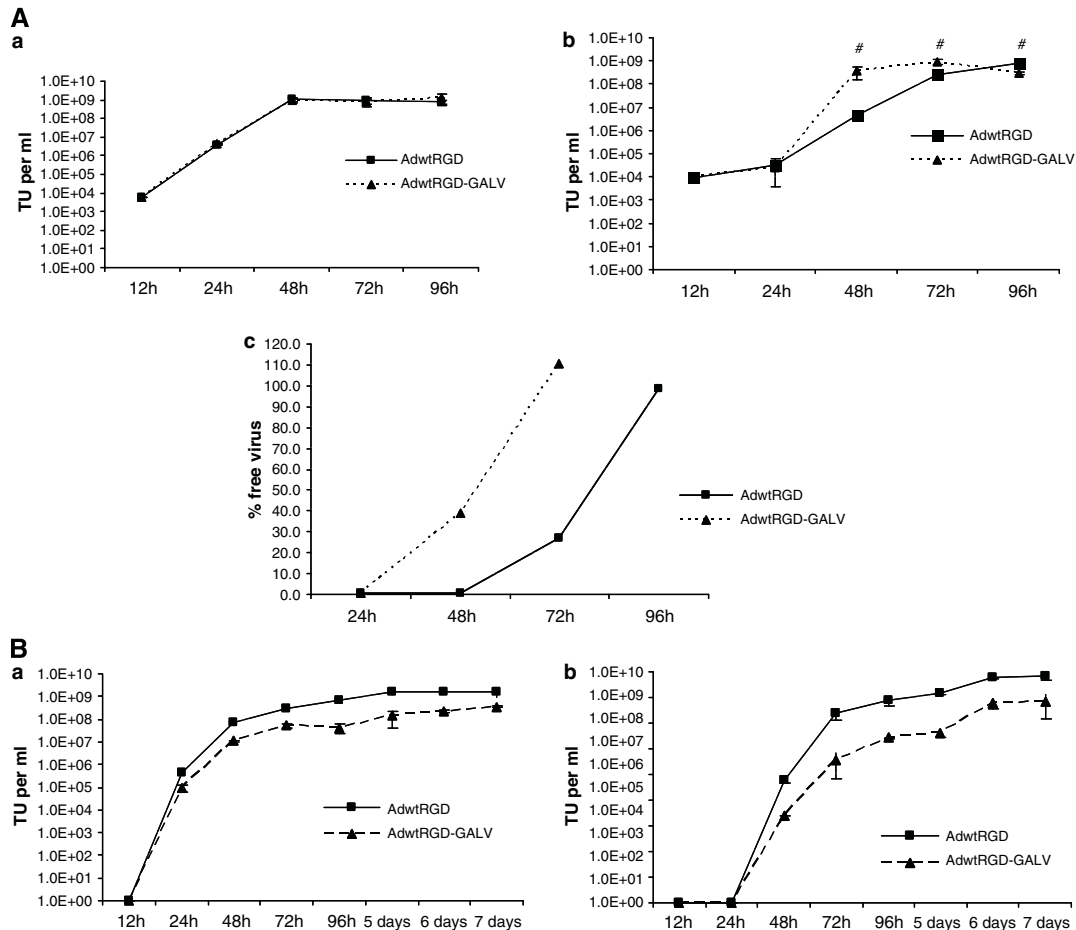


Figure 2 Virus yield after infection with AdwtRGD-GALV and AdwtRGD. (A) Viral replication at high MOI. Confluent A549 cells were infected with AdwtRGD-GALV and AdwtRGD at MOI of 10. Four hours post infection, viral solution was removed and cell cultures where washed with PBS and incubated with 1 ml of fresh virus-free medium. Cell extracts (a) and supernatants (b) were harvested 12, 24, 48, 72 and 96 h after infection and titrated by α -hexon staining. Virus found at 12 h post infection correspond to the input virus. $^{\#}P < 0.05$. (c) Graphic representation of the ratio of free virus released to the medium to total virus produced. (B) Viral replication at low MOI. Confluent A549 cells were infected with AdwtRGD-GALV and AdwtRGD at MOI of 0.1 as in (A). Cells extracts (a) and supernatants (b) were harvested at 24-h intervals up to day 7 after infection. Input virus at 12 h post infection was not detectable. All comparisons showed a significant advantage in replication for AdwtRGD. $P < 0.05$. GALV, gibbon ape leukemia virus; MOI, multiplicity of infection.

of virus in the supernatant and cell extracts was determined by α -hexon staining at various time points after infection. As shown in Figure 2Aa, total virus produced of both viruses was very similar, reaching approximately the same titer at the same time points. Interestingly, the amount of AdwtRGD-GALV released into the medium at 48 h post infection was almost 2-log higher than that of AdwtRGD, indicating a greater adenoviral release in presence of syncytia at high MOI (Figure 2Ab). A representation of the ratio of virus released to total virus shows that at 48 h post infection almost 40% of the AdwtRGD-GALV produced is released to the supernatant in contrast to less than 0.5% of the AdwtRGD (Figure 2Ac). At 72 h after infection, whereas more than 70% of AdwtRGD remained cell associated, all AdwtRGD-GALV was released. Next, we performed a multistep growth curve by infecting A549 at MOI of 0.1. Supernatants and cell extracts were harvested at 24-h intervals up to day 7 after infection. Large syncytia formed around infected cells and AdwtRGD-GALV viral titers were significantly lower than that of the AdwtRGD

at all time points (Figures 2Ba and 2Bb). Given a production impairment of AdwtRGD-GALV, one would expect a progressive divergence of titers with time. Initially, up to 72 and 96 h, there is such a clear divergence in the titers in supernatants and cell extracts, respectively. Later, the lack of divergence is not obvious and it may be explained by a saturating (plateau) level of AdwtRGD virus production. In summary, at high MOI, the fusogenic virus is produced as efficiently as AdwtRGD, but, at low MOI, the expression of the fusogenic protein decreases the amount of virus produced.

Viral replication in nuclei within syncytia

The low virus production in the presence of syncytia that arise at low MOI is contrasted with previous suggestions indicating that adenoviruses spread between the nucleus of a syncytium, thereby enhancing replication and increasing the amount of virus released.^{4,6} However, a more recent report indicated that adenovirus DNA does not normally undergo internuclear spreading between

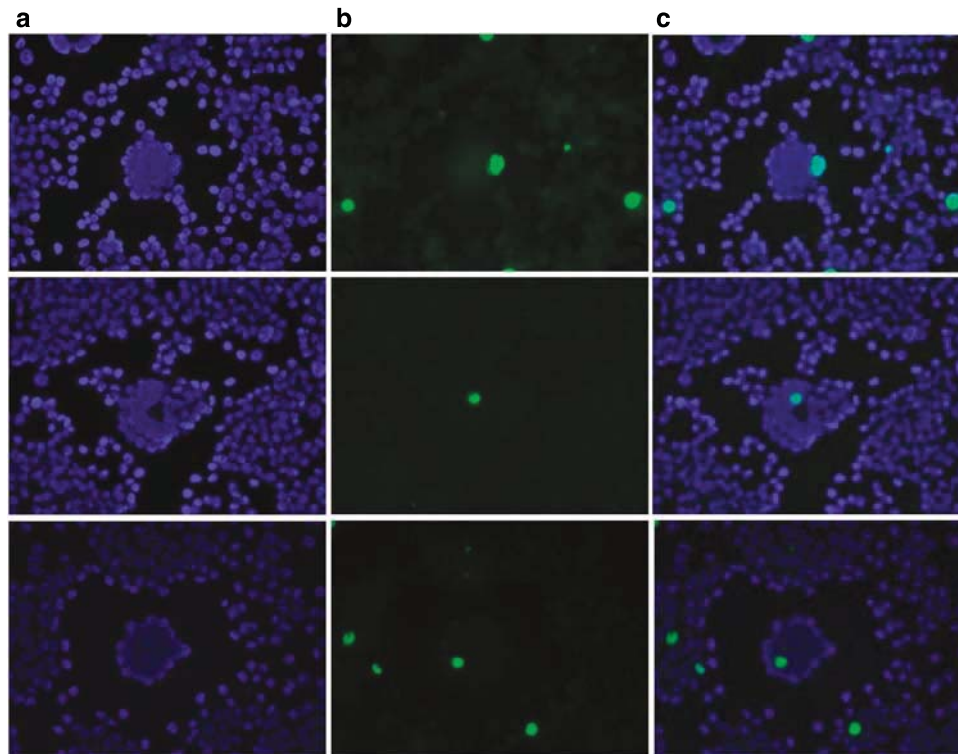


Figure 3 Analysis of viral DNA ability to spread between nuclei within a syncytium. Confluent SKMel28 cells were infected at MOI of 0.5 with AdwtRGD-GALV. Three days after infection, cells were fixed and viral DNA was detected by fluorescent *in situ* hybridization. The total DNA was stained with DAPI (a) and the viral DNA was detected with a viral DNA probe stained by nick-translation (b). (c) DAPI and viral DNA patterns overlapping are shown. DAPI, 4',6'-diamidino-2-phenylindole; GALV, gibbon ape leukemia virus; MOI, multiplicity of infection.

nuclei within a syncytium, suggesting that efficient adenovirus replication cannot occur without extracellular particle spread.²² As a result, most nuclei within a syncytium would die without producing new viral particles, limiting the total virus production. To test this, human melanoma cells, SKMel28, were infected at low MOI with AdwtRGD-GALV, and viral DNA was detected by fluorescent *in situ* hybridization 72 h after infection using AdwtRGD-GALV viral DNA stained by nick-translation as a probe.²³ Nuclei were detected by DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindole) staining. As shown in Figure 3, the presence of viral DNA was only detected in one nucleus within a syncytium, in almost all the syncytia evaluated, indicating that fusogenic adenoviruses cannot efficiently spread between nuclei within a syncytium. This lack of viral DNA spreading among the nuclei within the syncytia would explain the lower virus yields when infecting at low MOI, and suggest that syncytia formation does not directly interfere with adenovirus replication.

Comparison of tumor cell killing *in vitro*

Despite the observed reduced virus yields, the cytotoxicity induced by a replication-competent adenovirus expressing a fusogenic protein, even at low MOI, could be enhanced compared with a non-fusogenic counterpart. To determine whether late GALV expression would enhance tumor cell killing, we infected SKMel28 cells with AdwtRGD and AdwtRGD-GALV at MOI of 5 or 0.5. Cells were harvested 72 h, 5 and 7 days after infection

through trypsinization, and the number of viable cells was counted with a hemocytometer after Trypan blue staining. At MOI of 5, AdwtRGD-GALV killed more than 60% of tumor cells within 72 h, a time point where less than 45% of AdwtRGD-infected cells were dead. At MOI of 0.5, AdwtRGD-GALV reduced cell viability to less than 60% within 5 days, and at this same day most tumor cells infected with AdwtRGD were viable (Figure 4a). Differences at day 7 after infection were still significant. The degree of tumor cell killing appeared to correlate with the extent of syncytia formation. To test this further, A549 and pancreatic tumor cells (NP9) were infected in a similar manner. Both cells were killed more effectively by AdwtRGD-GALV compared with AdwtRGD. Interestingly, at MOI of 0.7, AdwtRGD-GALV killed all A549 cells within 96 h, a time point where more than 50% of the AdwtRGD-infected cells were still viable. At MOI of 0.05, AdwtRGD-GALV reduced cell viability to less than 50% within 96 h while at the same time most of tumor cells infected with AdwtRGD were viable (Figure 4b). These results indicate that the expression of GALV protein greatly enhances AdwtRGD cytotoxicity.

Collectively, our data demonstrate that expression of GALV under the MLP allows the generation of viable replication-competent adenoviruses. These fusogenic viruses are characterized by an enhanced cell killing despite detrimental effects on virus production from syncytia. These results warrant the construction of tumor-selective oncolytic adenoviruses using this strat-

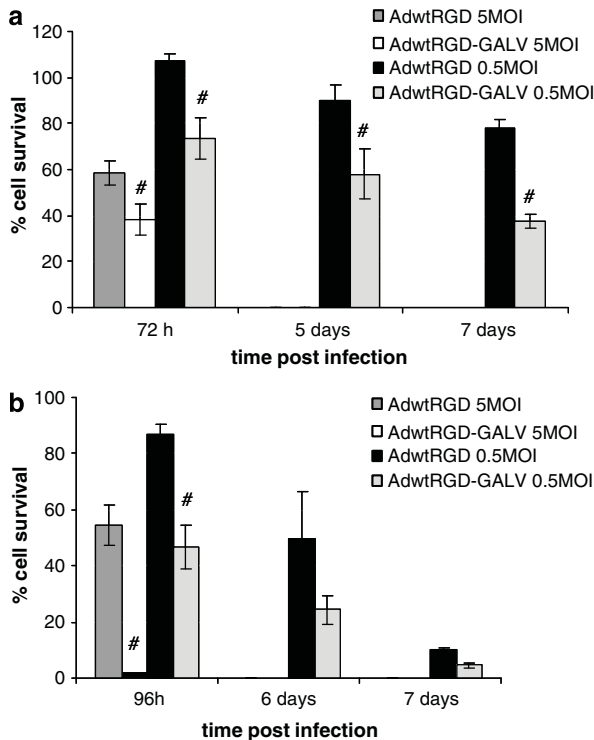


Figure 4 Comparison of cell killing of AdwtRGD-GALV and AdwtRGD in tumoral cells. (a) Confluent SKMel28 were infected with MOIs of 5 and 0.5 of AdwtRGD-GALV and AdwtRGD, respectively, or remained uninfected. (b) Confluent A549 were infected with MOIs of 0.7 and 0.05 of AdwtRGD-GALV and AdwtRGD, respectively, or remained uninfected. At indicated time points, cells were collected, stained with Trypan blue and counted. The percentage of cell viability was determined by dividing the number of viable cells from the infected well by the number of cells from an uninfected well. Data are expressed as means \pm standard errors of triplicates experiments. $^{\#}P < 0.02$. GALV, gibbon ape leukemia virus; MOI, multiplicity of infection.

egy and have implications when considering parameters such as virus yield or cytotoxicity with those viruses.

Acknowledgements

We thank Margarita Nadal, Eduard Serra and Jian Qiao for technical assistance. S Guedan was supported by a predoctoral fellowship (FI) granted by the Generalitat de Catalunya. AG was supported by a graduate student fellowship from Oncolytics Biotech. This work was supported by a grant from the Spanish Ministry of Education and Science, BIO2005-08682-C03-02/01 and received partial support from the Generalitat de Catalunya SGR0500008 and 200556R00066, and the Theradpox contract LSHB-CT-2005-018700 from the European Commission. RV is supported by the NIH Grant RO1CA085931.

References

1 Alemany R, Balague C, Curiel DT. Replicative adenoviruses for cancer therapy. *Nat Biotechnol* 2000; **18**: 723–727.

2 Nemunaitis J, Ganly I, Khuri F, Arseneau J, Kuhn J, McCarty T *et al*. Selective replication and oncolysis in p53 mutant tumors with ONYX-015, an E1B-55kD gene-deleted adenovirus, in patients with advanced head and neck cancer: a phase II trial. *Cancer Res* 2000; **60**: 6359–6366.

3 Vecil GG, Lang FF. Clinical trials of adenoviruses in brain tumors: a review of Ad-p53 and oncolytic adenoviruses. *J Neurooncol* 2003; **65**: 237–246.

4 Li H, Haviv YS, Derdeyn CA, Lam J, Coolidge C, Hunter E *et al*. Human immunodeficiency virus type 1-mediated syncytium formation is compatible with adenovirus replication and facilitates efficient dispersion of viral gene products and *de novo*-synthesized virus particles. *Hum Gene Ther* 2001; **12**: 2155–2165.

5 Sauthoff H, Pipiya T, Heitner S, Chen S, Norman RG, Rom WN *et al*. Late expression of p53 from a replicating adenovirus improves tumor cell killing and is more tumor cell specific than expression of the adenoviral death protein. *Hum Gene Ther* 2002; **13**: 1859–1871.

6 Ahmed A, Jevremovic D, Suzuki K, Kottke T, Thompson J, Emery S *et al*. Intratumoral expression of a fusogenic membrane glycoprotein enhances the efficacy of replicating adenovirus therapy. *Gene Therapy* 2003; **10**: 1663–1671.

7 Cascante A, Abate-Daga D, Garcia-Rodriguez L, Gonzalez JR, Alemany R, Fillat C. GCV modulates the antitumoural efficacy of a replicative adenovirus expressing the Tat8-TK as a late gene in a pancreatic tumour model. *Gene Therapy* 2007; **14**: 1471–1480.

8 Bateman A, Bullough F, Murphy S, Emiliusen L, Lavillette D, Cosset FL *et al*. Fusogenic membrane glycoproteins as a novel class of genes for the local and immune-mediated control of tumor growth. *Cancer Res* 2000; **60**: 1492–1497.

9 Fielding AK, Chapel-Fernandes S, Chadwick MP, Bullough FJ, Cosset FL, Russell SJ. A hyperfusogenic gibbon ape leukemia envelope glycoprotein: targeting of a cytotoxic gene by ligand display. *Hum Gene Ther* 2000; **11**: 817–826.

10 Bateman AR, Harrington KJ, Kottke T, Ahmed A, Melcher AA, Gough MJ *et al*. Viral fusogenic membrane glycoproteins kill solid tumor cells by nonapoptotic mechanisms that promote cross presentation of tumor antigens by dendritic cells. *Cancer Res* 2002; **62**: 6566–6578.

11 Linardakis E, Bateman A, Phan V, Ahmed A, Gough M, Olivier K *et al*. Enhancing the efficacy of a weak allogeneic melanoma vaccine by viral fusogenic membrane glycoprotein-mediated tumor cell–tumor cell fusion. *Cancer Res* 2002; **62**: 5495–5504.

12 Fu X, Tao L, Jin A, Vile R, Brenner MK, Zhang X. Expression of a fusogenic membrane glycoprotein by an oncolytic herpes simplex virus potentiates the viral antitumor effect. *Mol Ther* 2003; **7**: 748–754.

13 Nakamori M, Fu X, Meng F, Jin A, Tao L, Bast Jr RC *et al*. Effective therapy of metastatic ovarian cancer with an oncolytic herpes simplex virus incorporating two membrane fusion mechanisms. *Clin Cancer Res* 2003; **9**: 2727–2733.

14 Ebert O, Shinozaki K, Kournioti C, Park MS, Garcia-Sastre A, Woo SL. Syncytia induction enhances the oncolytic potential of vesicular stomatitis virus in virotherapy for cancer. *Cancer Res* 2004; **64**: 3265–3270.

15 Simpson GR, Han Z, Liu B, Wang Y, Campbell G, Coffin RS. Combination of a fusogenic glycoprotein, prodrug activation, and oncolytic herpes simplex virus for enhanced local tumor control. *Cancer Res* 2006; **66**: 4835–4842.

16 Gomez-Trevino A, Castel S, Lopez-Iglesias C, Cortadellas N, Comas-Riu J, Mercade E. Effects of adenovirus-mediated SV5 fusogenic glycoprotein expression on tumor cells. *J Gene Med* 2003; **5**: 483–492.

17 Brade AM, Szmítko P, Ngo D, Liu FF, Klamut HJ. Heat-directed tumor cell fusion. *Hum Gene Ther* 2003; **14**: 447–461.

- 18 Allen C, McDonald C, Giannini C, Peng KW, Rosales G, Russell SJ *et al*. Adenoviral vectors expressing fusogenic membrane glycoproteins activated via matrix metalloproteinase cleavable linkers have significant antitumor potential in the gene therapy of gliomas. *J Gene Med* 2004; **6**: 1216–1227.
- 19 Garcia-Castro J, Martinez-Palacio J, Lillo R, Garcia-Sanchez F, Alemany R, Madero L *et al*. Tumor cells as cellular vehicles to deliver gene therapies to metastatic tumors. *Cancer Gene Ther* 2005; **12**: 341–349.
- 20 Cascallo M, Alonso MM, Rojas JJ, Perez-Gimenez A, Fueyo J, Alemany R. Systemic toxicity–efficacy profile of ICOVIR-5, a potent and selective oncolytic adenovirus based on the pRB pathway. *Mol Ther* 2007; **15**: 1607–1615.
- 21 Majem M, Cascallo M, Bayo-Puxan N, Mesia R, Germa JR, Alemany R. Control of E1A under an E2F-1 promoter insulated with the myotonic dystrophy locus insulator reduces the toxicity of oncolytic adenovirus Ad-Delta24RGD. *Cancer Gene Ther* 2006; **13**: 696–705.
- 22 Horn GP, Vongpunsawad S, Kornmann E, Fritz B, Dittmer DP, Cattaneo R *et al*. Enhanced cytotoxicity without internuclear spread of adenovirus upon cell fusion by measles virus glycoproteins. *J Virol* 2005; **79**: 1911–1917.
- 23 Nadal M, Pera G, Pujadas J, Abril J, Gonzalez L, Aguilo F *et al*. Aneuploidy of chromosome Y in prostate tumors and seminal vesicles: a possible sign of aging rather than an indicator of carcinogenesis? *Mol Carcinog* 2007; **46**: 543–552.

Bioselection of a Gain of Function Mutation that Enhances Adenovirus 5 Release and Improves Its Antitumoral Potency

Alena Gros, Jordi Martínez-Quintanilla, Cristina Puig, Sonia Guedan, David G. Molleví, Ramon Alemany, and Manel Cascallo

Translational Research Laboratory, IDIBELL-Institut Català d'Oncologia, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain

Abstract

Genetic bioselection of a mutagenized Ad5wt stock in human tumor xenografts led us to isolate AdT1, a mutant displaying a large-plaque phenotype *in vitro* and an enhanced systemic antitumor activity *in vivo*. AdT1 phenotype correlates with an increased progeny release without affecting total viral yield in different human tumors and cancer-associated fibroblasts. An approach combining hybrid Ad5/AdT1 recombinants and sequencing identified a truncating insertion in the endoplasmic reticulum retention domain of the E3/19K protein (445A mutation) which relocates the protein to the plasma membrane and is responsible for AdT1's enhanced release. E3/19K-445A phenotype does not correlate with the protein's ability to interact with MHC-I or induce apoptosis. Intracellular calcium measurement revealed that the 445A mutation induces extracellular Ca^{2+} influx, deregulating intracellular Ca^{2+} homeostasis and inducing membrane permeabilization, a viroporin-like function. E3/19K-445A mutants also display enhanced antitumoral activity when injected both intratumorally and systemically in different models *in vivo*. Our results indicate that the inclusion of mutation 445A in tumor-selective adenoviruses would be a very powerful tool to enhance their antitumor efficacy. [Cancer Res 2008;68(21):8928–37]

Introduction

Tumor-selective viruses are being engineered to treat cancer (1). Different strategies have been used to render adenovirus tumor specific (2). Results to date have shown a good security/toxicity profile for multiple modes of delivery. Flu-like symptomatology has been reported as the most common toxicity, especially after i.v. delivery, along with transient transaminitis and, occasionally, thrombocytopenia (3). Antitumor effects have also been described after intratumoral or intracavitary injection, and the potential for synergy with chemotherapy is very promising (4). However, systemic antitumoral response rates range only from minimal to moderate after systemic administration (5, 6).

One of the reasons that explain the poor response to oncolytic adenovirus after i.v. administration is the biodistribution profile of adenovirus 5 (Ad5), a non-blood-borne virus that is quickly cleared from the bloodstream after i.v. administration and accumulates in the liver within minutes due to the particular hepatic architecture and vascular system (7, 8). The presence of the host immune

system may also be determinant in the response to oncolytic adenoviruses, although its exact role is not clear, with some discrepancies between preclinical data and clinical results (9, 10). In addition, other biological barriers within the tumor mass (for example, the tumor stroma matrix) also limits adenovirus oncolysis by hindering the spread of the virions (11, 12).

Improving adenovirus potency has been postulated as an important step to overcome all these limitations (13). One approach to render adenoviruses more cytotoxic is arming oncolytic adenoviruses with transgenes that are able to eliminate surrounding cells and favor spreading of the oncolytic effect. With this aim, several proteins have been incorporated into the adenovirus backbone, including the adenovirus death protein (14), p53 (15), different prodrug-converting enzymes (16), and immunomodulators (17). Although successful results have been obtained with some of these constructs, the utility of this strategy has been often limited by the small cloning capacity of most oncolytic adenoviruses after the insertion of the genetic elements required to confer selectivity.

Bioselection of randomly mutagenized adenovirus by repeated passaging in defined conditions can also be used as a strategy for the isolation of mutants that exhibit potent and/or tumor-selective phenotypes. This genetic selection has the potential to assign novel functions to viral genes. For example, new mutants of human Ad5 with enhanced oncolytic activity were isolated after repeated passage of a randomly mutagenized pool in a human colorectal cancer cell line *in vitro* (18). A point mutation that induced a COOH terminal truncation in the i-leader protein, resulting in its early accumulation, was shown to be essential for the mutant phenotype (18). Interestingly, the relevance of such mutations in the i-leader protein has been further confirmed by another study (19).

With the aim of selecting Ad5 mutants with enhanced antitumor activity, we have extended the genetic selection approach by including the *in vivo* tumor environment as selective pressure. A mutant isolated from tumors, AdT1, displayed an increased antitumor activity *in vivo* and large-plaque phenotype *in vitro*. Further characterization showed that AdT1 presented an improved viral release without affecting the overall yield in both human tumor cells and cancer-associated fibroblasts. A combined approach including sequencing and analysis of recombinants revealed that the presence of a mutation in the endoplasmic reticulum retention domain of the E3/19K protein was responsible for the phenotype. We propose that the expression of the mutated form of E3/19K is able to disturb intracellular Ca^{2+} homeostasis and ultimately create membrane lesions that allow enhanced virus release.

Materials and Methods

Cell lines and viruses. Human HEK293, A549, FaDu, SKMel-28, and NP-9 (20) cell lines and hamster pancreatic tumor HP-1 cells (21) were grown in

Note: Supplementary data for this article are available at Cancer Research Online (<http://cancerres.aacrjournals.org/>).

Requests for reprints: Manel Cascallo, IDIBELL-Institut Català d'Oncologia, Av Gran Via s/n km 2,7, L'Hospitalet de Llobregat, 08907 Barcelona, Spain. Phone: 34-93-2607463; Fax: 34-93-2607466; E-mail: mcascallo@iconcologia.net.

©2008 American Association for Cancer Research.
doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-1145

DMEM supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS). CAF1 cells, human carcinoma-associated fibroblasts, were isolated and characterized in our laboratory from an hepatic metastasis of a human colorectal carcinoma and were maintained in DMEM-F12 supplemented with 10% FBS and BD MITO⁺ serum extender (Becton Dickinson). When evaluating effects of extracellular Ca²⁺, CAF1 cells were seeded in fibronectin-coated dishes. To obtain >80% infection, 293, A549, FaDu, DLD-1, SKMel-28, NP-9, CAF1 and HP-1 cells were infected with 5, 20, 25, 15, 25, 30, 45, and 50 transducing units (TU) per cell, respectively. As calcium-containing medium, a Ca²⁺-free medium to which CaCl₂ was added to a final concentration of 1.8 mmol/L was used. Calcium-free medium was supplemented with 0.5 mmol/L EGTA immediately before use. Human Ad5 was obtained from American Type Culture Collection (ATCC). AdTL (AdGFPLuc) has been previously described (22). Oligonucleotides were designed to sequence Ad5 and AdT1 entire viral genomes.

Random mutagenesis and *in vivo* selection. An Ad5 stock was randomly mutagenized with nitrous acid (23) and the 8 min-treated stock (1,000-fold loss of virus viability; average of nine mutations per genome) was chosen for the first round of *in vivo* selection. Mutations were fixed, and the mutagenized stock was subsequently amplified and purified by passage at a high TU per cell in A549 cells to prevent *in vitro* selection of mutants. For each round of *in vivo* selection, 1×10^7 NP-9 cells were injected s.c. into the flanks of male BALB/c *nu/nu* mice. Animal studies were performed in the IDIBELL facility (AAALAC unit 1155) and approved by the IDIBELL's Ethical Committee for Animal Experimentation. Once the tumors reached 100 mm³, mice were injected with PBS, Ad5, or the mutagenized Ad5 stock at 2×10^{10} vp by tail vein. At 4 h postinjection, blood was drawn from the tail and the titer was determined by an anti-hexon staining method. Body weights of the animals were monitored, and tumor volume was calculated as previously described (11). The virus mutants with superior blood persistence were amplified from a blood sample of the mouse that displayed the best tumor growth inhibition and were chosen for the next round of *in vivo* selection. After the fourth round of bioselection, the virus mutants were extracted from the tumor that showed the most pronounced tumor growth inhibition. The AdT1 mutant was isolated from the resulting tumor cell lysate by plaque assay in A549 cells.

Construction of Ad5/AdT1 recombinants and E3/19K modified viruses. Homologous recombination for the generation of modified viruses was performed in yeast. The yeast replication elements and a selectable marker were cloned into pAd5 plasmid (ref. 24; pAd5CAU). Homologous recombination between different fragments of pAd5CAU and AdT1 genome (represented schematically in Fig. 2A) resulted in the generation of the different Ad5/AdT1 recombinants used to map the mutation(s) responsible for the large-plaque phenotype of AdT1. Plasmids pAdE3/19K-445A, pAdE3/19K-445ACS40, pAdE3/19K-KS, pAdE3/19K-CS40, and pAdE3/19K-del (Supplementary Table S1) were constructed by recombination of pAd5CAU with PCR-modified E3/19K sequences, and the incorporated modifications were sequenced. Viruses were generated in 293, propagated in A549, and quantified using the anti-hexon staining-based method using 293 cells (24). Briefly, this method consists in the infection of 293 cells with serial dilutions of a virus sample. Thirty-six hours postinfection, cells were fixed with methanol and incubated with mouse anti-hexon (2Hx-2 hybridoma, ATCC) and Alexa 488-labeled goat anti-mouse (Molecular Probes) during 1 h at 37°C. The similar late protein expression pattern showed by the viruses (Supplementary Fig. S2B) assured this method was suitable for the titration of the mutant viruses generated.

Virus release and production assays. 293, A549, CAF1, NP-9, FaDu, SKMel-28, DLD-1, or HP-1 cells were infected to allow 80% to 100% infection. Three hours later, infection medium was removed and cells were washed twice with PBS and incubated with fresh medium. At the indicated time points a fraction of the supernatant (SN) and the cell-media suspension (CE) were harvested. Viral titers were determined in triplicate according to an anti-hexon staining-based method, as described above. For experiments in which the effects of extracellular calcium were assayed, cells were infected, and medium was removed 24 h later, the cells were washed twice with PBS (-CaCl₂/-MgCl₂) and subsequently incubated with normal or Ca²⁺-free medium.

***In vitro* cytotoxicity assay.** Cytotoxicity assay was performed by seeding 30,000 A549 cells, 10,000 NP-9 cells, or 50,000 DLD-1 cells per well in 96-well plates in DMEM with 5% FBS. Cells were infected with serial dilutions starting with 90 TU/cell for A549, 250 TU/cell for NP-9, and 20 TU/cell for DLD-1 cells. At day 5 postinfection, plates were washed with PBS and stained for total protein content (bicinchoninic acid assay, Pierce Biotechnology) and absorbance was quantified. The TU per cell required to produce 50% inhibition (IC₅₀ value) was estimated from dose-response curves by standard nonlinear regression (GraFit; Erithacus Software), using an adapted Hill equation.

Western blot analysis. A549 cells were either mock-infected or infected to allow >80% infection, and protein cell extracts were prepared 24 h postinfection with Iso-Hi-pH buffer [0.14 mol/L NaCl, 1 mmol/L MgCl₂, 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.5), 0.5% Nonidet P-40]. Protein samples (20 µg/lane) were separated by SDS/PAGE and transferred to membranes. Blots were probed with the following antibodies: anti-E3/19K (ref. 25; Tw1.3 that recognizes a luminal epitope of the protein kindly provided by Dr. Yewdell, NIAID/NIH), anti-E1A (clone 13S-5, Santa Cruz Biotechnology), anti-Ad5 virion proteins (ab6982, Abcam), anti-human poly(ADP-ribose) polymerase (PARP; clone 551024, Becton Dickinson), or anti-adenovirus death protein (ADP; specific for residues 63–77 of the Ad2 ADP sequence kindly provided by Dr. W.S.M. Wold, St. Louis University; ref. 26).

E3/19K and MHC-I membrane expression analysis by fluorescence-activated cell sorting. Cell surface expression of E3/19K and MHC class I in virus-infected cells was analyzed in A549 cells using anti-E3/19K (Tw1.3) and anti-human MHC-I (W6/32, ATCC), respectively. Twenty-four hours postinfection, fluorescence profiles were obtained in triplicate by analyzing 10,000 viable cells by flow cytometry (FACSCalibur, Becton Dickinson) using 488-nm laser and CellQuest Pro software (Becton Dickinson).

Propidium iodide uptake and measurement of intracellular Ca²⁺ concentration. A549 or CAF1 monolayers were infected to obtain 80% infection. Cells were harvested at various times postinfection. For permeability studies, suspensions were incubated with 1 µg/mL propidium iodide (PI; Bender Medsystems) for 15 min at room temperature. The number of permeable cells was determined in triplicate by flow cytometry (FACSCalibur, Becton Dickinson). To determine intracellular Ca²⁺ concentration, cells were incubated with 10 µmol/L Fluo-3 acetoxymethyl ester (AM) and 20 µmol/L Fura-red AM (Invitrogen) indicators, as previously described (27). The loaded A549 cells were analyzed in triplicate by flow cytometry (FACSCalibur, Becton Dickinson).

Evaluation of antitumor efficacy *in vivo*. Pancreatic human NP-9 tumor xenografts were established s.c. into the flanks of BALB/c *nu/nu* mice as described above. To evaluate systemic efficacy of the viruses carrying E3/19K-445A mutation, mice with 100 mm³ tumors ($n = 10$ per group) were treated with a single i.v. injection of PBS, Ad5, AdT1, or AdE3/19K-445A (2×10^{10} vp/mouse in 150 µL PBS). The VP/TU ratio of the purified virus stocks used for the *in vivo* efficacy experiments was similar as shown in Supplementary Table S2. To evaluate intratumoral efficacy, 100 mm³ tumors ($n = 10$ per group) were treated with a single intratumoral injection of PBS, Ad5, AdT1, or AdE3/19K-445A (2×10^9 vp/tumor in 25 µL PBS). To evaluate the efficacy of E3/19K-445A mutants in an immune competent model, HP-1 tumors were induced in the flanks of female 5-wk-old immune competent Syrian (golden) hamsters (*Mesocricetus auratus*) by s.c. inoculation of 1×10^6 cells. Once tumors reached 150 to 170 mm³, hamsters were randomized ($n = 10$ per group), and a single intratumoral injection was performed with Ad5 or AdT1 at 2.5×10^{10} vp/tumor in 25 µL PBS or with PBS. In each model, tumor sizes and animal body weights were recorded and tumor volume and growth were calculated according to the corresponding formulas. The two-tailed Student's *t* test was used for comparing the tumor progression in mice in the different treatment groups.

Intratumoral adenovirus detection. Adenovirus immunofluorescence in hamster tumors was performed as previously described (24). Briefly, OCT-embedded sections from HP-1 tumors obtained at day 29 after virus administration were treated with polyclonal anti-adenovirus (clone Ab6982, Abcam Ltd.) and Alexa Fluor 488-labeled goat anti-rabbit (Molecular Probes) antibodies and counterstained with 4',6-diamino-2-phenylindole. Stained slides were analyzed under a fluorescent microscope (Olympus BX51).

Results

In vivo bioselection of Ad5 mutants with enhanced oncolytic efficacy. A purified stock of wild-type human Ad5 was randomly mutated with nitrous acid as previously described (23). The mutagenized stock was amplified in human lung adenocarcinoma A549 cells and subjected to various rounds of selection *in vivo* in BALB/c *nu/nu* mice harboring s.c. human pancreatic NP-9 tumors to select mutants with improved oncolytic potency (see Materials and Methods). In the fourth round of bioselection, the virus mutants were extracted from the tumor that showed the most pronounced growth inhibition and plaque-purified to isolate clones. One of these clones, AdT1, was further characterized, and the mutations responsible for its phenotype are the main focus of this study.

Characterization of the phenotype of AdT1. To compare the systemic antitumor efficacy of Ad5 and AdT1, mice with s.c. NP-9 tumors were treated with a single i.v. dose of 2×10^{10} vp and the tumor growth was monitored. Mutant AdT1 showed an enhanced antitumor activity compared with Ad5 (Fig. 1A), and this correlated with intratumoral viral replication (not shown).

The enhanced antitumor efficacy displayed by AdT1 *in vivo* was associated with a large-plaque phenotype *in vitro* (Fig. 1B). The plaques of AdT1 in A549 cells appeared earlier and were at least twice as large as the control Ad5 plaques. The AdT1 large-plaque phenotype could result from an increase in the viral yield or an increase in viral release. The measurement of intracellular and extracellular virus in A549 cells showed that AdT1 was released more efficiently from infected cells, whereas the total virus produced was unaffected (Fig. 1C). Because fibroblasts release adenovirus less efficiently than epithelial cells and are relevant target cells in oncolysis of tumors with stroma, we analyzed and confirmed the enhanced release of AdT1 in carcinoma-associated fibroblasts (CAF1; Fig. 1C). This increase in the rate of viral release was also observed in 293 cells and human tumor cell lines from head and neck (FaDu), melanoma (SkMel-28), pancreas (NP-9), and colorectal carcinoma (DLD-1), as well as in hamster pancreatic tumor HP-1 cells (Fig. 1D), confirming that this phenotype was not restricted to the cells used during the bioselection process. The enhanced release also resulted in an

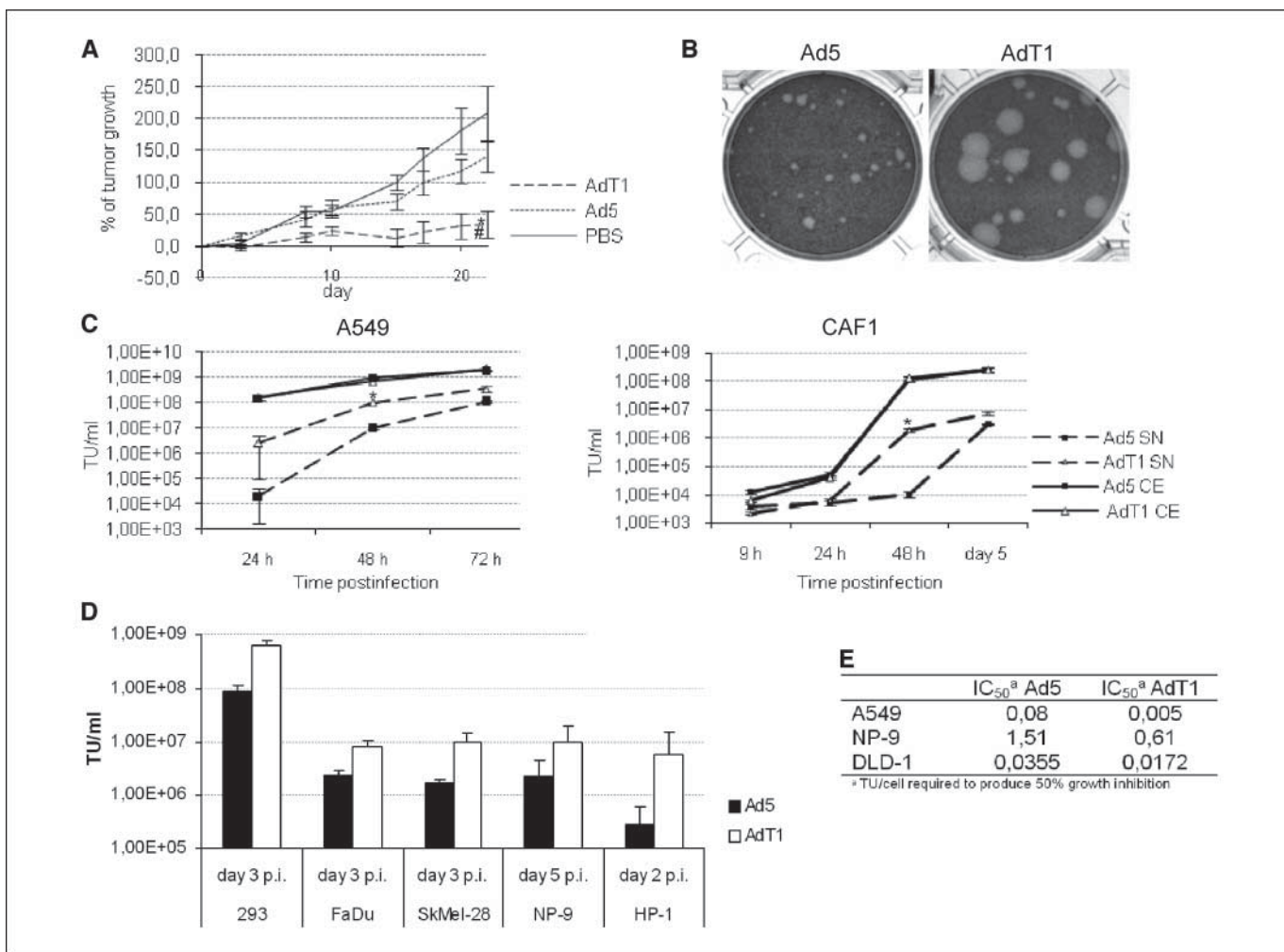


Figure 1. Characterization of the phenotype of AdT1. *A*, NP-9 tumor xenografts were treated i.v. with PBS, Ad5, or AdT1. *Points*, mean percentage of tumor growth ($n = 10$); *bars*, SE. #, significant ($P = 0.03$) compared with the group treated with PBS; *, significant ($P = 0.03$) compared with mice injected with Ad5. *B*, plaque size of Ad5 and AdT1 in A549 cells at day 7 postinfection. *C*, viral production and release kinetics of Ad5 and AdT1 in A549 cells (*left*) and carcinoma-associated fibroblasts (CAF1 cells; *right*). Extracellular (SN) and intracellular (CE) viral content were analyzed at the time points indicated. *, significant ($P = 8.9e-05$ and $P = 0.01$ for A549 and CAF1 cells, respectively) compared with Ad5. *D*, viral release of Ad5 and AdT1 in a panel of different tumor cell lines. Titer of the supernatant at the time point at which AdT1 and Ad5 showed biggest differences for each cell line. *E*, comparative cytotoxicity of Ad5 and AdT1 in A549, NP-9, and DLD-1 tumor cell lines.

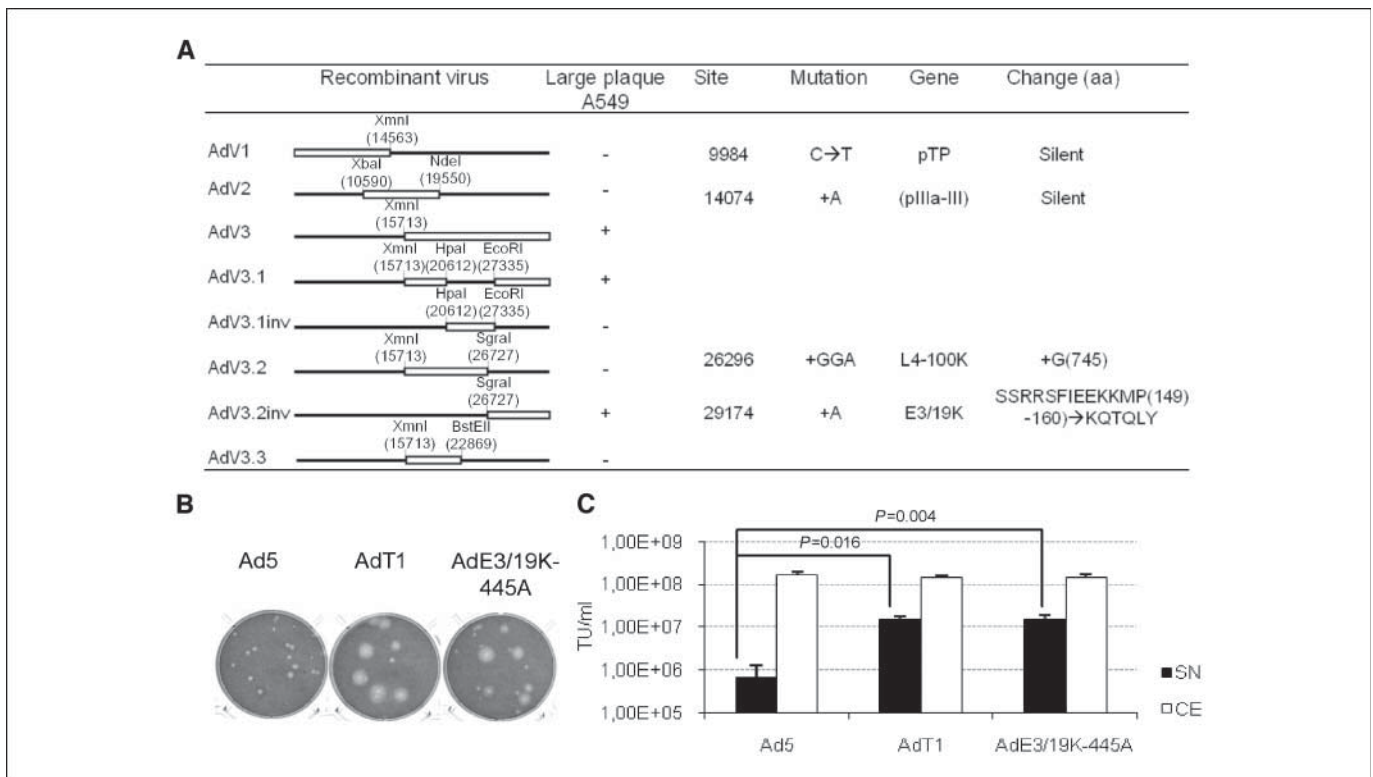


Figure 2. Identification of the mutations responsible for the AdT1 phenotype. *A*, schematic representation of the Ad5/AdT1 recombinants and the mutations present in the AdT1 genome. The fragments of the Ad5 (black) and AdT1 (white) genomes and the enzymes used for the construction of the recombinants are represented, as well as their ability to form large plaques in A549 monolayers. The site and genes affected by the mutations are specified. Nucleotide changes (→) and insertions (+) are indicated. Mutations located between two protein coding regions are indicated in parentheses. *pTP*, preterminal protein. The amino acid (aa) positions affected by the mutation are indicated in parentheses. *B*, plaque morphology of Ad5, AdT1, and AdE3/19K-445A in A549 cells 7 d after infection. *C*, viral release and production of Ad5, AdT1, and AdE3/19K-445A in carcinoma-associated fibroblasts. CAF1 cells were infected, and virus present in the supernatant (SN) and cell extract (CE) was measured 48 h postinfection.

enhanced cytotoxicity, as tested in A549, NP-9, and DLD-1 cells (Fig. 1E). The dominance of the phenotype of AdT1 was confirmed by performing a cell-plaque assay after coinfection with a GFP-expressing E1A-deleted adenoviral vector (Supplementary Fig. S1).

Identification of the mutation(s) responsible for the enhanced viral release of AdT1: E3/19K-445A mutation. We carried out the functional mapping of the AdT1 phenotype and complete sequence analysis of AdT1 genome. The Ad5/AdT1 recombinants mapped the mutation responsible for the large-plaque phenotype to nucleotides 27335 to 35935 of AdT1 (schematically represented in Fig. 2A). The sequence analysis of the genome revealed four mutations (Fig. 2A). Among these, two were silent and one inserted three nucleotides (GGA) in position 26296 of Ad5, which introduced an extra Gly at position 745 of the amino acid sequence of the L4-100K protein. The fourth mutation, found in position 29174, inserted an adenine into position 445 of the nucleotide sequence of the E3/19K protein. Because mutation E3/19K-445A was the only change detected in the smallest fragment of AdT1 that was able to confer large-plaque phenotype, we hypothesized it was responsible for the phenotype. The generation of mutant AdE3/19K-445A proved that this mutation was sufficient to enhance the release of Ad5. This mutation conferred both a large-plaque phenotype in A549 (Fig. 2B) and an enhanced viral release without modifying the viral yield in CAF1 cells (Fig. 2C). With these data, we concluded that

mutation E3/19K-445A was responsible for the enhanced release observed with AdT1.

The change in localization of the E3/19K protein enhances adenovirus release. E3/19K protein is a small glycoprotein coded by the early region E3 of Ad5. The cytoplasmic tail of this protein, affected by mutation E3/19K-445A, contains a dilysine motif essential for the retention of E3/19K in the endoplasmic reticulum (ER; refs. 25, 28). Mutation E3/19K-445A generates a shift in the open reading frame (ORF) that changes the amino acid sequence from position 149 and generates a stop codon at position 154. As a result, E3/19K-445A presents a truncated cytoplasmic tail, which results in the loss of the ER retention signal and is expected to relocate E3/19K to the plasma membrane.

The enhanced viral release observed with AdE3/19K-445A could be due to the loss of function of the E3/19K protein or to the gain of function of this protein when translocated to the cell surface. Two viruses were constructed to test this hypothesis: AdE3/19K-del, which lacks E3/19K expression (nucleotides 28846–29201 of Ad5 were deleted), and AdE3/19K-KS, a mutant different from AdE3/19K-445A which also affects the ER retention domain of this protein (the dilysine motif was substituted for two serines, KK→SS; ref. 29; Supplementary Table S1). As Fig. 3A displays, cell surface expression of the E3/19K was only detected in the cells infected with the viruses that had lost the ER retention signal: AdT1, AdE3/19K-445A, and AdE3/19K-KS. The lack of E3/19K expression in mutant AdE3/19K-del was confirmed by Western blot, as shown in

Fig. 3B. Interestingly, a viral release assay in CAF1 cells showed that AdE3/19K-KS was released 100 times more efficiently than Ad5 (Fig. 3C). The phenocopy of AdT1 and AdE3/19K-445A by AdE3/19K-KS established a direct association between the change of localization of E3/19K and the enhanced rate of viral release and suggested a new function for E3/19K at the cell membrane. By contrast, AdE3/19K-del showed levels of extracellular virus comparable with Ad5, in concordance with previous studies stating that the lack of E3/19K expression does not increase adenovirus release (30).

The enhanced release phenotype of mutant AdE3/19K-445A is not mediated by interaction with MHC-I at the cell surface or by apoptosis. The main function of E3/19K is to bind to and retain the heavy chains of MHC class I in the ER, preventing CTL response against adenoviral infection (25, 28, 31). Consequently, the loss of ER retention of E3/19K-445A inhibits ER retention of MHC-I. We hypothesized that the interaction of E3/19K and MHC-I at the plasma membrane could be triggering the enhanced release observed with AdE3/19K-445A. For this purpose, we constructed mutant AdE3/19K-445ACS40, which contained both the E3/19K-445A mutation and the substitution of a cysteine in position 40 of the amino acid sequence of E3/19K for a serine (C→S-40), which

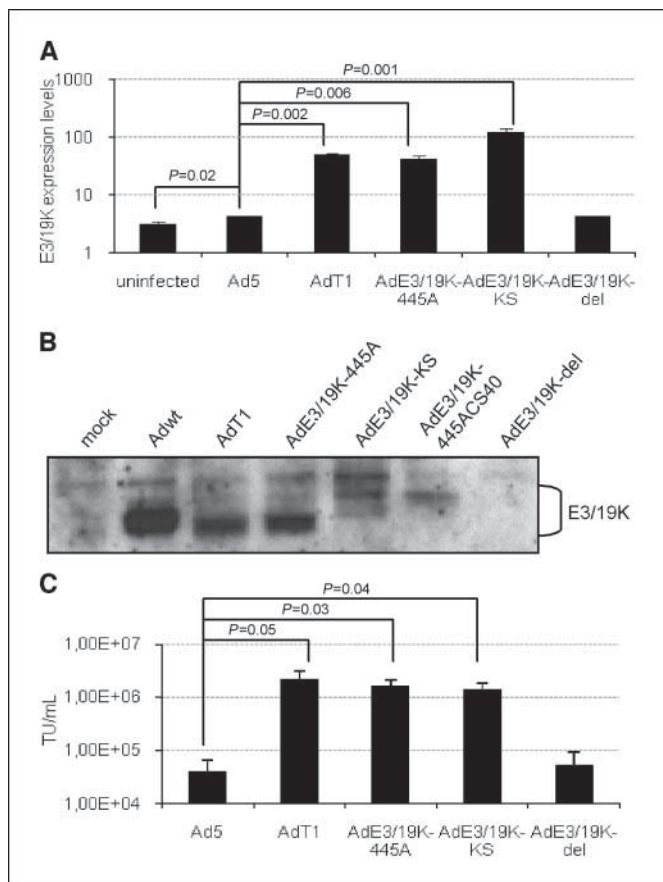


Figure 3. Association of E3/19K localization to the plasma membrane and the phenotype of enhanced release. **A**, cell surface expression of E3/19K protein in A549 cells. Expression of E3/19K in the plasma membrane was analyzed at 24 h postinfection in nonpermeabilized cells by flow cytometry with Tw1.3 antibody. **B**, Western blot detection of E3/19K. A549 cell lysates were processed for E3/19K protein expression 24 h postinfection with the adenovirus mutants indicated. **C**, viral release of Ad5, AdT1, AdE3/19K-445A, AdE3/19K-KS, and AdE3/19K-del in carcinoma-associated fibroblasts. Virus present in the supernatant was measured 48 h postinfection in CAF1.

prevents MHC-I binding (32). As Fig. 4A displays, the analysis of cell surface expression of MHC-I showed that AdE3/19K-445A blocked MHC-I transport to the plasma membrane less efficiently, although it did not reach basal levels of MHC-I expression, as previously described (33). On the other hand, mutant AdE3/19K-445ACS40 showed similar cell surface MHC-I expression as the uninfected cells. This confirms that this mutant is unable to prevent MHC-I transport to the membrane, because it is unable to bind to MHC-I (significant differences compared with AdE3/19K-445A). A viral release assay in CAF1 cells showed that, although AdE3/19K-445ACS40 was unable to bind to MHC-I, it was released earlier into the supernatant (Fig. 4B). This mutant also displayed a large-plaque phenotype in A549 (Supplementary Table S1), proving that the phenotype was not dependent on interaction with MHC-I. Additional evidence suggesting that the AdT1 mutant did not enhance viral release by interacting with MHC-I comes from the enhanced release phenotype of AdT1 in a cell line negative for MHC-I expression, such as DLD-1 (Fig. 1D and Supplementary Table S1).

Adenovirus mutants defective in viral genes that inhibit apoptosis produce a characteristic phenotype similar to that observed with AdT1 and AdE3/19K-445A (34). To determine the levels of apoptosis activation with our mutants, we analyzed PARP cleavage during the viral cycle. As Fig. 4C displays, the level of PARP cleavage in AdT1 and AdE3/19K-445A-infected cells was similar to that seen for Ad5, which shows that these mutants were unable to activate apoptosis. Further confirmation of the apoptosis independence of the AdE3/19K-445A phenotype was gained from viral release experiments in CAF1 cells treated with the broad spectrum caspase inhibitor Q-VD-OPh. Both the viral release and plaque-size of AdE3/19K-445A were not affected by the presence of Q-VD-OPh, proving that the enhanced rate of viral release was not mediated by apoptosis (Fig. 4D; Supplementary Table S1).

The enhanced release of E3/19K-445A-expressing mutants is not mediated by ADP overexpression. ADP is a small glycoprotein coded by the E3 region of Ad5 required for the efficient lysis of adenovirus-infected cells. Its overexpression results in an enhanced release and large-plaque phenotype (14, 30, 35). The expression of this protein is tightly regulated by pre-mRNA processing and some deletion mutations upstream of ADP which affect splicing or polyadenylation sites increase the expression of its early transcripts (26, 36). The proximity of E3/19K and ADP ORF led us to study a possible ADP overexpression caused by the E3/19K-445A mutation. No differences were found in the pattern of E3 transcripts (Supplementary Fig. S2A). Early ADP transcripts (bands *d* and *e*) were not detected 8 hours postinfection for neither Ad5 nor AdT1 but were greatly amplified 24 hours postinfection (bands *d'* and *e'*), as previously described (26). Western blot detection of ADP expression in the different mutants confirmed these results and dismissed ADP overexpression in AdT1 and AdE3/19K-445A-infected cells (Supplementary Fig. S2B). Furthermore, no differences in E1A nor adenovirus late protein expression were found for the different virus mutants (Supplementary Fig. S2B).

Mutant AdE3/19K-445A enhances cell permeability and increases intracellular [Ca²⁺]. Some viruses actively enhance cell permeability during viral infection by the expression of viroporins, facilitating the influx of extracellular ions, which can enhance viral release through yet unknown mechanisms (37, 38). To study a putative viroporin-like function of E3/19K-445A, we analyzed cell permeability and intracellular Ca²⁺ concentration throughout the viral cycle. AdE3/19K-445A enhanced cell permeability at earlier

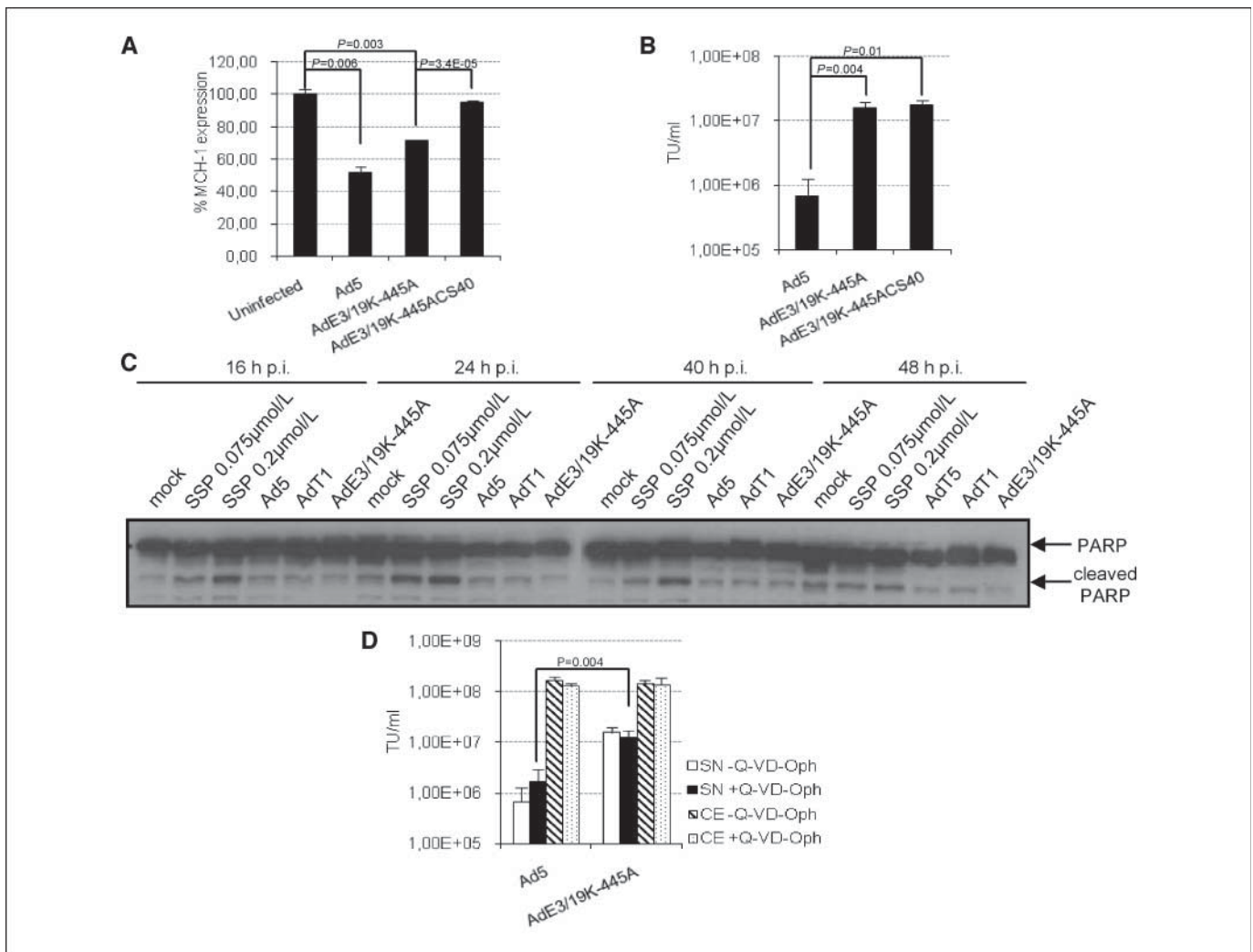


Figure 4. MHC-I binding and apoptosis independence of the enhanced release phenotype of AdT1. *A*, fluorescence-activated cell sorting analysis of MHC-I cell surface expression in mutant and Ad5-infected human A549 cells. Cells were infected and, 24 h later, exposed to the monoclonal antibody W6/32. Cell surface levels of class I antigens are expressed relative to that of mock-infected cells, which were set to 100%. *B*, viral release assay of Ad5, AdE3/19K-445A, and AdE3/19K-445ACS40 in carcinoma-associated fibroblasts. Cells were infected, and the virus present in the supernatant (SN) was measured 48 h postinfection. *C*, Western blot detection of PARP cleavage in mutant and Ad5-infected A549 cells. Mock-infected cells or infected with Ad5, AdT1, or AdE3/19K-445A or treated with 0.075 μmol/L and 0.2 μmol/L of staurosporine (SSP) as a positive control of apoptosis induction were analyzed. The cell lysates were processed for detection of PARP cleavage at 16, 24, 40, and 48 h postinfection. *D*, viral release and production of Ad5 and AdE3/19K-445A in carcinoma-associated fibroblasts in the presence of a broad spectrum apoptosis inhibitor, Q-VD-Oph. Cells were infected and incubated in the presence or absence of 20 μmol/L Q-VD-Oph. The extracellular (SN) and intracellular (CE) viral content was measured 48 h postinfection.

stages of infection (Fig. 5A), and this increase in cell permeability was associated with an increase in the intracellular Ca^{2+} concentration (Fig. 5B). This enhanced permeability for AdE3/19K-445A-infected cells was also observed in CAF1 (Fig. 5C). To test whether the influx of Ca^{2+} was the cause of the enhanced rate of viral release, we performed a viral release and production assay in CAF1 cells in the presence or absence of extracellular Ca^{2+} . Although the lack of Ca^{2+} in the extracellular medium affected the viral yield of both viruses, the differences in viral release between Ad5 and AdE3/19K-445A disappeared in the absence of Ca^{2+} (Fig. 5D), proving that the enhanced release of AdE3/19K-445A was triggered, at least in part, by Ca^{2+} influx.

Evaluation of *in vivo* efficacy. Mice carrying NP-9 pancreatic tumors were treated with a single i.v. dose of Ad5 or AdE3/19K-445A at 2×10^{10} vp/mouse. The enhanced antitumor activity shown by AdE3/19K-445A compared with Ad5 proves that the 445A

mutation is not only responsible for the enhanced release and cytotoxicity of AdT1 *in vitro* but also for the gain of oncolytic effect *in vivo* (Fig. 6A). In a second model, we assessed the comparative *in vivo* efficacy of Ad5, AdT1, and AdE3/19K-445A with a single intratumoral injection of virus into NP-9 s.c. tumors. Even in such conditions, in which we potentiate the amount of Ad5 in the tumor, both the AdT1 and AdE3/19K-445A-treated tumors responded better with respect to Ad5 (Fig. 6B). We also performed a third *in vivo* experiment in Syrian hamsters that has been described as an immunocompetent model wherein human adenovirus is able to replicate (Fig. 6C). Hamsters with s.c. pancreatic HP-1 tumors were treated intratumorally at a dose of 2.5×10^{10} vp/tumor. Both Ad5 and AdT1 displayed significant antitumoral activity, although no statistical significance among these groups was observed. Analysis of HP-1 tumor sections revealed that despite the presence of extensive areas of necrosis in all experimental groups, tumors

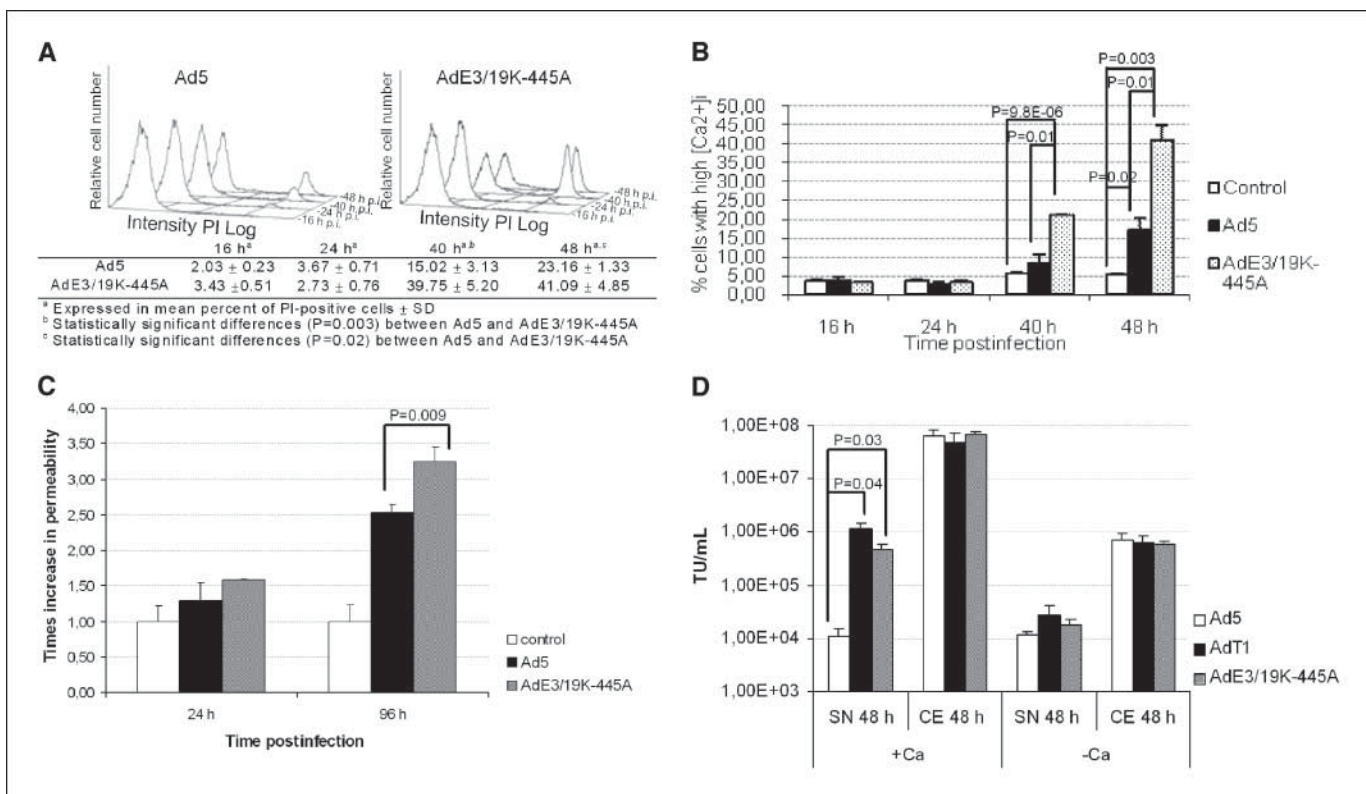


Figure 5. Adenovirus mutant AdE3/19K-445A enhances membrane permeabilization and increases intracellular Ca^{2+} concentration. **A**, kinetics of cell permeability of Ad5-infected and AdE3/19K-445A-infected A549 cells. Cells were infected and, at the indicated time points, trypsinized and incubated with PI. The number of permeable cells (PI-positive cells) was determined. The intensity of PI for infected cells is represented in a logarithmic scale. **B**, kinetics of cytosolic free Ca^{2+} during Ad5 and AdE3/19K-445A infection. A549 cells infected with Ad5 or AdE3/19K-445A were incubated at the indicated time points with Fluo-3 AM and Fura-red AM. The Fluo-3/Fura-red ratio for each cell was analyzed, and cells were divided into a population with a high ratio (high intracellular $[\text{Ca}^{2+}]$) or a low ratio (low intracellular $[\text{Ca}^{2+}]$). Percentage of cells with high intracellular calcium concentration is plotted for each time point. **C**, cell permeability of Ad5-infected and AdE3/19K-445A-infected CAF1 cells. **D**, viral release and production of Ad5, AdT1, and AdE3/19K-445A in the presence or absence of extracellular Ca^{2+} in carcinoma-associated fibroblasts. After infection, cells were incubated in normal or Ca^{2+} -free medium, and extracellular and intracellular viral contents were measured 48 h postinfection.

injected with AdT1 showed a more diffuse staining compared with Ad5, suggesting an improved spread of E3/19K-445A mutant virus (Fig. 6D).

Discussion

Improving the antitumor potency of current oncolytic adenoviruses represents one of the major challenges to obtain systemic therapeutic effect in clinical trials. Bioselection of randomly mutagenized pools of human Ad5 by repeated passaging under a predefined set of conditions is a classic virology strategy that has been recently postulated as a powerful method to develop more potent adenoviruses (18, 19). We hypothesized that the passage of Ad5 random mutants in an *in vivo* murine model of human tumors would provide a selective pressure environment closer to human tumors in the clinical setting, where the presence of a three-dimensional tumor stroma, the host immune system, and the proliferating status of tumor cells differ from those encountered in *in vitro* cell cultures.

By using this approach, we have isolated a new mutant virus, AdT1, which displays an enhanced antitumor activity when injected systemically in mice carrying s.c. human tumors. *In vitro* characterization revealed that AdT1 displays a large-plaque phenotype, which correlates with an increased cytotoxicity and release of viral progeny after replication, and a total viral yield not modified with respect to Ad5. Interestingly, the phenotype is not

restricted to the pancreatic tumors where the bioselection process was developed, but the increased progeny release is also evident in different tumor cell types, including melanoma, lung, head and neck, and colorectal adenocarcinomas. Previously described adenoviral mutants with large-plaque phenotype include mutants in E1B/19K, in which E1A-induced apoptosis is not blocked (39), and premature cell death may lead to a reduced viral production. On the other hand, mutants that overexpress the adenovirus death protein (14, 35) or that express COOH truncating forms of the i-leader protein (18, 19) also display large-plaque phenotype, improving viral release without affecting the total yield. A double strategy, including the generation of Ad5/AdT1 recombinants and complete genome sequencing, allowed us to conclude that the alteration responsible for the AdT1-phenotype was the insertion of one nucleotide in the E3/19K coding region (mutation E3/19K-445A), subsequently leading to the COOH truncation of the protein and loss of its ER retention signal. The E3/19K glycoprotein retains the class I MHC heavy chain in the ER (40, 41) and prevents tapasin processing of class I MHC-bound peptides (33). However, to date, it has never been postulated as capable of modifying viral cycle kinetics and its functions are assumed to be nonessential for adenovirus growth *in vitro* (42), which has led to its deletion in many oncolytic adenoviruses (2).

Our studies show that the translocation of E3/19K-445A to the plasma membrane is the determinant for the enhanced release phenotype of AdT1 and AdE3/19K-445A. Other mutants that also

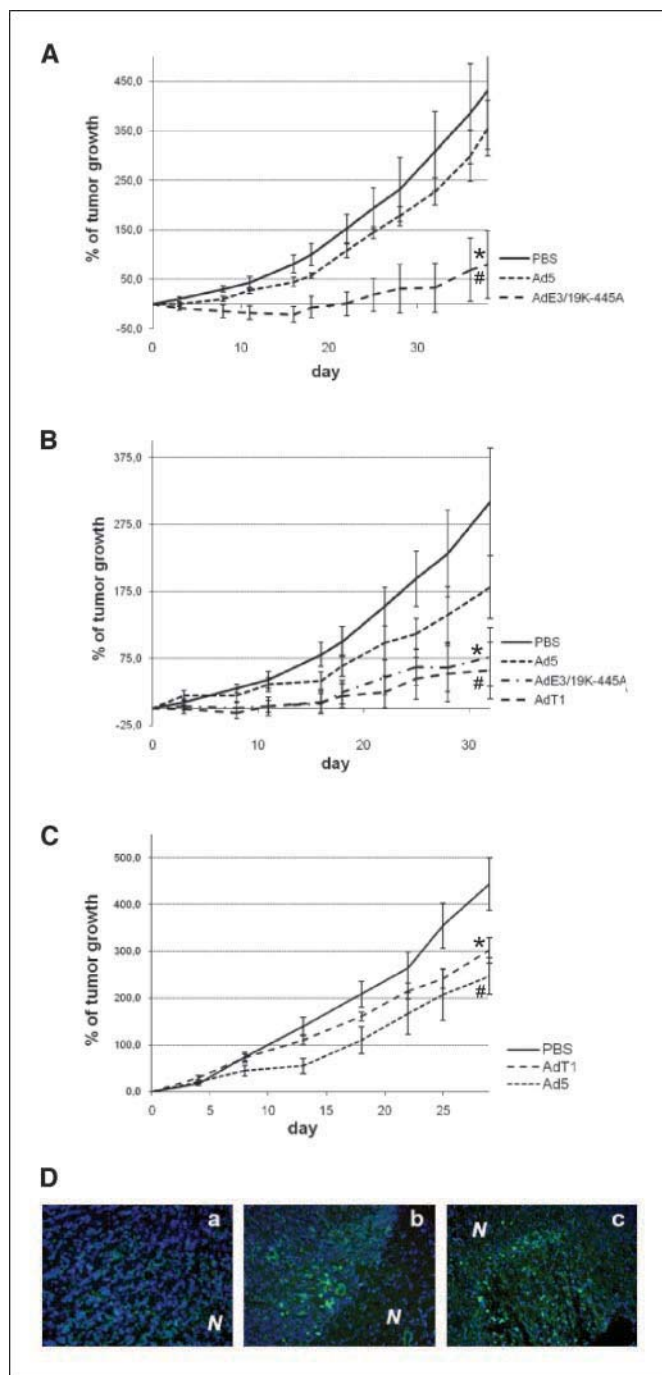


Figure 6. *In vivo* efficacy. **A**, NP-9 s.c. tumor xenografts were treated i.v. with PBS, Ad5, or AdE3/19K-445A. Points, mean percentage of tumor growth ($n = 10$); bars, SE. #, significant ($P = 0.03$) compared with the group treated with PBS; *, significant ($P = 0.008$) compared with mice injected with Ad5. **B**, NP-9 tumor xenografts were treated intratumorally with PBS, Ad5, AdT1, or AdE3/19K-445A. #, significant ($P = 0.003$) compared with tumors injected with PBS; *, significant ($P = 0.002$) compared with tumors injected with PBS. **C**, Syrian hamsters with s.c. HP-1 tumors were treated intratumorally with PBS, Ad5, or AdT1. Columns, mean percentage of tumor growth ($n = 10$); bars, SE. #, significant ($P = 0.01$) compared with tumors injected with PBS; *, significant ($P = 0.04$) compared with tumors injected with PBS. **D**, adenovirus intratumoral replication assessed by adenovirus detection in HP-1 pancreatic tumors grown s.c. in immunocompetent hamsters. Frozen sections of tumors obtained at day 29 after intratumoral injection of PBS (a), or 2.5×10^{10} vp of Ad5 (b) or AdT1 mutant (c) were treated with an anti-adenovirus antibody and counterstained with 4',6'-diamidino-2-phenylindole ($\times 200$). Sections taken from tumors treated with AdT1 displayed a more diffuse staining for adenovirus presence compared with Ad5-injected ones (green dots). N, necrotic areas.

induce a change of localization of E3/19K to the cell membrane by different genetic alterations, such as AdE3/19K-KS, also phenocopy the enhanced release of AdT1. This rules out the possibility that the precise E3/19K-445A alteration provokes a change in the complex splicing balance of the E3 region, leading to differential expression of ADP and enhanced cell death, as found with other E3 mutants (36). In fact, analysis of E3-specific mRNAs does not suggest any imbalance between the levels of the different transcripts after AdT1 infection with respect to Ad5. Furthermore, protein levels of ADP, E1A, and major structural proteins are not modified in E3/19K-445A containing adenoviruses. Overall, these data suggest that the viral cycle of AdT1 is only affected in its latest events, i.e., the plasma membrane permeabilization and the mutant virion release.

How E3/19K-445A relocation improves adenovirus release is not clear at the present. This function is not related to the ability of E3/19K to bind MHC-I, its canonical target, but the presence of the mutation confers the protein the ability to initiate a new pathway. Apoptosis induction seems not to be the basis of the enhanced spreading of the E3/19K-445A mutants, as is the case for other large-plaque mutant adenoviruses (39). Interestingly, our results provide evidence that infection with E3/19K-445A expressing adenoviruses disrupts intracellular Ca^{2+} gradients maintained by the plasma and ER membranes, leading to an increase in the cytoplasmic calcium levels. Furthermore, the requirement for extracellular Ca^{2+} availability for the enhanced release phenotype of AdT1 suggests that such increases in intracellular calcium are due, at least in part, to the influx of extracellular calcium. Increases in intracellular calcium have been shown to be involved in animal virus-induced cytopathic effects and cell killing (43). Protein 2B from coxsackievirus, a protein with viroporin function, gradually induces the influx of extracellular Ca^{2+} , and release of Ca^{2+} from ER stores to permeabilize the plasma membrane and ultimately cause membrane lesions that allow the release of virus progeny (38). Interestingly, wild-type E3/19K is capable of mobilizing the ER pool of Ca^{2+} through an indirect mechanism (29). Although a direct role in Ca^{2+} mobilization by E3/19K-445A warrants experiments with the protein being autonomously expressed, we hypothesize that the mutant E3/19K acts functionally as a viroporin. Viroporins are nonessential, virally encoded, small membrane proteins that form selective channels in membranes, allowing the diffusion of ions and small molecules. Their deletion affects mainly the assembly and exit of virions (37). Their functions are related to both the modification of cell permeability to ions and membrane destabilization. The use of viroporins to promote progeny release is common to several families of viruses, such as picornavirus (38, 44), retrovirus (45), and orthomyxoviruses (46). In this context, our results suggest that, as a consequence of the selective pressure exerted in human xenografted tumors *in vivo*, adenovirus has evolved to incorporate an alternative and more efficient mechanism of release, which it lacks in its native form (where it uses ADP as the main mechanism), but that other animal viruses have previously selected. Moreover, the fact that the mutation selected in the current adenovirus bioselection process affects one of the main limitations found in oncolytic viruses suggests that pressure encountered in the environment of human tumors *in vivo* may be particularly relevant. Curiously, the latter stages in the viral cycle seem to be more prone to optimization within the tumor milieu. Further insight into the mechanism of release of E3/19K-COOH terminal truncated mutants could provide additional clues to understand the poorly characterized mechanism of release of native adenovirus modulation.

In terms of the immune response modulation, the E3/19K-445A form differs from its wild-type counterpart in its ability to bind and retain MHC class I molecules, but it is expected to retain the tapasin inhibition ability that wild-type E3/19K possesses. Mutants with truncated COOH terminal forms of the protein showed the ability to delay by 10-fold the maturation of class I molecules because they are still able to interact with TAP and interfere with tapasin function (33), and T1 mutants should behave similarly. More recently, it has been reported that E3/19K is additionally involved in evasion of natural killer (NK) cell recognition through its ability to interact with MHC-I chain-related proteins A and B (47). Although such function is impaired for E3/19K-445A protein, enhanced antitumoral activity of AdE3/19K-445A mutants obtained in different *in vivo* models in mice, where NK function is present, suggest that the lack of such function can be efficiently bypassed, at least in the particular environment associated to tumors. Further experiments in more immunocompetent models are necessary to establish the exact immunologic implications associated with the presence of the 445A mutation.

Transcription of E3 proteins is mainly regulated by E1A expression through ATF and AP-1 boxes within the E3 promoter (48), implying that the enhanced release phenotype associated with the expression of the mutant version of E3/19K is restricted to cells where E1A activation is permitted. We are currently generating conditional replicating adenoviruses that include the E3/19K-445A protein in the backbone of tumor promoter-driven E1A-regulated adenoviruses, such as ICOVIR-5 (11, 49), with the aim of increasing its ability to spread intratumorally. Interestingly, the increase in progeny release of AdT1 and AdE3/19K-445A mutants is specially noted in cancer-associated fibroblasts, a perpetually activated

fibroblast population within desmoplastic lesions that are associated with malignant tumors (50). The release of E3/19K-445A mutant progeny occurs 3 days earlier with respect to that of Ad5 in the same cell population. Tumor stroma, composed of the extracellular matrix and mesenchymal cells, has been considered as a barrier to the efficient intratumoral diffusion of viruses (11, 12). Although the ability of oncolytic viruses to replicate in tumor-associated fibroblasts will depend on the selectivity mechanism in which the virus is based, the proliferative status of such fibroblasts (51) should allow efficient replication of pRB-dependent adenoviruses and the inclusion of E3/19K-445A mutation in ICOVIR-5 would provide the virus the ability to bypass fibroblast-mediated barriers.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Acknowledgments

Received 3/26/2008; revised 7/25/2008; accepted 8/25/2008.

Grant support: Mutua Madrileña Medical Research Foundation (Spain), Departament d'Universitats, Recerca i Societat de la Informació from Generalitat de Catalunya grant 2005 SGR 00727, and European Union 6th framework project research contract 18700 (Therapox; R. Alemany). R. Alemany belongs to the Network of Cooperative Research on Cancer (C03-10), Instituto de Salud Carlos III of the Ministerio de Sanidad y Consumo, Government of Spain.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

We thank Eduard Serra, Blanca Luena for her technical assistance in animal experiments, Dr. J.W. Yewdell (Laboratory of Viral Diseases, NIAID, NIH) and Dr. W.S.M. Wold (St. Louis University) for providing Tw1.3. and anti-ADP antibodies, respectively, and Lynda Coughlan for the extensive revision of this manuscript.

References

- Liu TC, Galanis E, Kirn D. Clinical trial results with oncolytic virotherapy: a century of promise, a decade of progress. *Nat Clin Pract Oncol* 2007;4:101-17.
- Alemany R. Cancer selective adenoviruses. *Mol Aspects Med* 2007;28:42-58.
- Aghi M, Martuza RL. Oncolytic viral therapies - the clinical experience. *Oncogene* 2005;24:7802-16.
- Chu RL, Post DE, Khuri FR, Van Meir EG. Use of replicating oncolytic adenoviruses in combination therapy for cancer. *Clin Cancer Res* 2004;10:5299-312.
- Hamid O, Varterasian ML, Wadler S, et al. Phase II trial of intravenous CI-1042 in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2003;21:1498-504.
- Small EJ, Carducci MA, Burke JM, et al. A phase I trial of intravenous CG7870, a replication-selective, prostate-specific antigen-targeted oncolytic adenovirus, for the treatment of hormone-refractory, metastatic prostate cancer. *Mol Ther* 2006;14:107-17.
- Alemany R, Suzuki K, Curiel DT. Blood clearance rates of adenovirus type 5 in mice. *J Gen Virol* 2000;81:2605-9.
- Bernt KM, Ni S, Gaggari A, et al. The effect of sequestration by nontarget tissues on anti-tumor efficacy of systemically applied, conditionally replicating adenovirus vectors. *Mol Ther* 2003;8:746-55.
- Muruve DA. The innate immune response to adenovirus vectors. *Hum Gene Ther* 2004;15:1157-66.
- Wilson JM. Adenoviruses as gene-delivery vehicles. *N Engl J Med* 1996;334:1185-7.
- Cascallo M, Alonso MM, Rojas JJ, et al. Systemic toxicity-efficacy profile of ICOVIR-5, a potent and selective oncolytic adenovirus based on the pRB pathway. *Mol Ther* 2007;15:1607-15.
- Sauthoff H, Hu J, Maca C, et al. Intratumoral spread of wild-type adenovirus is limited after local injection of human xenograft tumors: virus persists and spreads systemically at late time points. *Hum Gene Ther* 2003;14:425-33.
- Wein LM, Wu JT, Kirn DH. Validation and analysis of a mathematical model of a replication-competent oncolytic virus for cancer treatment: implications for virus design and delivery. *Cancer Res* 2003;63:1317-24.
- Doronin K, Toth K, Kuppaswamy M, et al. Tumor-specific, replication-competent adenovirus vectors over-expressing the adenovirus death protein. *J Virol* 2000;74:6147-55.
- van Beusechem VW, van den Doel PB, Grill J, Pinedo HM, Gerritsen WR. Conditionally replicative adenovirus expressing p53 exhibits enhanced oncolytic potency. *Cancer Res* 2002;62:6165-71.
- Wildner O, Blaese RM, Morris JC. Therapy of colon cancer with oncolytic adenovirus is enhanced by the addition of herpes simplex virus-thymidine kinase. *Cancer Res* 1999;59:410-3.
- Bristol JA, Zhu M, Ji H, et al. *In vitro* and *in vivo* activities of an oncolytic adenoviral vector designed to express GM-CSF. *Mol Ther* 2003;7:755-64.
- Yan W, Kitzes G, Dormishian F, et al. Developing novel oncolytic adenoviruses through bioselection. *J Virol* 2003;77:2640-50.
- Subramanian T, Vijayalingam S, Chinnadurai G. Genetic identification of adenovirus type 5 genes that influence viral spread. *J Virol* 2006;80:2000-12.
- Villanueva A, Garcia C, Paules AB, et al. Disruption of the antiproliferative TGF- β signaling pathways in human pancreatic cancer cells. *Oncogene* 1998;17:1969-78.
- Batra SK, Metzgar RS, Worlock AJ, Hollingsworth MA. Expression of the human MUC1 mucin cDNA in a hamster pancreatic tumor cell line HP-1. *Int J Pancreatol* 1992;12:271-83.
- Alemany R, Curiel DT. CAR-binding ablation does not change biodistribution and toxicity of adenoviral vectors. *Gene Ther* 2001;8:1347-53.
- Williams JF, Gharpure M, Ustacelebi S, McDonald S. Isolation of temperature-sensitive mutants of adenovirus type 5. *J Gen Virol* 1971;11:95-101.
- Cascallo M, Gros A, Bayo N, et al. Deletion of VAI and VAIL RNA genes in the design of oncolytic adenoviruses. *Hum Gene Ther* 2006;17:929-40.
- Cox JH, Bennink JR, Yewdell JW. Retention of adenovirus E19 glycoprotein in the endoplasmic reticulum is essential to its ability to block antigen presentation. *J Exp Med* 1991;174:1629-37.
- Tollefson AE, Scaria A, Saha SK, Wold WS. The 11,600-MW protein encoded by region E3 of adenovirus is expressed early but is greatly amplified at late stages of infection. *J Virol* 1992;66:3633-42.
- Burchiel SW, Edwards BS, Kuckuck FW, et al. Analysis of free intracellular calcium by flow cytometry: multi-parameter and pharmacologic applications. *Methods* 2000;21:221-30.
- Jackson MR, Nilsson T, Peterson PA. Retrieval of transmembrane proteins to the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* 1993;121:317-33.
- Pahl HL, Sester M, Burgert HG, Baeuerle PA. Activation of transcription factor NF- κ B by the adenovirus E3/19K protein requires its ER retention. *J Cell Biol* 1996;132:511-22.
- Tollefson AE, Ryerse JS, Scaria A, Hermiston TW, Wold WS. The E3-11.6-kDa adenovirus death protein (ADP) is required for efficient cell death: characterization of cells infected with adp mutants. *Virology* 1996;220:152-62.
- Hermiston TW, Tripp RA, Sparer T, Gooding LR, Wold WS. Deletion mutation analysis of the adenovirus type 2 E3-19K protein: identification of sequences within the endoplasmic reticulum luminal domain that are required for class I antigen binding and protection from adenovirus-specific cytotoxic T lymphocytes. *J Virol* 1993;67:5289-98.
- Sester M, Burgert HG. Conserved cysteine residues within the E3/19K protein of adenovirus type 2 are

- essential for binding to major histocompatibility complex antigens. *J Virol* 1994;68:5423–32.
33. Bennett EM, Bennink JR, Yewdell JW, Brodsky FM. Cutting edge: adenovirus E19 has two mechanisms for affecting class I MHC expression. *J Immunol* 1999;162:5049–52.
34. White E, Grodzicker T, Stillman BW. Mutations in the gene encoding the adenovirus early region 1B 19,000-molecular-weight tumor antigen cause the degradation of chromosomal DNA. *J Virol* 1984;52:410–9.
35. Tollefson AE, Scaria A, Ying B, Wold WS. Mutations within the ADP (E3-11.6K) protein alter processing and localization of ADP and the kinetics of cell lysis of adenovirus-infected cells. *J Virol* 2003;77:7764–78.
36. Scaria A, Wold WS. Fine-mapping of sequences that suppress splicing in the E3 complex transcription unit of adenovirus. *Virology* 1994;205:406–16.
37. Gonzalez ME, Carrasco L. Viroporins. *FEBS Lett* 2003;552:28–34.
38. van Kuppeveld FJ, Hoenderop JG, Smeets RL, et al. Coxsackievirus protein 2B modifies endoplasmic reticulum membrane and plasma membrane permeability and facilitates virus release. *EMBO J* 1997;16:3519–32.
39. Pilder S, Logan J, Shenk T. Deletion of the gene encoding the adenovirus 5 early region 1b 21,000-molecular-weight polypeptide leads to degradation of viral and host cell DNA. *J Virol* 1984;52:664–71.
40. Andersson M, Paabo S, Nilsson T, Peterson PA. Impaired intracellular transport of class I MHC antigens as a possible means for adenoviruses to evade immune surveillance. *Cell* 1985;43:215–22.
41. Burgert HG, Kvist S. An adenovirus type 2 glycoprotein blocks cell surface expression of human histocompatibility class I antigens. *Cell* 1985;41:987–97.
42. Bhat BM, Wold WS. A small deletion distant from a splice or polyadenylation site dramatically alters pre-mRNA processing in region E3 of adenovirus. *J Virol* 1987;61:3938–45.
43. Chami M, Oules B, Paterlini-Brechot P. Cytobiological consequences of calcium-signaling alterations induced by human viral proteins. *Biochim Biophys Acta* 2006;1763:1344–62.
44. de Jong AS, Schrama IW, Willems PH, et al. Multimerization reactions of coxsackievirus proteins 2B, 2C and 2BC: a mammalian two-hybrid analysis. *J Gen Virol* 2002;83:783–93.
45. Gonzalez ME, Carrasco L. The human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein enhances membrane permeability. *Biochemistry* 1998;37:13710–9.
46. Guinea R, Carrasco L. Influenza virus M2 protein modifies membrane permeability in *E. coli* cells. *FEBS Lett* 1994;343:242–6.
47. McSharry BP, Burgert HG, Owen DP, et al. Adenovirus E3/19K promotes evasion of NK cell recognition by intracellular sequestration of the NKG2D ligands major histocompatibility complex class I chain-related proteins A and B. *J Virol* 2008;82:4585–94.
48. Akusjarvi G. Proteins with transcription regulatory properties encoded by human adenoviruses. *Trends Microbiol* 1993;1:163–70.
49. Alonso MM, Cascallo M, Gomez-Manzano C, et al. ICOVIR-5 shows E2F1 addiction and potent antiangioma effect *in vivo*. *Cancer Res* 2007;67:8255–63.
50. Kalluri R, Zeisberg M. Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer* 2006;6:392–401.
51. Hasebe T, Sasaki S, Imoto S, Ochiai A. Proliferative activity of intratumoral fibroblasts is closely correlated with lymph node and distant organ metastases of invasive ductal carcinoma of the breast. *Am J Pathol* 2000;156:1701–10.



MINISTERIO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA



Oficina Española de Patentes y Marcas

INSTANCIA DE SOLICITUD

NÚMERO DE SOLICITUD



FECHA Y HORA DE PRESENTACIÓN EN LA O.E.P.M.

FECHA Y HORA PRESENTACIÓN EN LUGAR DISTINTO O.E.P.M.

(4) LUGAR DE PRESENTACIÓN: **MADRID (correo certif.)** CÓDIGO **28**

(1) MODALIDAD:

PATENTE DE INVENCION **MODELO DE UTILIDAD**

(2) TIPO DE SOLICITUD:

- ADICIÓN A LA PATENTE
- SOLICITUD DIVISIONAL
- CAMBIO DE MODALIDAD
- TRANSFORMACIÓN SOLICITUD PATENTE EUROPEA
- PCT: ENTRADA FASE NACIONAL

(3) EXP. PRINCIPAL O DE ORIGEN:

MODALIDAD
N° SOLICITUD
FECHA SOLICITUD

(5) SOLICITANTE (S): APELLIDOS O DENOMINACIÓN SOCIAL

FUNDACIÓ PRIVADA INSTITUT D'INVESTIGACIÓ BIOMÈDICA DE BELLVITGE INSTITUT CATALÀ D'ONCOLOGIA

NOMBRE

NACIONALIDAD	CÓDIGO PAÍS	DNICIF	CNAE	PYME
ESPAÑOLA	ES	G58863317		
ESPAÑOLA	ES	Q5856383-D		

(6) DATOS DEL PRIMER SOLICITANTE:

DOMICILIO **Av. Gran Via Hospitalet, 199**
LOCALIDAD **Hospitalet de Llobregat**
PROVINCIA **BARCELONA**
PAÍS RESIDENCIA **ESPAÑA**
NACIONALIDAD **ESPAÑOLA**

TELÉFONO **93 260 7411**
FAX **93 260 7776**
CORREO ELECTRÓNICO **otri@idibell.cat**
CÓDIGO POSTAL **08907**
CÓDIGO PAÍS **ES**
CÓDIGO PAÍS **ES**

(7) INVENTOR (ES):

APELLIDOS

NOMBRE

NACIONALIDAD

CÓDIGO PAÍS

GUEDÁN CARRIÓ
CASCALLÓ PIQUERAS
ALEMANY BONASTRE

SÓNIA
MANEL MARÍA
RAMON

ESPAÑOLA
ESPAÑOLA
ESPAÑOLA

ES
ES
ES

(8) EL SOLICITANTE ES EL INVENTOR

EL SOLICITANTE NO ES EL INVENTOR O ÚNICO INVENTOR

(9) MODO DE OBTENCIÓN DEL DERECHO:

INVENC. LABORAL CONTRATO SUCESIÓN

(10) TÍTULO DE LA INVENCION:

Adenovirus oncolíticos para el tratamiento del cáncer

(11) EFECTUADO DEPÓSITO DE MATERIA BIOLÓGICA:

SI NO

(12) EXPOSICIONES OFICIALES: LUGAR

FECHA

(13) DECLARACIONES DE PRIORIDAD:

PAÍS DE ORIGEN

CÓDIGO PAÍS

NÚMERO

FECHA

(14) EL SOLICITANTE SE ACOGE AL APLAZAMIENTO DE PAGO DE TASAS PREVISTO EN EL ART. 162. LEY 11/86 DE PATENTES

(15) AGENTE /REPRESENTANTE: NOMBRE Y DIRECCIÓN POSTAL COMPLETA. (SI AGENTE P.I., NOMBRE Y CÓDIGO) (RELLENSE, ÚNICAMENTE POR PROFESIONALES)

PASCUAL SEGURA CAMARA (agente 764/1, colegiado 528). Centro de Patentes de la UB. Baldri Reixac, 4. 08028 BARCELONA

(16) RELACIÓN DE DOCUMENTOS QUE SE ACOMPAÑAN:

- DESCRIPCIÓN N° DE PÁGINAS: **25**
- N° DE REIVINDICACIONES: **20**
- DIBUJOS. N° DE PÁGINAS: **9**
- LISTA DE SECUENCIAS N° DE PÁGINAS: **6**
- RESUMEN
- DOCUMENTO DE PRIORIDAD
- TRADUCCIÓN DEL DOCUMENTO DE PRIORIDAD
- DOCUMENTO DE REPRESENTACIÓN
- JUSTIFICANTE DEL PAGO DE TASA DE SOLICITUD
- HOJA DE INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA
- PRUEBAS DE LOS DIBUJOS
- CUESTIONARIO DE PROSPECCIÓN
- OTROS: **disquete con listado secuencias**

FIRMA DEL SOLICITANTE O REPRESENTANTE

(VER COMUNICACIÓN)

FIRMA DEL FUNCIONARIO

NOTIFICACIÓN SOBRE LA TASA DE CONCESIÓN:

Se le notifica que esta solicitud se considerará retirada si no procede al pago de la tasa de concesión; para el pago de esta tasa dispone de tres meses a contar desde la publicación del anuncio de la concesión en el BOPI, más los diez días que establece el art. 81 del R.D. 2245/1986.

ILMO. SR. DIRECTOR DE LA OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

informacion@oepm.es

www.oepm.es

C/ PANAMÁ, 1 • 28071 MADRID

MOD. 31011 - 2 - EJEMPLAR PARA EL SOLICITANTE

NO CUMPLIMENTAR LOS RECUADROS ENMARCADOS EN ROJO



12

SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION

21 NÚMERO DE SOLICITUD

22 FECHA DE PRESENTACIÓN

62 PATENTE DE LA QUE ES
DIVISORIA

31 NÚMERO

DATOS DE PRIORIDAD

32 FECHA

33 PAÍS

71 SOLICITANTE (S)

FUNDACIÓ PRIVADA INSTITUT D'INVESTIGACIÓ BIOMÈDICA DE BELLVITGE; INSTITUT CATALÀ D'ONCOLOGIA

DOMICILIO **Av. Gran Via Hospitalet, 199.08907 Hospitalet de l'Infraestat Barcelona**

NACIONALIDAD **Española**

72 INVENTOR (ES) **Sònia Guedán Carrió; Manel Maria Cascalló Piqueras; Ramón Alemany Bonastre**

51 Int. Cl.

GRÁFICO (SÓLO PARA INTERPRETAR RESUMEN)

54 TÍTULO DE LA INVENCION

Adenovirus oncolíticos para el tratamiento del cáncer

57 RESUMEN

Adenovirus oncolíticos para el tratamiento del cáncer

La invención se refiere a un adenovirus oncolítico que comprende una secuencia que codifica una enzima hialuronidasa insertada en su genoma. Este adenovirus se distribuye más eficientemente por la masa tumoral y por consiguiente se aumenta el efecto oncolítico. Inyectando el adenovirus oncolítico de la invención endovenosamente se obtienen regresiones del volumen tumoral. Por lo tanto el adenovirus oncolítico de la presente invención es útil para el tratamiento del cáncer o de un estado pre-maligno del mismo.