



UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA
FACULTAT DE BIOCIÈNCIES
DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR
PROGRAMA DE DOCTORAT EN BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR

**DESENVOLUPAMENT D'UN ADENOVIRUS ONCOLÍTIC POTENT I
SELECTIU COM A BASE PER A LA INCORPORACIÓ DE TRANSGENS QUE
AJUDIN A L'ERADICACIÓ DELS TUMORS**

JUAN JOSÉ ROJAS EXPÓSITO

MARÇ 2010

**DESENVOLUPAMENT D'UN ADENOVIRUS ONCOLÍTIQUE POTENT I
SELECTIU COM A BASE PER A LA INCORPORACIÓ DE TRANSGENS
QUE AJUDIN A L'ERADICACIÓ DELS TUMORS**

Memòria presentada per

Juan José Rojas Expósito

Beneficiari de la beca predoctoral per a la formació de personal investigador FI2006-00264,
concedida per la Generalitat de Catalunya

per optar al grau de

Doctor per la Universitat Autònoma de Barcelona

Tesi realitzada sota la direcció del Dr. Ramon Alemany Bonastre, del Laboratori de Recerca Translacional de l'Institut Català d'Oncologia-IDIBELL, i sota la tutela del Dr. Miguel Chillón Rodríguez, del Centre de Biotecnologia Animal i Teràpia Gènica (CBATEG) de la UAB

El director

L'autor

El tutor

Ramon Alemany Bonastre

Juan José Rojas Expósito

Miguel Chillón Rodríguez

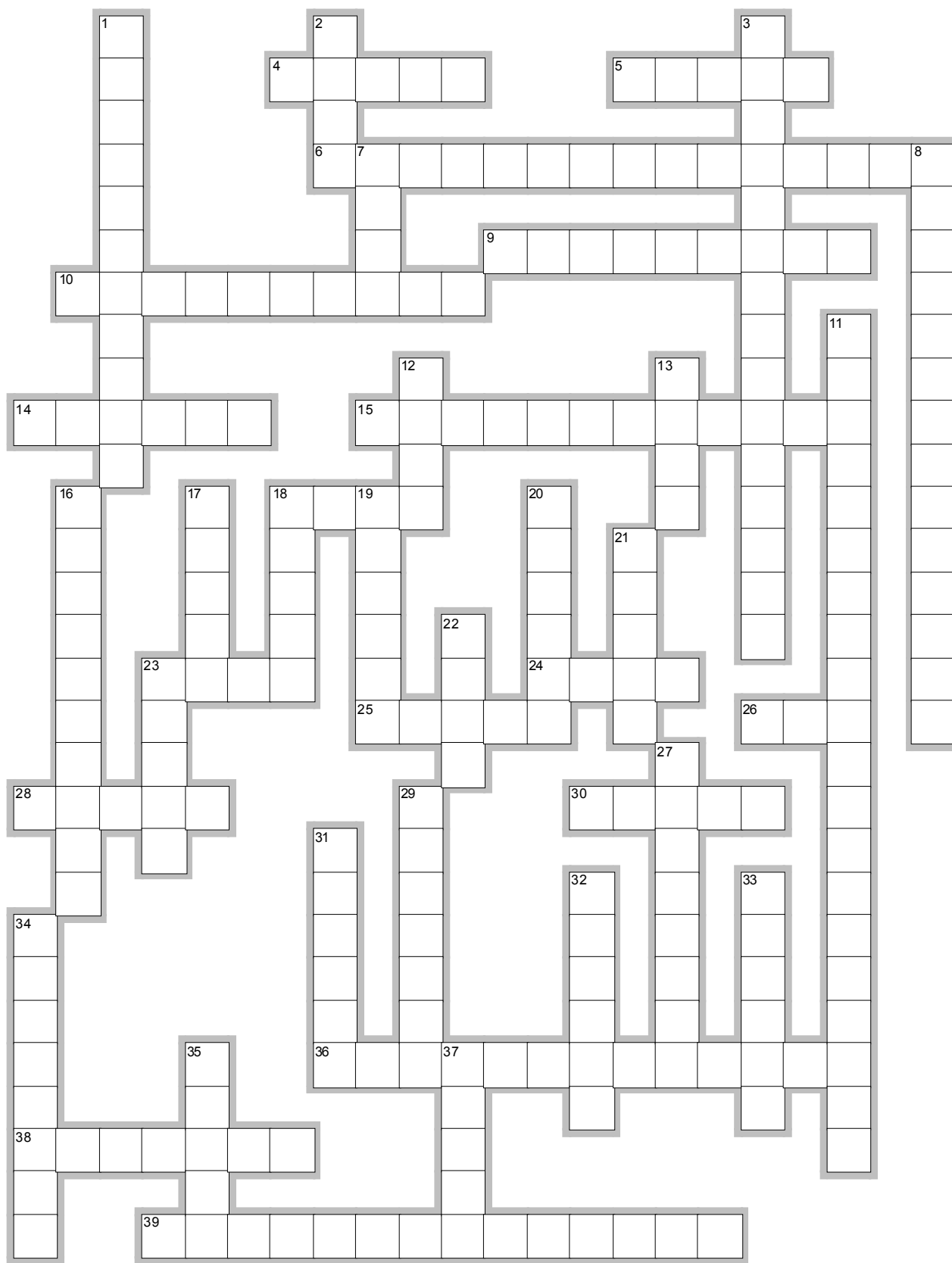
Barcelona, Març de 2010

A mis padres

A mi hermano

A Itziar

Agriments encreuats



Horizontals

4. Llibertat de decisió i bons consells quan vas perdut. De gran, vull ser un jefe com tu!
5. Todo un señor, o eso dice él... pero la verdad es que se queda corto!!
6. Quants moments compartits: birres, concerts, excursions, viatges, ... Gràcies per desagobiar-me sempre que ho he necessitat! Ah, i gràcies també a la teva mare per curar-me el genoll!!
jeje
9. A quién más agradecido estoy. Por todo!
10. Muntanya, futbol, festes, ... Com he gaudit les milers d'activitats que hem fet junts!!
14. Veterinaria muy mandona a la que vamos a echar mucho de menos
15. Nuestros Lilly y Marshall particulares! A veure si fem més cosetes junts!!
18. Mucho más que un amigo y un futuro gran científico!!!
23. La última componente del trio lalalá, llegada hace poco pero ya es una veterana!
24. Sempre seràs la petitona!! I gràcies per mantenir l'esperit del grup!! Ja veuràs com podràs amb tot!
25. Vàrem entrar juntets i acabem juntets!! Des del primer dia fins l'últim!!
26. Gracias por la foto de la portada! Y por mil cosas más!! Ánimo, que tienes los mejores proyectos!
28. Què seria del format d'aquesta tesi sense tu!! Ets un sol!!
30. T'he trobat molt a faltar aquest any! Tot aquest temps no hauria estat el mateix sense tu!
Ah! El Ramon vol que tornis ja!!
36. Los de toda la vida
38. Cuántas conversaciones trascendentales de mi poyata a tu despacho!!
39. Recien llegaditos de Venezuela! El futuro del grupo.

Verticals

1. Moltes gràcies per tots els cops que m'heu fet riure!! I han estat uns quants!!
2. Sempre tens un somriure o una broma preparada! I gràcies per trencar-te el cap amb mi amb els Westerns!!

3. El mags dels llevats
7. La salvación del grupo RA/TG. El nuevo Manel. jeje
8. Dos dels millors, que volten per Nova York
11. Que fàcil que heu fet tot allò complementari a la ciència!
12. La veterana del grup de Teràpia. A veure si vens més sovint!!
13. El capo, que va facilitar moltíssim que jo pogués fer aquesta tesi
16. Mai oblidaré aquella nit a la muntanya! La pitjor de la meva vida!
17. Un superheroi de laboratori! El codirector d'aquesta tesi
18. Thank you so much for helping me with my manuscripts!
19. El alma del laboratorio! Gracias por alegrarnos las tardes!!
20. Nadie pincha como tú! Todos los resultados *in vivo* son gracias a ti!
21. Ay, quantes coses viscudes junts al lab!! No marxis!!!! Sens dubte, la teva amistat és una de les millors coses que me'n porto d'aquesta tesi!
22. Un tío muy lento que se deja querer muy rápido
23. Moltíssimes gràcies per ajudar-me tant amb els Westerns!!
27. Los del otro lao, mi segundo laboratorio! Unos colonos pa celebrar la tesis?
29. Quants anys ja junts! Espero no perdre-us mai!!
31. Gran mexicano, de cuerpo y corazón
32.

*No esperaba una noia tan bonica, darrere d'aquest taulell.
El teu estil em fascina, on has estat tot aquest temps?
I aprofitaré ara que et gires per donar gràcies al cel
i per passar-te revista dels talons fins als cabells.
I no t'espantis però ara voldria dir-te
que ho ets tot per mi, que jo puc ser tot teu.*

Vull sentir-te explicar la teva vida, els teus somnis i els teus grans secrets.

Però si no dubtes, podries venir-te a viure amb mi a Estats Units.

Per si penses que podries atrevir-te, jo m'esperaré per aquí encara algun temps.

(modificat de Ceràmiques Guzman, dels Manel)
33. Una dona molt masculina, des de la carrera junts!!
34. L'home onomatopeia. Trobem a faltar els teus sorollets!!

35. Una noieta que és tot bondat! Gràcies per totes les coses compartides tots aquests anys! Per totes les conversacions a l'estabulari! Ah! I ara ets la veterana del grup eh!!
37. Expert en CAFs i en la India

Solució: Última pàgina d'aquesta tesi.

Les caselles dels mots encreuats són limitades, però també voldria agrair a tothom del LRT1, a la Marga, a l'Ernest, al Josep Balart, a l'Ander, la Marta, la Clara, la Sara, la Mireia, la Lara, a la Nadia i a tot el grup de la Núria Sala, etc. També a tots els del LRT2, les Mireies, la Vane, la Marta, la Sara, etc. També a les noies de seqüenciació de l'IDIBELL, la Vane i la Montse. A tota la gent de l'estabulari, a la Joana, el Ferran, el Pablo, la Rosa, etc. A l'Isabel Fabregat, per haver-me ajudat amb els hepatòcits. Al Jordi Guillen, per haver-me ajudat tant amb les zimografies, encara que al final no n'hagi afegit cap. Thank you also to Richard Iggo and his lab in St. Andrews and to Akseli Hemminki, Peter Searle and Wen.

Gràcies a tots!!!!

TAULA D'ABREVIATURES

%	Tant per cent
$\Delta 24$	<i>Delta 24</i> , deleció de 24 parells de bases
3VDE	En anglès, <i>Ill a virus infection-dependent splicing enhancer</i>
Å	Amstrongs
AAALAC	En anglès, <i>Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care</i>
Ad5	Adenovirus serotip 5
ADN	Àcid desoxiribonucleic
ADP	En anglès, <i>Adenovirus Death Protein</i> (proteïna de mort de l'Ad)
ALT	Alanina aminotransferasa
APS	Persulfat d'amoni
ARN	Àcid ribonucleic
ARNm	ARN missatger
AST	Aspartat aminotransferasa
ATCC	En anglès, <i>American Type Culture Collection</i>
BAK	En anglès, <i>Bcl-2 homologous antagonist/killer</i>
BAX	En anglès, <i>Bcl-2-associated X protein</i>
BCA	Àcid Bicinconínic
Bcl-2	En anglès, <i>B-cell CCL/lymphoma-2</i>
BIK	En anglès, <i>Bcl-2-interacting killer</i>
BNIP1 i 3	En anglès, <i>Bcl-2/adenovirus E1B-19K interacting protein 1 & 3</i>
BSA	En anglès, <i>Bovine Serum Albumin</i>
C4BP	Proteïna d'unió al complement C4
CA	Antigen de Càncer
CAR	En anglès, <i>Coxsackie and Adenovirus Receptor</i>
CD	Citosina deaminasa
CD4 i 8	En anglès, <i>Cluster of diferenciation 4 & 8</i>
CDK	Quinasa depenent de ciclina
CEA	Antigen Carcinoembriònic
cèl	Cèl·lula
CMV	Citomegalovirus
CO ₂	Diòxid de carboni
col.	col·laboradors
CPA	Ciclofosfamida
CPE	En anglès, <i>Cytopathic Effect</i>
CRAD	Adenovirus de Replicació Condicionada
C-terminal	Carboxi-terminal
DAPI	4',6-Diamidin-2-fenilindol diclorhidrat
ddNTP	Trifosfat de dideoxinucleòsid
dGTP	Trifosfat de deoxiguanosina
DM	Distròfia muscular
DMEM	En anglès, <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Di-metil-sulfòxid
dNTP	Trifosfat de deoxinucleòtids

DO	Densitat òptica
DP	En anglès, <i>E2F Dimerization Partner</i>
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Àcid etilendiaminotetraacètic
EGTA	Àcid etilenglicotetraacètic
FBS	Sèrum Fetal Boví
FELASA	En anglès, <i>Federation of European Laboratory Animal Science Associations</i>
FIX	Factor de coagulació IX
FX	Factor de coagulació X
g	Gram
g	Acceleració de la gravetat
G	Gauge
GALV	En anglès, <i>Gibbon Ape Leukaemia Virus</i>
GM-CSF	Factor estimulator de la formació de colònies de macròfags i granulòcits
GMP	Bones pràctiques de manufactura
h	hora
HBS	En anglès, <i>Hepes Buffered Saline</i>
HCl	Àcid clorhídric
HDAC	Acetilases d'Histones
HEPES	Àcid 4-2-hidroxiètil-1-piperazineethanesulfònic
HU	Unitats de Hounsfield
HSG	Heparan-Sulfats-Glicosaminoglicans
hsp-70	En anglès, <i>heat shock protein 70</i>
HSV	Virus de l'Herpes Simplex
HSVtk/GCV	Sistema de la timidina quinasa del virus herpes simplex/ ganciclovir
HUVEC	En anglès, <i>Human Umbilical Vein Endothelial Cells</i>
i.v.	Intravenós
IC₅₀	Concentració inhibidora 50
IFN	Interferó
II	En anglès, <i>E1A enhancer element II</i>
IL	Interleucina
IRES	En anglès, <i>Internal Ribosome Entry Site</i>
ITR	Repetició terminal invertida
IV	Intravenós
kb	Kilobase
KCl	Clorur de potassi
KDa	Kilodalton
L	Litre
LB	Luria Broth, medi pel creixement de bactèries
LD₅₀	Dosi Letal 50
L-NAME	N ω -nitro-L-arginina-metil-éster
LPS	Lipopolisacàrids
LRP	En anglès, <i>low-density lipoprotein receptor-binding protein</i>
M	Molar
mA	Mil-liampers

MHC	Complex d'histocompatibilitat principal
miliQ	Aigua ultrapura, grau de laboratori, que ha estat filtrada i purificada per osmosi inversa
min	Minut
ml	Mil·lilitre
MLP	Promotor principal tardà de l'adenovirus
mm	Mil·límetre
mM	Mil·limolar
mm³	Mil·límetre cúbic
MMP	Metaloproteïnases
MOI	En anglès, <i>Multiplicity Of Infection</i>
MR	En anglès, <i>Mixed Response</i>
mRNA	RNA missatger
mseg	Mil·lisegon
MTT	Bromur de 3-(4,5-dimetietiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium
NaCl	Clorur sòdic
NaF	Fluorur sòdic
NaOH	Hidròxid sòdic
NF-κB	En anglès, <i>Nuclear factor Kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NK	En anglès, <i>Natural Killer</i>
nm	Nanòmetre
nM	Nanomolar
nº	Número
N-terminal	Amino-terminal
°C	Grau centígrad
OCT	En anglès, <i>Optimal Cutting Temperature compound</i>
ORF	Pauta oberta de lectura
p.i.	Post-infecció o post-injecció
P/S	Penicil·lina/estreptomicina
pb	Parell de bases
PBS	Tampó salí fosfatat
PBS⁺⁺	Tampó salí fosfatat suplementat amb clorur de calci i de magnesi
PCR	Reacció en cadena de la polimerasa
PD	En anglès, <i>Progressive Disease</i>
PEG	Polietilenglicol
pg	Picograms
pmol	Picomols
poliA	Poliadenilació
PRR	En anglès, <i>Pattern Recognition Receptor</i>
PSA	En anglès, <i>Prostate Specific Antigen</i>
RECIST	En anglès, <i>Response Evaluation In Solid Tumors</i>
RGD	Arginina-Glicina-Àcid Aspàrtic
rpm	Revolucions per minut
SA	En anglès, <i>splicing acceptor</i> (acceptor de tall i lligació)
SC	En anglès, <i>Synthetic Complete medium</i>
SCID	Immunodeficiència combinada severa

Abreviatures

SD	Desviació estàndard
SD	En anglès, <i>Stable Disease</i>
SDS	Dodecilsulfat sòdic
SE	Error estàndard
Smac	En anglès, <i>Second Mitochondria-derived Activator of Caspase</i>
TAE	Tris-acetat-EDTA
TBS	En anglès, <i>Tris Buffered Saline</i>
TE	Tris-EDTA
TEMED	Tetrametiletilenodiamida
TIMP3	En anglès, <i>Tissue Inhibitor of Metalloproteinases</i>
TK	Timidina quinasa
TL	eGFP-Luciferasa
TLR	En anglès, <i>Toll-Like Receptor</i>
TNF-α	En anglès, <i>Tumor Necrosis Factor α</i>
TP	Proteïna terminal
Tris	Tris(hidroximetil)aminometà
TU	En anglès, <i>transducing unit</i> (unitat de transducció)
U	Unitats
Ura	Uracil
UTR	En anglès, <i>untranslated region</i>
V	Volts
vp	Partícules virals
Wnt	En anglès, <i>Wg (wingless)-INT</i>
YPDA⁺⁺	En anglès, <i>Yeast extract Peptone Dextrose Adenine medium</i>
μF	Microfaradi
μg	Microgram
μl	Microlitre
μM	Micromolar
μm	Micròmetre
Ω	Ohm

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

ÍNDIX DE CONTINGUTS

RESUM	11
PRESENTACIÓ	15
INTRODUCCIÓ	19
1. EL CÀNCER	21
1.1. LA VIA DEL RETINOBLASTOMA	21
2. VIROTERÀPIA DEL CÀNCER	23
2.1. VIROTERÀPIA AMB ADENOVIRUS	25
2.1.1. Característiques generals dels adenovirus	25
2.1.1.1. Estructura del virió	26
2.1.1.2. Estructura del genoma.....	27
2.1.1.3. Biologia del cicle viral infectiu	27
2.1.1.3.1. Adsorció i entrada a la cèl·lula	28
2.1.1.3.2. Expressió de gens primerencs.....	29
2.1.1.3.3. Expressió de gens tardans, acoblament dels virions, lisi i alliberament dels virions	32
2.1.2. Disseny d'adenovirus selectius de tumor	32
2.1.2.1. Delecions de gens virals que confereixen selectivitat tumoral	33
2.1.2.2. Control de l'expressió de proteïnes: targeting transcripcional i traduccional.....	34
2.1.2.3. Modificació del tropisme de l'adenovirus: targeting transduccional.....	37
2.1.3. ICOVIR-5.....	38
2.1.4. L'experiència clínica amb adenovirus oncolítics.....	39
2.1.5. Limitacions de la viroteràpia i obstacles a superar.....	42
2.1.5.1. Arribada de l'adenovirus al tumor	42
2.1.5.2. Dispersió intratumoral de l'adenovirus.....	43
2.1.5.3. Resposta immune contra l'adenovirus.....	44
2.1.6. Estratègies per augmentar la potència oncolítica	45
2.1.6.1. Millora del control d'E1A.....	45
2.1.6.2. Bioselecció de mutacions que augmenten la potència oncolítica.....	45
2.1.6.3. Adenovirus oncolítics "armats"	46
2.1.6.3.1. Transgens que augmenten la citotoxicitat sobre la cèl·lula tumoral	47
2.1.6.3.2. Transgens que modifiquen el microambient del tumor	47
2.1.6.3.3. Transgens que immunostimulen	48

2.1.6.4. Combinació amb drogues i altres teràpies.....	48
OBJECTIUS	49
MATERIALS I MÈTODES.....	53
1. TÈCNiques DE MANIPULACIÓ DE BACTÈRIES.....	55
1.1. PREPARACIÓ DE BACTÈRIES COMPETENTS.....	55
1.2. TRANSFORMACIÓ DE BACTÈRIES COMPETENTS	56
1.2.1. Transformació per xoc tèrmic.....	56
1.2.2. Transformació per electroporació	56
1.3. OBTENCIÓ D'ADN PLASMÍDIC A PARTIR DE CULTIUS DE BACTÈRIES	57
1.3.1. Obtenció d'ADN plasmídic a petita escala	57
1.3.2. Obtenció d'ADN plasmídic a gran escala	58
2. TÈCNiques DE MANIPULACIÓ DE LLEVATS	58
2.1. PREPARACIÓ DE LLEVATS COMPETENTS	59
2.2. TRANSFORMACIÓ DE LLEVATS PEL MÈTODE LiAc/SS-CARRIER ADN/PEG	59
2.3. OBTENCIÓ DE L'ADN PLASMÍDIC.....	60
3. CULTIUS CEL·LULARS.....	61
3.1. MODELS CEL·LULARS I SECCIONS DE TEIXIT PRIMARI	61
3.1.1. Cèl·lules HEK293	61
3.1.2. Cèl·lules tumorals.....	61
3.1.3. Cèl·lules normals.....	63
3.1.3.1. Cèl·lules HUVEC.....	63
3.1.3.2. Establiment de cultius primaris d'hepatòcits	63
3.1.4. Model de seccions de teixit primari.....	64
3.2. CONTATGE CEL·LULAR	65
3.3. CONGELACIÓ I DESCONGELACIÓ DE LÍNIES CEL·LULARS	66
3.4. CONTROL DE MICOPLASMA.....	66
4. ADENOVIRUS RECOMBINANTS	67
4.1. CONSTRUCCIÓ DELS ADENOVIRUS RECOMBINANTS	67
4.1.1. Construcció de l'adenovirus ICOVIR-7	69
4.1.2. Construcció de l'adenovirus ICOVIR-15	70
4.1.3. Construcció de l'adenovirus ICOVIR-15-NfsA	71
4.1.4. Construcció de l'adenovirus ICOVIR-15-T1	71
4.1.5. Construcció de l'adenovirus ICOVIR-15K	72
4.2. GENERACIÓ DELS ADENOVIRUS RECOMBINANTS PER TRANSFECCIÓ. MÈTODE DEL FOSFAT CÀLCIC	72

4.3.	SELECCIÓ DE CLONS DELS ADENOVIRUS RECOMBINANTS MITJANÇANT L'ASSAIG DE FORMACIÓ DE CALBES	74
4.4.	AMPLIFICACIÓ I PURIFICACIÓ DELS ADENOVIRUS	74
4.4.1.	Amplificació dels adenovirus	75
4.4.2.	Purificació dels adenovirus	76
4.5.	TÈCNiques EMPRADES PER A LA TITULACIÓ DELS ADENOVIRUS.....	77
4.5.1.	Determinació de partícules víriques per espectrofotometria (vp/ml)	77
4.5.2.	Determinació de partícules víriques funcionals per tinció d'hexó (TU/ml).....	78
4.6.	TÈCNiques EMPRADES PER A LA CARACTERITZACIÓ DELS ADENOVIRUS	79
4.6.1.	Mètodes per a l'obtenció de l'ADN adenoviral	79
4.6.1.1.	<i>Obtenció de l'ADN adenoviral a partir del sobrenedant de cèl·lules infectades..</i>	<i>79</i>
4.6.1.2.	<i>Obtenció de l'ADN adenoviral a partir de cèl·lules infectades.....</i>	<i>79</i>
4.6.1.3.	<i>Obtenció de l'ADN adenoviral a partir de virus purificats.....</i>	<i>80</i>
4.6.2.	Digestió amb enzims de restricció i seqüenciació de l'ADN	80
4.6.2.1.	<i>Digestió amb enzims de restricció.....</i>	<i>80</i>
4.6.2.2.	<i>Reacció de seqüenciació.....</i>	<i>81</i>
5.	ASSAJOS <i>IN VITRO</i> AMB ADENOVIRUS RECOMBINANTS	81
5.1.	DETECCIÓ DE PROTEÏNES PER WESTERN-BLOT	81
5.1.1.	Obtenció de l'extracte proteic	81
5.1.2.	Titulació de l'extracte proteic.....	82
5.1.3.	SDS-PAGE i transferència a la membrana.....	82
5.1.4.	Bloqueig, hibridació i detecció.....	83
5.2.	ASSAJOS DE PRODUCCIÓ VIRAL	84
5.3.	ASSAJOS DE CITOTOXICITAT.....	85
5.4.	ASSAJOS DE TAMANY DE CALBES	86
6.	ASSAJOS <i>IN VIVO</i> A RATOLINS AMB ADENOVIRUS RECOMBINANTS	86
6.1.	SOQUES DE RATOLINS EMPRADES I CONDICIONS D'ESTABILACIÓ.....	86
6.2.	IMPLANTACIÓ SUBCUTÀNIA DE CÈL·LULES TUMORALS	87
6.3.	ADMINISTRACIÓ DELS ADENOVIRUS.....	88
6.4.	OBTENCIÓ DE MOSTRES.....	88
6.4.1.	Obtenció de sèrum per a la determinació de la virèmia	88
6.4.2.	Obtenció de sang i sèrum per a anàlisi bioquímic i hematològic	88
6.4.3.	Obtenció d'òrgans	89
6.4.3.1.	<i>Inclusió de teixits en parafina</i>	<i>89</i>
6.4.3.2.	<i>Inclusió de teixits en OCT.....</i>	<i>89</i>
7.	TÈCNiques HISTOLÒGIQUES	90

7.1.	OBTENCIÓ DE TALLS HISTOLÒGICS.....	90
7.1.1.	Talls histològics parafinats.....	90
7.1.2.	Talls histològics congelats.....	90
7.2.	TINCIÓ AMB EOSINA-HEMATOXILINA DE TALLS PARAFINATS.....	90
7.3.	IMMUNOHISTOQUÍMIQUES SOBRE TALLS PARAFINATS.....	91
7.4.	IMMUNOHISTOFLOURESCÈNCIES SOBRE TALLS CONGELATS.....	92
RESULTATS	95	
1.	MODIFICACIÓ DEL PROMOTOR E2F-1 PER AUGMENTAR LA POTÈNCIA D'ADENOVIRUS ONCOLÍTICS	97
1.1.	CONSTRUCCIÓ DE L'ADENOVIRUS RECOMBINANT ICOVIR-7	97
1.2.	SELECTIVITAT D'ICOVIR-7.....	99
1.2.1.	Replicació a cèl·lules HUVEC.....	99
1.2.2.	Model d'hepatòcits humans en cultiu	100
1.2.3.	Model de seccions de fetge humà	100
1.2.4.	Perfil de toxicitat a ratolins.....	103
1.3.	POTÈNCIA ONCOLÍTICA D'ICOVIR-7.....	106
1.3.1.	Expressió d'E1A i producció viral a cèl·lules tumorals.....	107
1.3.2.	Capacitat citotòxica <i>in vitro</i>	108
1.3.3.	Efecte antitumoral <i>in vivo</i>	110
1.3.4.	Supervivència de ratolins amb tumors subcutanis.....	113
2.	INSERCIÓ DE LLOCS D'UNIÓ DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓ E2F-1 AL PROMOTOR ENDOGEN D'E1A	115
2.1.	CONSTRUCCIÓ DE L'ADENOVIRUS RECOMBINANT ICOVIR-15	115
2.2.	TOXICITAT D'ICOVIR-15	116
2.2.1.	Perfil de toxicitat a ratolins.....	116
2.2.2.	Perfil de toxicitat a hámsters	119
2.3.	POTÈNCIA ONCOLÍTICA D'ICOVIR-15.....	123
2.3.1.	Expressió d'E1A i producció viral a cèl·lules tumorals.....	123
2.3.2.	Citotoxicitat d'ICOVIR-15 <i>in vitro</i>	125
2.3.3.	Replicació a seccions de metàstasis humanes.....	126
2.3.4.	Activitat antitumoral <i>in vivo</i>	126
2.3.5.	Supervivència de ratolins amb tumors subcutanis.....	128
2.4.	INCORPORACIÓ DEL TRANSGEN NFSA AL GENOMA D'ICOVIR-15	131
3.	INCORPORACIÓ DE LA MUTACIÓ T1 AL GENOMA D'ICOVIR-15	134
3.1.	CONSTRUCCIÓ DE L'ADENOVIRUS RECOMBINANT ICOVIR-15-T1	134

3.2.	TOXICITAT D'ICOVIR-15-T1	135
3.2.1.	Perfil de toxicitat a ratolins.....	135
3.3.	POTÈNCIA ONCOLÍTICA D'ICOVIR-15	136
3.3.1.	Assaig de formació de calbes.....	137
3.3.2.	Expressió d'E1A i producció viral a cèl·lules tumorals.....	138
3.3.3.	Assajos de citotoxicitat a cèl·lules tumorals	139
3.3.5.	Activitat antitumoral <i>in vivo</i> d'ICOVIR-15-T1.....	141
3.3.6.	Supervivència de ratolins amb tumors subcutanis.....	142
4.	INSERCIÓ DEL MOTIU RGD AL <i>SHAFT</i> DE LA FIBRA D'ICOVIR-15	143
4.1.	CONSTRUCCIÓ DE L'ADENOVIRUS RECOMBINANT ICOVIR-15K	143
4.2.	TOXICITAT D'ICOVIR-15K	144
4.2.1.	Perfil de toxicitat a ratolins.....	144
4.2.2.	Perfil de toxicitat a hámsters.....	147
4.3.	ACTIVITAT ANTITUMORAL D'ICOVIR-15K	149
4.3.1.	Citotoxicitat d'ICOVIR-15K.....	149
4.3.2.	Quantitat de virus en sang després de l'administració d'ICOVIR-15K.....	150
4.3.3.	Activitat antitumoral <i>in vivo</i> d'ICOVIR-15K.....	151
4.3.4.	Supervivència de ratolins amb tumors subcutanis.....	152
DISCUSSIÓ	155	
1.	TRACTAMENT DEL CÀNCER AMB ADENOVIRUS ONCOLÍTICS	157
2.	ICOVIR-7: MÉS E1A, MÉS POTÈNCIA ONCOLÍTICA	161
3.	ICOVIR-15: ELEMENTS MÍNIMS QUE MILLOREN LA DEPENDÈNCIA DE RB	167
4.	LA MUTACIÓ T1: EFECTES DE L'AUGMENT DE L'ALLIBERACIÓ VIRAL	172
5.	RECOL·LOCACIÓ DEL MOTIU RGD: MÉS BIODISPONIBILITAT	174
6.	LIMITACIONS DELS MODELS EXPERIMENTALS	176
7.	ASSAIG CLÍNIC: TRIA D'UN CANDIDAT	181
CONCLUSIONS	187	
BIBLIOGRAFIA	191	
ANNEX	209	

ÍNDIX DE FIGURES

Figura 1: La via del retinoblastoma	22
Figura 2: Propagació intratumoral dels virus oncolítics	23
Figura 3: Estructura dels adenovirus	26
Figura 4: Organització genòmica de l'adenovirus de tipus 5.....	28
Figura 5: Cicle infectiu de l'adenovirus.....	29
Figura 6: Inducció de la unió d'E2F a l'ADN per part d'E4-6/7	31
Figura 7: Mecanisme de selectivitat tumoral de l'Ad- Δ 24	34
Figura 8: Diagrama de funcionament dels components genètics d'ICOVIR-5.....	39
Figura 9: Barreres que dificulten l'arribada i distribució de l'adenovirus pel tumor	42
Figura 10: El <i>Krumdieck Tissue Slicer</i> MD-4000	65
Figura 11: Esquema simplificat de les estratègies de clonatge emprades per a la construcció dels adenovirus recombinants generats en el marc d'aquesta tesi	68
Figura 12: Esquema del procés de purificació viral	76
Figura 13: Modificació del promotor E2F-1 i mecanisme d'acció	98
Figura 14: Replicació a HUVEC.....	99
Figura 15: Selectivitat d'ICOVIR-15 a hepatòcits en cultiu	101
Figura 16: Selectivitat d'ICOVIR-7 a un model de seccions de fetge humà.....	102
Figura 17: Detecció per Western-blot de marcadors de replicació cel·lular als models de cèl·lula normal	103
Figura 18: Perfil de toxicitat <i>in vivo</i> d'ICOVIR-7.....	105
Figura 19: Histologia dels fetges de ratolins injectats amb ICOVIR-7.....	107
Figura 20: Expressió d'E1A i progènie viral produïda per cèl·lules tumorals infectades amb ICOVIR-7	109
Figura 21: Capacitat citotòxica d'ICOVIR-7	110
Figura 22: Eficàcia sistèmica antitumoral <i>in vivo</i>	111
Figura 23: Detecció de la replicació d'ICOVIR-7 dins dels tumors.....	112
Figura 24: Supervivència dels ratolins tractats amb ICOVIR-7	113
Figura 25: Representació esquemàtica del control transcripcional d'E1A per part d'ICOVIR-15	116
Figura 26: Perfil de toxicitat d'ICOVIR-15 a ratolins	118
Figura 27: Histologia dels fetges de ratolins injectats amb ICOVIR-15	120
Figura 28: Perfil de toxicitat d'ICOVIR-15 a hámsters	122
Figura 29: Immunodetecció d'E1A a fetges de hámsters injectats amb ICOVIR-15.....	123
Figura 30: Expressió d'E1A i progènie viral produïda per cèl·lules tumorals infectades amb ICOVIR-15	124
Figura 31: Citotoxicitat d'ICOVIR-15	125

Figura 32: Producció viral d'ICOVIR-15 a seccions de metàstasis hepàtiques de pacients amb càncer colorectal.....	126
Figura 33: Eficàcia sistèmica d'ICOVIR-15 comparada amb l'Adwt-RGD	127
Figura 34: Detecció de focus de replicació dins dels tumors	127
Figura 35: Eficàcia sistèmica antitumoral després d'administrar ICOVIR-15	129
Figura 36: Supervivència de ratolins amb tumors subcutanis tractats amb ICOVIR-15.....	130
Figura 37: Incorporació del transgen NfsA al genoma d'ICOVIR-15.....	132
Figura 38: Representació esquemàtica del components genètics d'ICOVIR-15-T1	135
Figura 39: Toxicitat a ratolins injectats amb ICOVIR-15-T1	137
Figura 40: Assaig de formació de calbes amb ICOVIR-15-T1	138
Figura 41: Expressió d'E1A i progènie viral a cèl·lules tumorals infectades amb ICOVIR-15-T1	139
Figura 42: Capacitat citotòxica d'ICOVIR-15-T1 a cèl·lules tumorals humanes.....	140
Figura 43: Capacitat citotòxica d'ICOVIR-15-T1 a cèl·lules tumorals de hámster	141
Figura 44: Eficàcia sistèmica antitumoral d'ICOVIR-15-T1	142
Figura 45: Supervivència de ratolins amb tumors subcutanis tractats amb ICOVIR-15-T1	142
Figura 46: Representació esquemàtica de les mutacions a les fibres d'ICOVIR-15 i d'ICOVIR-15K	144
Figura 47: Perfil de toxicitat d'ICOVIR-15K a ratolins	146
Figura 48: Hemograma dels ratolins injectats amb ICOVIR-15K	147
Figura 49: Perfil de toxicitat d'ICOVIR-15K a hámsters	148
Figura 50: Hemograma dels hámsters injectats amb ICOVIR-15K	149
Figura 51: Capacitat citotòxica d'ICOVIR-15K a cèl·lules tumorals	150
Figura 52: Virèmia en sang després d'administrar ICOVIR-15K.....	151
Figura 53: Eficàcia sistèmica antitumoral d'ICOVIR-15K	152
Figura 54: Supervivència de ratolins amb tumors subcutanis tractats amb ICOVIR-15K.....	153
Figura 55: Representació esquemàtica dels components genètics d'un possible candidat a assajos clínics	186

ÍNDIX DE TAULES

Taula 1: Assajos clínics amb adenovirus oncolítics, injecció sistèmica. Fase I i II.....	40
Taula 2: Línies tumorals utilitzades en aquest treball.....	62
Taula 3: Seqüència dels encebadors utilitzats per a la detecció de micoplasma.....	66
Taula 4: Descripció dels adenovirus recombinants emprats en aquest treball.....	67
Taula 5: Oligonucleòtids utilitzats per als clonatges d'ICOVIR-7, ICOVIR-15 i ICOVIR-15-NfsA.....	72
Taula 6: Anticossos primaris i secundaris utilitzats en les deteccions per Western-blot.....	84
Taula 7: Anticossos primaris i secundaris utilitzats en les immunohistoquímiques sobre talls parafinats....	91
Taula 8: Anticossos primaris i secundaris utilitzats en les immunohistofluorescències sobre talls congelats.....	92
Taula 9: Efectes adversos de l'assaig preliminar amb ICOVIR-7 a pacients humans.....	165
Taula 10: Activitat antitumoral observada en l'assaig preliminar amb ICOVIR-7 a pacients humans	166

RESUM

Els adenovirus oncolítics són uns nous agents antitumorals molt prometedors gràcies a la seva capacitat d'autoamplificar-se selectivament a la massa tumoral. Els assajos clínics realitzats fins a la data amb una primera generació d'aquests agents han indicat la necessitat d'una millora substancial de la capacitat antitumoral, sense descuidar però els possibles efectes adversos de la replicació als teixits normals. Una de les limitacions més importants d'aquesta teràpia és la incapacitat del virus per travessar les barreres estructurals que imposen les cèl·lules de l'estroma i la matriu extracel·lular del tumor. L'expressió de transgens que destrueixin aquestes barreres és una estratègia que s'ha mostrat molt prometedora per superar aquesta limitació i augmentar així l'activitat antitumoral. Per aconseguir aquest propòsit, cal optimitzar la maquinària d'expressió i el genoma de l'adenovirus oncolíctic on els transgens seran inserits per compatibilitzar l'expressió del transgen amb el cicle viral de l'adenovirus i mantenir la mida del genoma dintre del límit que imposa la capacitat d'encapsidació. En aquest treball, s'explora l'ús de caixes palindròmiques d'unió del factor de transcripció E2F per augmentar la selectivitat i la potència d'adenovirus oncolítics. En un primer virus construït, aquestes caixes van aconseguir augmentar significativament l'activitat antitumoral, tant *in vitro* com *in vivo*, però la combinació d'elements genètics presents en aquest virus augmentava molt la mida del genoma, i no va permetre la introducció d'un transgen per superar les barreres presents als tumors. En un segon virus, l'optimització dels elements genètics va permetre aconseguir un virus que, gràcies a les caixes d'unió d'E2F, presentava un baix perfil de toxicitat i una gran potència antitumoral, fins i tot superior a la dels adenovirus salvatges. A més, la mida tan reduïda del seu genoma permet una expressió eficient i potent de transgens. Addicionalment, en aquest treball també s'analitzen els possibles beneficis de selectivitat i potència que poden tenir dos modificacions genètiques, la mutació T1 i la fibra RGDK, descrites amb anterioritat pel nostre grup. Tot plegat, aquest treball analitza la millor combinació possible d'elements genètics per aconseguir una bona base que permeti la construcció d'un futur adenovirus oncolíctic potent, selectiu i amb capacitat per destruir les barreres estromals dels tumors, superant així les limitacions més importants de la teràpia adenoviral del càncer, i presentant-se com un ferm candidat a ser testat en futurs assajos clínics.

PRESENTACIÓ

Segons l'OMS, el càncer és avui en dia la principal causa de mortalitat i provoca més del 12% de les morts a nivell mundial. Entre l'any 2005 i l'any 2015, hauran mort uns 84 milions de persones a tot el món a causa del càncer; a més, s'estima que la mortalitat per càncer s'eleva a un 45% a l'any 2030, arribant als 11,5 milions de persones per any, degut, en bona part, al creixement demogràfic i a l'envelliment de la població.

Durant els darrers anys, s'han realitzat importants progressos en la supervivència global del pacients amb càncer gràcies als avenços en prevenció, noves tècniques de diagnòstic i noves teràpies desenvolupades a partir del coneixement dels processos moleculars implicats en la malaltia. Tot i això, els tractaments estàndards actuals (cirurgia, radioteràpia i quimioteràpia) no ofereixen especificitat pel teixit cancerós i es mostren ineficients a l'hora de tractar pacients diagnosticats en etapes avançades de la malaltia. A més, les cèl·lules tumorals són capaces de desenvolupar resistències a l'apoptosi produïda per la quimioteràpia i la radiació, causant la recurrència de la malaltia. Per aquests motius, es fa necessària la recerca de nous tractaments que tinguin un gran índex terapèutic limitat al teixit malalt i superin la resistència a múltiples drogues.

La viroteràpia o teràpia viral del càncer es basa en l'habilitat de certs virus de replicar i lliurar selectivament cèl·lules tumorals. La replicació de l'agent oncolític permet amplificar la dosi inicialment administrada, propietat que la fa única entre les teràpies del càncer. El cicle lític del virus acaba amb la mort i la lisi de la cèl·lula tumoral, impedit l'aparició de resistències. A més, la viroteràpia es pot combinar amb els tractaments estàndards actuals i s'ha demostrat que presenta sinergisme amb la quimioteràpia. Malgrat aquestes característiques, hi ha certs factors, com l'arribada del virus al tumor, la seva dispersió per dins del tumor o la resposta immune contra el virus, que limiten la seva eficàcia antitumoral. Per altra banda, la toxicitat sobre els teixits normals dels agents viroterapèutics també és un factor important que limita la dosi administrada. Per aquests motius, el treball d'aquesta tesi es basa en la recerca de noves estratègies moleculars que permetin augmentar l'efecte antitumoral dels adenovirus oncolítics, reduint-ne la seva toxicitat després d'una administració sistèmica.

INTRODUCCIÓ

1. EL CÀNCER

El càncer és un conjunt de malalties en les quals un grup de cèl·lules experimenta un creixement incontrolat més enllà dels límits normals, envaint el teixit circumdant i produint, a vegades, metàstasi. La metàstasi és la propagació a distància, principalment per via limfàtica o sanguínia, de les cèl·lules originàries del càncer, produint el creixement de nous tumors al lloc de propagació. Aquestes propietats diferencien els tumors malignes dels benignes, que són limitats i no envaeixen ni produeixen metàstasi. La majoria de càncers formen tumor sòlids, però altres, com la leucèmia, no en formen.

La cèl·lula cancerosa, a través de mutacions germinals o somàtiques, ha d'adquirir una sèrie de defectes en les vies reguladores de proliferació cel·lular i homeòstasi per poder desenvolupar la malaltia. L'autosuficiència en senyals de creixement, la insensibilitat a senyals d'aturada, l'evasió de l'apoptosi, la formació de nous vasos o angiogènesi, la replicació il·limitada i la invasió de teixits són capacitats que adquireixen les cèl·lules canceroses per evadir les barreres que imposa l'organisme al desenvolupament del càncer. Malgrat que aquestes característiques són globals a les cèl·lules malignes, aquestes propietats es poden adquirir a través de mecanismes diferents, i només un nombre molt essencial d'alteracions són comunes a la majoria dels càncers (Hanahan and Weinberg, 2000). Aquestes alteracions essencials es donen a importants punts de control de la divisió cel·lular o de l'apoptosi i, entre aquests reguladors, en destaquen la proteïna del retinoblastoma (RB) i el factor de transcripció p53.

1.1. LA VIA DEL RETINOBLASTOMA

La desregulació de la via del retinoblastoma (RB/p16) es una característica distintiva de les cèl·lules tumorals. La proteïna del retinoblastoma (pRB) és la proteïna central de la via, i va ser anomenada així perquè va ser identificada en malalts de retinoblastoma familiar (Rivera *et al.*, 1981; Strong *et al.*, 1981).

pRB, p130 i p107 (proteïnes de la família de RB) interaccionen físicament amb moltes proteïnes, però la interacció amb els membres de la família dels factors de transcripció E2F (en associació amb els membres de la família DP) és clau en el paper de control de la replicació cel·lular. Els complexos RB-E2F-DP reprimeixen activament la transcripció dels promotors

controlats per E2F gràcies al reclutament d'acetilases d'histones (HDACs) i d'altres factors que remodelen la cromatina (Black and Azizkhan-Clifford, 1999). Per altra banda, la fosforilació dels membres de la família de RB per part de les quinases dependents de ciclina (CDK), evita l'associació amb E2F i HDACs, allibera E2F i activa la transcripció dels promotor controlats per aquest factor. A la vegada, les CDKs es troben regulades per activadors i inhibidors: les CDKs 4 i 6 s'activen en resposta a senyals mitogèniques i s'inhibeixen per proteïnes com p15, p16, p18 o p19. Totes aquestes interaccions és el que es coneix com la via de RB (**Figura 1**). Els gens regulats per E2F inclouen gens necessaris per a la replicació de l'ADN i les ciclins E i A. D'aquesta manera, les formes hipofosforilades de les proteïnes de la família de RB bloquegen l'entrada de la cèl·lula a fase S a través de la inhibició de la funció transcripcional d'E2F. Entre els gens regulats per E2F, en destaca el mateix E2F-1, que es troba subjecte a un estricte bucle d'autoactivació i repressió degut als seus papers únics en apoptosi i reparació de l'ADN (Johnson and Degregori, 2006). Per a un òptim control de l'expressió, el promotor d'E2F-1 incorpora una estructura única, molt eficient en activació i repressió de la transcripció, formada per quatre llocs d'unió d'E2F organitzats en dos palíndroms imperfectes (Neuman *et al.*, 1994, 1995).

La desregulació de la via de RB s'ha postulat com un requisit per a l'oncogènesi (Hahn and Weinberg, 2002; Ortega *et al.*, 2002). Ja sigui per inactivació de RB o p16 per mutació, deleció o silenciament epigenètica, o per sobreexpressió de ciclina D1 o CDK4, la desregulació d'aquesta via culmina en l'activació constitutiva del cicle cel·lular degut a la incapacitat de RB per segrestar E2F. La desregulació d'aquesta via en el 100% dels tumors la converteix en una diana ideal per al desenvolupament de noves teràpies dirigides a tractar un ampli rang de pacients i de tipus tumorals.

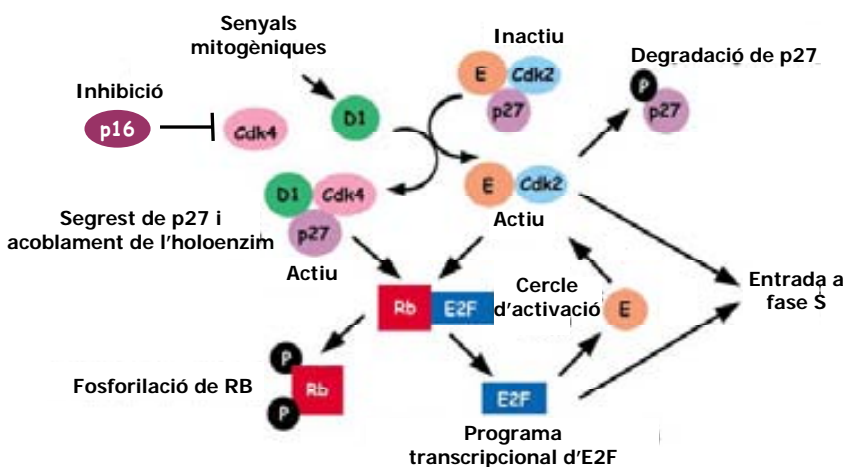


Figura 1. La via del retinoblastoma. En resposta a senyals mitogèniques, s'activa la síntesi de ciclina D1. Això provoca la formació del complex ciclina D1-Cdk4-p27, alliberant el complex ciclina E-Cdk2. p16 pot actuar com a inhibidor de la formació d'aquest complex segrestant Cdk4. Les dues ciclins dependents de quinases col·laboren seqüencialment per fosforilar les proteïnes de la família de RB, alliberant E2F i provocant l'activació dels gens necessaris per a l'entrada en fase S. A més, E2F activa els gens E2F-1 i ciclina E, provocant un cercle d'activació positiu (modificat de Sherr and McCormick, 2002).

2. VIROTERÀPIA DEL CÀNCER

La viroteràpia del càncer és el tractament de neoplàsies amb virus oncolítics. Els virus oncolítics són virus amb capacitat per replicar-se i lisar selectivament cèl·lules tumorals sense afectar les cèl·lules normals. Els nous virus produïts en una primera infecció de les cèl·lules tumorals són alliberats al medi extracel·lular per infectar les cèl·lules veïnes, amplificant la dosi inicial administrada fins a l'eradicació de la massa tumoral (**Figura 2**).

El concepte de viroteràpia va sorgir a principis del segle XX com a conseqüència de l'observació de regressions tumorals en malalts que havien sofert una infecció vírica o havien estat vacunats (Sinkovics and Horvath, 1993). L'any 1912, DePace va observar una regressió notable d'un tumor de coll d'úter després d'administrar la vacuna de la ràbia a una pacient, i va ser el primer en atribuir aquest efecte a la oncòlisi produïda per un virus (DePace, 1912). Posteriorment, també es van descriure regressions tumorals en pacients que havien sofert infeccions d'hepatitis, xarampió, ràbia o varicel·la (Moore, 1954).

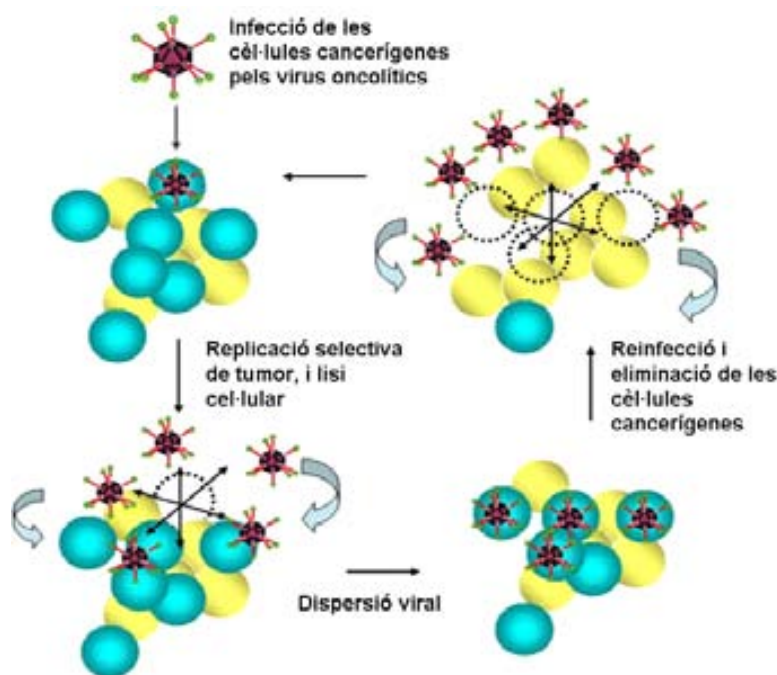


Figura 2. Propagació intratumoral dels virus oncolítics. Els virus oncolítics repliquen selectivament a les cèl·lules tumorals després de la primera infecció d'una petita part d'elles. La replicació del virus dona lloc a la mort de la cèl·lula infectada i a l'alliberament de la progènie viral al medi extracel·lular. Els nous virions tornaran a infectar més cèl·lules tumorals, amplificant la dosi inicial i eliminant la massa tumoral (modificat de Hedley *et al.*, 2006).

Tots aquests casos de remissions tumorals, juntament amb els progressos fets en la caracterització i l'amplificació dels virus *in vitro*, van portar a testar entre els anys 50 i 80 una gran varietat de virus (adenovirus, virus de l'Oest del Nil, virus de la verola i virus de les galteres, entre d'altres) en centenars de pacients amb càncers terminals (Southam and Moore, 1952; Huebner *et al.*, 1956; Hunter-Craig *et al.*, 1970; Yamanishi *et al.*, 1970). Entre l'any 1912 i l'any 1970, es van arribar a injectar 53 virus diferents, obtenint algun tipus d'efecte antitumoral amb 38 d'ells. Malgrat això, i exceptuant alguns casos de regressions complertes, la majoria de respostes consistien en una regressió tumoral inicial seguida d'un restabliment de la progressió, al mateix temps que es donava la resposta immune antivírica (Kelly and Russell, 2007). Aquests resultats de baixa activitat oncolítica, i la patogenicitat que presentaven certs virus als teixits normals, van portar a un abandonament progressiu de la idea de viroteràpia.

A la dècada dels noranta, es va començar a aplicar els principis de la teràpia gènica al tractament del càncer degut, sobretot, als indicis d'innocuitat que havien mostrat molts vectors virals en el tractament de malalties genètiques. Les primeres aproximacions anaven destinades a restituir alguna mancança de la cèl·lula cancerosa (p53, ...) (Lang *et al.*, 1999), a introduir gens suïcides (Timidina Quinasa, ...) (Song *et al.*, 2003) o a introduir algun gen que despertés el sistema immune contra les cèl·lules canceroses. Malgrat alguns bons resultats, la gran limitació d'aquestes aproximacions va resultar la incapacitat de poder arribar a totes les cèl·lules tumorals, sobretot en tumors sòlids, ja que el vector no replica i, per tant, l'efecte terapèutic no és eficient.

Degut als avenços en el coneixement de la biologia molecular del càncer, així com al desenvolupament de l'enginyeria genètica aplicada als virus, en els últims anys s'ha recuperat el concepte de viroteràpia del càncer i s'han generat uns nous agents biològics molt prometedors, amb baixa patogenicitat per teixits normals i gran capacitat oncolítica. El gran avantatge respecte la teràpia gènica del càncer és la replicació selectiva, que amplifica la dosi administrada i crea una gran concentració de l'agent terapèutic al tumor, a la vegada que limita la toxicitat als teixits normals. A més, l'aparició de resistències tumorals al tractament és teòricament inviable, degut a la lisi directa de la cèl·lula tumoral i a que aquest procés de lisi involucra moltes vies cel·lulars (Chiocca, 2002). L'any 1991, Martuza i col·laboradors van ser pioners en el disseny racional de virus de replicació condicionada al delectonar el gen timidina quinasa del virus Herpes Simplex (HSV) i proposar la replicació selectiva d'aquest virus a cèl·lules que es replicaven activament (Martuza *et al.*, 1991). A més, també es va reprendre l'interès per virus amb oncotropisme natural, i es va descriure, per exemple, que la selectivitat tumoral del reovirus depèn de

l'activació de la via de Ras (Strong *et al.*, 1998), o que el virus de la estomatitis vesicular (VSV) replica selectivament a cèl·lules amb defectes a la via de l'interferó (Stojdl *et al.*, 2000). Actualment, com a mínim 15 constructes virals diferents (12 d'ells genèticament modificats) han estat administrats en assajos clínics, arribant dos d'ells a assajos clínics randomitzats de fase III.

2.1. VIROTERÀPIA AMB ADENOVIRUS

Malgrat la gran varietat de virus testats, i gràcies als esforços d'Onyx Pharmaceuticals (Richmond, Califòrnia, Estats Units), l'estudi i disseny d'adenovirus de replicació condicionada (CRADs) és el camp més actiu dins de la viroteràpia del càncer. Són els vectors més emprats degut, en bona part, a la raonable seguretat que presenten (Brandt *et al.*, 1969; Takafuji *et al.*, 1979). El 80% de la població presenta anticossos contra el serotip 5 (el més emprat en viroteràpia) i menys del 15% de pacients exposats a adenovirus desenvolupen alguna simptomatologia clínica, fins i tot entre els immunodeprimits. A més, ja han estat emprats de forma segura com a vectors no replicatius, encara que amb presència d'algun cas d'hepatotoxicitat i de mortalitat a dosis superior a $2 \cdot 10^{13}$ partícules virals (Zhang *et al.*, 1995). Recentment, la viroteràpia amb adenovirus ha culminat en l'aprovació per part del govern xinès del primer adenovirus oncolític (H101) per al tractament del càncer (Garber, 2006).

2.1.1. Característiques generals dels adenovirus

Els adenovirus són virus d'ADN de cadena doble i es classifiquen dins de la família *Adenoviridae*. El primer membre de la família va ser aïllat al 1953 per Rowe i col·laboradors a partir d'amígdals i ganglis adenoides humans (Rowe *et al.*, 1953). Actualment, s'han descrit més de 100 membres d'aquesta família, incloent 51 serotips diferents propis d'humans (Knipe *et al.*, 2007). Els adenovirus humans dels serotips 2 i 5 (subgrup C) són els més emprats com a vectors oncolítics. Els membres d'aquest subgrup infecten el teixit epitelial del tracte respiratori, produint afeccions respiratòries lleus, que inclouen congestió nasal i tos.

2.1.1.1. Estructura del virió

El virió de l'adenovirus mesura entre 60 i 90 nm de diàmetre i no té envolta lipídica (**Figura 3a**). Està compost per una càpsida icosaèdrica que embolcalla una molècula d'ADN de doble cadena. La càpsida proteica està formada per tres proteïnes majoritàries: la proteïna de l'hexó (polipèptid II), que forma les 20 cares de l'icosaèdre; la proteïna de la base del pentó (polipèptid III), que forma els 12 vèrtexs de l'icosaèdre; i la proteïna de la fibra (polipèptid IV), que emergeix de cada un dels 12 vèrtexs a mode d'antena. La proteïna de la fibra està constituïda per tres dominis: la cua de l'extrem N-terminal, que interacciona amb la càpsida i s'anomena *tail*, una regió central anomenada *shaft* o cos de la fibra, i el domini globular *knob*, que correspon a l'extrem C-terminal. La fibra, juntament amb la base del pentó, interacciona amb la cèl·lula diana i defineix el tropisme del virus (Russell, 2000). A més, també formen part de la càpsida quatre proteïnes minoritàries, anomenades de cimentació: pIIIa, pVI, pVIII i pIX (**Figura 3b**). A l'interior de l'embolcall proteic, la doble cadena d'ADN està associada a quatre proteïnes diferents: pV, pVII, mu i proteïna terminal (TP). A l'interior de la càpsida, també hi trobem múltiples còpies de la proteasa de l'adenovirus.

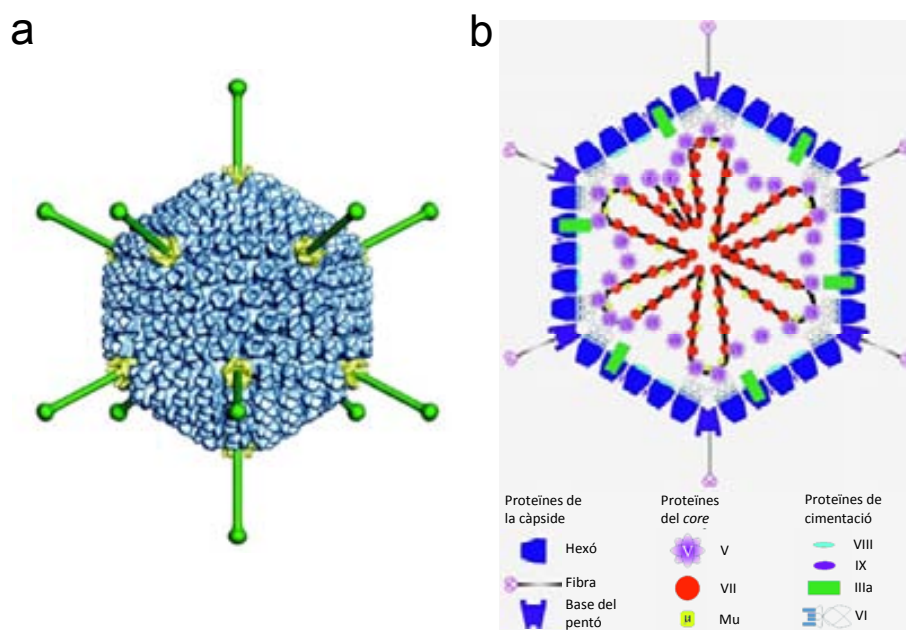


Figura 3. Estructura de l'adenovirus. (a) Estructura del virió a una resolució de 1,7 Å. Cadascuna de les 20 cares de la càpsida està formada per 12 molècules del trímer hexó (blau). A cadascun dels vèrtexs, la proteïna fibra (verd) sobresurt de la proteïna de la base del pentó (groc) (modificat de Zhang & Bergelson, 2005). (b) Estructura proteica de l'adenovirus. Les localitzacions de les proteïnes de la càpsida i de les proteïnes de cimentació estan ben definides, mentre que la disposició dels components del nucli i de l'ADN viral és conjuntural (modificat de Russell, 2000).

2.1.1.2. Estructura del genoma

Per conveni, el mapa genòmic de l'adenovirus es dibuixa amb la unitat que primer s'expressa durant el cicle viral (E1) a l'extrem esquerra (**Figura 4**). El genoma de l'adenovirus de tipus 5 és una doble cadena d'ADN lineal d'aproximadament 36 Kb i conté la informació necessària per a dur a terme el cicle viral infectiu i sintetitzar les proteïnes estructurals. La informació genòmica es presenta distribuïda en cassets gènics o unitats transcripcionals solapats en ambdues cadenes de l'ADN i, gràcies al processament alternatiu (*splicing*), s'arriben a traduir fins a 50 proteïnes diferents (Verma and Weitzman, 2005). Els 8 cassets gènics (transcrits per l'ARN polimerasa II) s'agrupen en funció de la cronologia en la seva transcripció: 5 unitats de transcripció primerenca (E1A, E1B, E2, E3 i E4), dues unitats de transcripció intermèdia (pIX i IVa2) i una unitat de transcripció tardana sota el control del promotor tardà o *Major Late Promoter* (MLP), a través del qual es generen cinc famílies d'ARNs tardans (L1-L5) que donaran lloc a totes les proteïnes estructurals. A més, el genoma adenoviral també conté els gens VA-RNAs, que codifiquen dos ARNs no traduïts que són transcrits per l'ARN polimerasa III. En ambdós extrems del genoma hi ha dues seqüències repetides invertides, les ITR (*Inverted Terminal Repeat*), que són idèntiques entre elles i contenen els orígens de replicació de l'ADN viral. A unes 100 pb de la ITR esquerra (ITR-L) s'hi troba la seqüència d'encapsidació, formada per repeticions riques en adenina i timina i que té un paper important en l'encapsidació del virus. La integritat i la infectivitat de les partícules virals es poden veure afectades per canvis en la mida i l'estructura del genoma, fet que cal tenir en consideració a l'hora de modificar-ne el genoma per al seu ús en viroteràpia (Bett *et al.*, 1993; Shayakhmetov *et al.*, 2004).

2.1.1.3. Biologia del cicle viral infectiu

Els adenovirus són virus amb cicle lític. El cicle es pot dividir en dues fases temporals: la fase primerenca comprèn l'entrada i la internalització de l'adenovirus a la cèl·lula hoste, el desacoblament de les proteïnes estructurals, el transport del genoma al nucli, la replicació del genoma viral i la traducció dels gens primerencs (**Figura 5**); la fase tardana s'inicia amb la transcripció i la traducció dels gens d'expressió tardana, continua amb l'acoblament de les proteïnes estructurals per formar els virions i finalitza amb l'encapsidació del genoma de l'adenovirus a l'interior de la càpsida. El cicle viral finalitza amb la lisi de la cèl·lula hoste i la sortida de la progènie viral al medi extracel·lular.

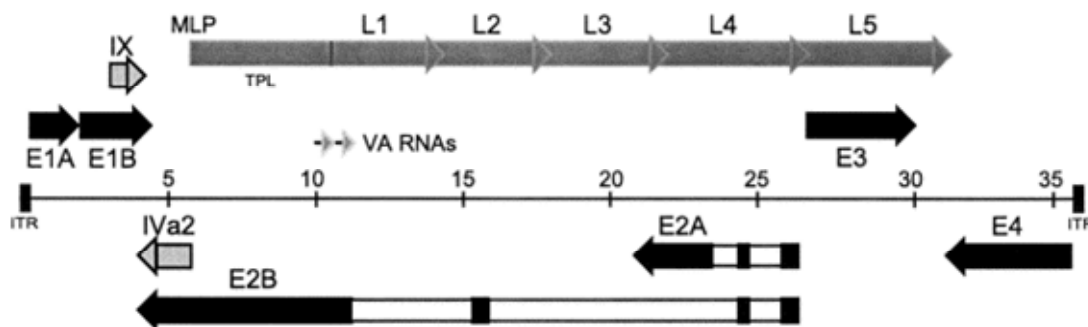


Figura 4. Organització genòmica de l'adenovirus de tipus 5. L'ADN de doble cadena es representa com una línia al centre de la figura, amb les dues repeticions terminals invertides (ITR) als extrems. La llargària de l'ADN està marcada en kilobases. Les unitats transcripcionals es mostren en la seva orientació i posició en el genoma. Els gens primerencs estan indicats amb fletxes negres, i els gens intermedis i tardans amb fletxes grises (modificat de Tauber and Dobner, 2001).

2.1.1.3.1. Adsorció i entrada a la cèl·lula

El cicle viral infectiu s'inicia amb l'entrada de l'adenovirus a la cèl·lula hoste. En les cèl·lules epitelials de les vies respiratòries, aquesta entrada es dona mitjançant una primera interacció entre el domini *knob* de la proteïna de la fibra i el receptor primari de l'adenovirus, CAR. Aquesta unió és d'alta afinitat, però no és suficient per activar l'entrada a la cèl·lula de forma eficient. Cal una segona interacció entre la proteïna de la base del pentó i les integrines cel·lulars $\alpha_v\beta_3$ i $\alpha_v\beta_5$ per a la internalització de l'adenovirus (Nemerow and Stewart, 1999). Aquesta interacció amb les integrines es realitza a través del domini RGD (Arg-Gly-Asp) present a la proteïna de la base del pentó. També s'ha descrit que interaccions de baixa afinitat amb els heparan-sulfats-glicosaminoglicans (HSG) poden produir la internalització dels adenovirus de tipus 2 i 5 en absència de CAR (Dechechi *et al.*, 2001; Bayo-Puxan *et al.*, 2006). La seqüència aminoacídica KKTK⁹¹⁻⁹⁴ de la tercera posició del *shaft* de la fibra es troba conservada en els adenovirus del subgrup C i s'ha descrit com el domini d'unió als HSG (Zhang and Bergelson, 2005).

La transducció del fetge per part dels adenovirus, però, es produeix per una via diferent degut a la interacció del virus amb factors sanguinis. El factor de coagulació IX (FIX) i la proteïna d'unió al complement C4 (C4BP) s'uneixen al domini *knob* de la fibra, i el factor de coagulació X (FX) s'uneix a les regions hipervariables de la proteïna de l'hexó. Ambdues interaccions fan de pont entre l'adenovirus i entre els HSGs i les LRP (proteïnes relacionades amb el receptor de

lipoproteïnes de baixa densitat) de l'hepatòcit (Shayakhmetov *et al.*, 2005; Kalyuzhniy *et al.*, 2008; Waddington *et al.*, 2008). Aquest mecanisme s'ha descrit recentment, i resta per dilucidar si aquesta via d'entrada és específica de l'hepatòcit o és comuna per a totes les cèl·lules del fetge i per a tots els òrgans on l'adenovirus arriba per via sanguínia.

La unió de l'adenovirus amb els seus receptors permet la seva internalització mitjançant la formació de vesícules de clatrina. La fusió de les vesícules amb els lisosomes provoca un canvi de pH i el desacoblament parcial de la càpsida. La destrucció de l'endosoma provoca la sortida del virus al citoplasma, on s'associa amb els microtúbuls i és transportat fins als porus nuclears. Finalment, l'ADN viral és injectat al nucli a través del porus després de l'ancoratge de la càpsida.

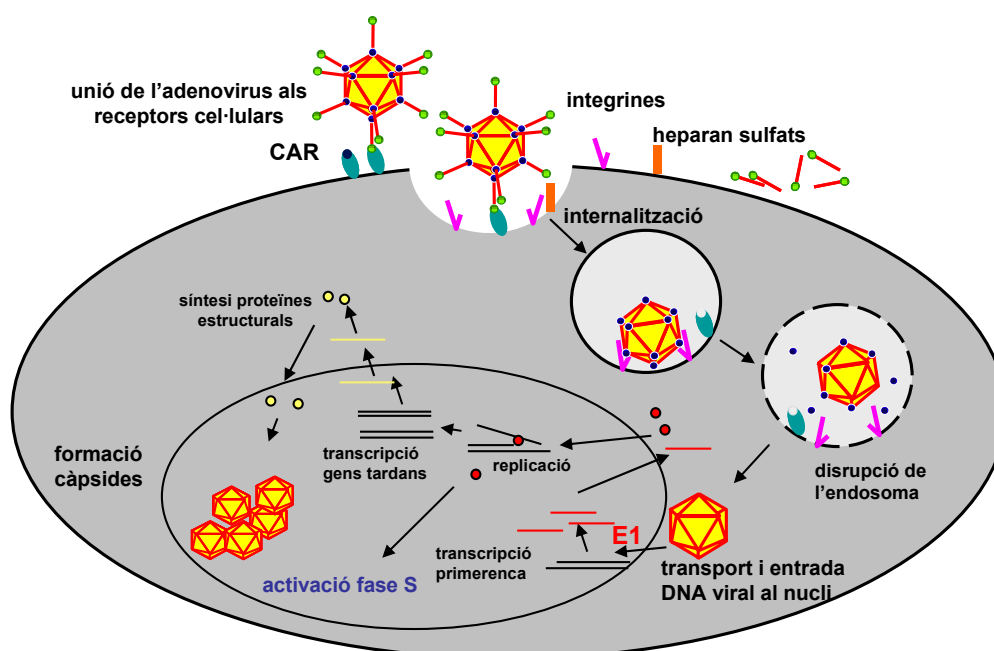


Figura 5. Cicle infectiu de l'adenovirus. El virus arriba al nucli, on comença la transcripció dels gens virals per a la replicació del seu genoma i la síntesi de les proteïnes estructurals.

2.1.1.3.2. Expressió de gens primerencs

Un cop al nucli, comença la transcripció dels gens primerencs. La fase primerenca té com a objectius la inducció de la fase S cel·lular, la protecció enfront de la resposta antiviral i la síntesi de les proteïnes necessàries per a la replicació de l'ADN viral. A mesura que es generen, els ARN missatgers són transportats al citoplasma per ser traduïts a proteïnes, i les proteïnes resultants tornen al nucli dirigides per la seqüència de localització nuclear.

El gen E1A és el primer en ser transcrit en una infecció. El seu promotor es transcriu constitutiva i immediatament després de l'entrada de l'ADN al nucli gràcies a una sèrie de potenciadors de la transcripció (*enhancers*), situats davant de la zona codificant del gen (Yoshida *et al.*, 1995). L'ARNm d'E1A sintetitza per processament alternatiu dues proteïnes diferents a l'etapa primerenca. Les dues variants, anomenades 12S i 13S pel seu coeficient de sedimentació, es diferencien únicament en 46 aminoàcids addicionals en la forma 13S. A través de tres regions conservades (CR1, CR2 i CR3), les proteïnes E1A duen a terme dues funcions principals: induir la transició de la cèl·lula a fase S i activar la transcripció de la resta d'unitats transcripcionals (E1B, E2A, E2B, E3, E4 i la unitat de transcripció tardana). La inducció de la fase S cel·lular és un requisit per al cicle lític de l'adenoviurs. La proteïna E1A-12S indueix l'entrada de la cèl·lula a fase S a través de la interacció del motiu CR2 amb la proteïna pRB cel·lular, i a través de la interacció de l'extrem N-terminal i del motiu CR1 amb p300. El segrest de pRB per part d'E1A allibera E2F i promou l'activació de la replicació de l'ADN. La proteïna E1A-13S, a més de les funcions anteriors, promou l'activació de la resta d'unitats virals a través de la unió del motiu CR3 amb factors de transcripció cel·lulars i amb el factor TFIID d'unió a la capsa TATA (Horikoshi *et al.*, 1991; Liu and Green, 1994).

La desregulació del cicle cel·lular provocada per E1A indueix l'acumulació de la proteïna p53 amb l'objectiu d'arrestar la cèl·lula infectada i de induir l'apoptosi. Per evitar la mort prematura de la cèl·lula infectada, l'activació de la subunitat E1B per part d'E1A evita la funció de p53. La proteïna E1B-55K es capaç d'unir-se a p53 i reprimir l'activació dels promotor controlats per aquest factor de transcripció. La proteïna E1B-19K és un homòleg de la proteïna anti-apoptòtica Bcl-2 i és capaç d'unir-se a les proteïnes pro-apoptòtiques BAX, BAK, BIK, BNIP1 i BNIP3 per evitar l'apoptosi de la cèl·lula infectada.

Els gens de la regió E2, induïts també per E1A, codifiquen per les proteïnes necessàries per a la replicació del genoma viral, com la proteïna pre-terminal, l'ADN polimerasa o la proteïna d'unió a ADN de cadena senzilla.

Al final de l'extrem dret del genoma adenoviral es troba la unitat de transcripció E4, induïda també per la interacció d'E1A amb factors cel·lulars. Les funcions dels productes gènics d'aquesta unitat inclouen replicació viral, estabilitat i transport dels ARNm virals o inducció de l'expressió de gens virals tardans. Entre aquests productes gènics, en destaca la proteïna E4-6/7, que actua com un transactivador de la transcripció, complementant la funció d'E1A. E4-6/7 és capaç d'unir-se al factor de transcripció E2F i desplaçar-ne les proteïnes pRB i p107, formant un

complex amb dos molècules d'E2F. Aquest complex indueix la unió estable d'E2F amb l'estructura única de llocs d'unió present en el promotor E2F-1, incrementant de manera exponencial la seva transcripció (Schaley *et al.*, 2000) (**Figura 6**). D'aquesta manera, el virus potencia la inducció de la fase S del cicle cel·lular. Aquest mateix motiu de llocs d'unió del factor de transcripció E2F es troba present en el promotor E2 dels adenovirus de tipus 2 i 5 (Tauber and Dobner, 2001), potenciant així a la vegada l'expressió de tots els gens de replicació del genoma viral.

A més, el genoma adenoviral també codifica per a una sèrie de gens destinats a protegir la cèl·lula infectada de les defenses de l'hoste. La proteïna E1A, a més de totes les funcions ja descrites, bloqueja l'expressió dels gens expressats en resposta als IFNs (Wold *et al.*, 1999). Per altre costat, els ARNs VA, codificats pels gens VA, inhibeixen l'activació de la PKR, desactivant així la inhibició de la síntesi proteica induïda per la presència d'ARNs de doble cadena (Kitajewski *et al.*, 1986). Finalment, els gens de la regió E3 codifiquen per a una sèrie de proteïnes importants per evadir la resposta immune antiviral (Horwitz, 2004). Les funcions d'aquests gens inclouen la inhibició de l'apoptosi produïda per limfòcits T citotòxics i la produïda per TNF- α . A més, la proteïna E3-19K prevé la resposta de limfòcits T citotòxics i de les cèl·lules NK inhibint el reconeixement de la cèl·lula infectada (Cox *et al.*, 1991). E3-19K és una proteïna transmembrana retinuda al reticle endoplasmàtic que segresta tant el MHC-I com els lligands MICA i MICB per evitar el reconeixement per part dels limfòcits T citotòxics i de les cèl·lules NK (Hermiston *et al.*, 1993; McSharry *et al.*, 2008).

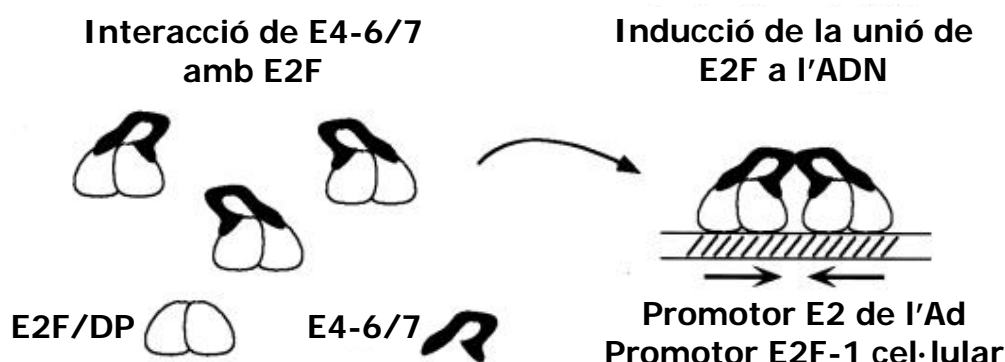


Figura 6. Inducció de la unió d'E2F a l'ADN per part d'E4-6/7. E4-6/7 forma un complex amb dímers de E2F-DP lliures i indueix la unió estable d'E2F a l'estructura única de llocs d'unió d'aquest factor present al promotor d'E2 de l'adenovirus i E2F-1 cel·lular (modificat de Schaley *et al.*, 2000).

2.1.1.3.3. Expressió de gens tardans, acoblament dels virions, lisi i alliberació dels virions

Els gens d'expressió tardana codifiquen per a moltes de les proteïnes estructurals de la càpsida, i es troben agrupats en la unitat de transcripció tardana anomenada *Major Late Unit* (MLU). Al finalitzar la replicació del genoma viral, l'activitat del promotor tardà principal (MLP) s'intensifica (McConnell and Imperiale, 2004) gràcies a un canvi en l'estructura del genoma adenoviral i a l'activació per part de la proteïna IVa2 viral (Chen *et al.*, 1994). Els ARNm tardans s'acumulen al citoplasma i es tradueixen selectivament a la fase tardana degut a la presència del líder tripartit, una seqüència comuna a tots els trànscrips sintetitzats a partir del MLP i que permet la transcripció sense l'acció de les helicases (Huang and Schneider, 1991). Un cop traduïdes, les proteïnes són transportades al nucli, on es van acoblant els virions fins a la formació de les càpsides buides immadures. Finalment, la formació de l'adenovirus finalitza amb l'empaquetament dels genomes virals a dins de les càpsides, mediat per la seqüència d'encapsidació.

L'últim pas del cicle infectiu, la lisi de la cèl·lula infectada i l'alliberament de la progènie viral, és un dels més desconeguts. A la fase tardana de la infecció, s'acumulen les càpsides al nucli i es disgreguen els filaments intermedis del citoesquelet cel·lular. Això arrodoneix l'aspecte de la cèl·lula i evidencia el característic efecte citopàtic (CPE), tenint-hi un paper important la proteasa L3 del virus al digerir la citoqueratina dels filaments intermedis (Chen *et al.*, 1993). A més, la proteïna E3-11.6K, també anomenada ADP o proteïna de mort de l'adenovirus, juga un paper important en la lisi de la cèl·lula hoste, encara que se'n desconeix la funció exacta. S'ha especulat, però, que pot formar canals de calci o d'altres ions imitant la funció de les viroporines presents en altres virus (Doronin *et al.*, 2003).

2.1.2. Disseny d'adenovirus selectius de tumor

A diferència d'altres virus, com el reovirus o el virus de l'estomatitis vesicular, els adenovirus salvatges no presenten una replicació preferent a cèl·lules tumorals, i cal la modificació genètica del seu genoma per restringir el cicle replicatiu a cèl·lules tumorals. El coneixement del cicle i de la funció de les proteïnes virals, juntament amb el desenvolupament de les tècniques d'enginyeria genètica, ha permès el disseny racional d'adenovirus oncolítics. El redireccionament del tropisme de l'adenovirus cap a les cèl·lules tumorals es pot aconseguir mitjançant tres estratègies diferents: la deleció de funcions virals que són complementades per la

cèl·lula tumoral, el control de gens virals mitjançant promotors o seqüències exògenes d'ADN (*targeting* transcripcional o traduccional) i el direccionament preferencial de la infecció del virus cap a cèl·lules tumorals (*targeting* transduccional). La combinació d'aquestes tres estratègies ha permès generar una sèrie d'adenovirus oncolítics que demostren gran especificitat per la cèl·lula tumoral, alguns dels quals ja han estat testats en assajos clínics.

2.1.2.1. Delecions de gens virals que confereixen selectivitat tumoral

Les cèl·lules tumorals presenten una sèrie d'alteracions que són comunes a la infecció amb adenovirus. Entre elles, les més destacables són la inactivitat de p53 i de la proteïna pRB. La redundància d'aquestes funcions a cèl·lules tumorals fa que se'n puguin delectonar els gens responsables i que la replicació només es vegi afectada a cèl·lules normals. Basant-se en aquest concepte, Frank McCormick va proposar al 1996 el primer adenovirus de replicació selectiva. El virus, anomenat dl1520 o Onyx-015, contenia la delecio del gen E1B-55K (Bischoff *et al.*, 1996). A cèl·lules normals, aquesta proteïna s'uneix a p53 i l'inactiva, evitant l'apoptosi i permetent la replicació viral. Aquesta funció és innecessària a la majoria de cèl·lules tumorals, ja que p53 es troba inactivat en un alt percentatge de tumors. Malgrat això, la proteïna E1B-55K realitza altres funcions apart de la inactivació de p53, com inhibir el transport d'ARNm i la traducció de proteïnes de la cèl·lula hoste (Hay *et al.*, 1999). La cèl·lula tumoral no és capaç de complementar aquestes funcions virals i això causa l'atenuació del virus i repercuteix en l'eficàcia antitumoral (Chu *et al.*, 2004).

Per dirigir la replicació selectiva de l'adenovirus cap a cèl·lules amb defectes a la via de RB, l'any 2000 es va proposar la delecio de la regió conservada 2 de la proteïna E1A (Fueyo *et al.*, 2000; Heise *et al.*, 2000). Es va proposar aquesta mutació ja que la regió CR2 d'E1A és la responsable del segrest de la proteïna pRB, i la delecio complerta d'E1A no és viable degut a que realitza altres funcions importants, entre elles, activar la transcripció de les altres proteïnes virals. Els virus que contenen aquesta mutació ($\Delta 24$ o dl922-927) no són capaços de desfer la unió entre RB i E2F a cèl·lules normals, però repliquen de forma similar a l'adenovirus salvatge a cèl·lules tumorals (**Figura 7**). Malgrat això, la selectivitat d'aquests virus és limitada degut a que la regió CR1 manté la seva funció, i E1A conserva certa capacitat d'induir la fase S cel·lular a través de la unió amb p300. A més, la proteïna E4-6/7 també és capaç de desplaçar pRB d'E2F i activar el cicle cel·lular.

A més, també s'ha descrit que la deleció dels gens VA-RNAs (Cascallo *et al.*, 2003; Cascallo *et al.*, 2006) confereix replicació selectiva a cèl·lules tumorals amb la via de Ras activada o la via de l'interferó truncada, defectes molt comuns en cèl·lules tumorals.

Malgrat la selectivitat atorgada per aquestes mutacions, les proteïnes virals, sobretot E1A, es continuen expressant a cèl·lules normals; després de la injecció sistèmica d'aquests adenovirus, l'expressió d'E1A a les cèl·lules del fetge provoca una elevada toxicitat hepàtica (Engler *et al.*, 2004). Per tant, si es vol dissenyar un adenovirus per tractar càncers en estat avançat, on l'administració sistèmica serà necessària, cal disminuir la toxicitat associada a l'expressió de proteïnes virals.

2.1.2.2. Control de l'expressió de proteïnes: targeting transcripcional i traduccional

La introducció de seqüències exògenes s'utilitza per restringir la transcripció o la traducció de gens virals essencials per al cicle viral (E1A, E1B, E2 o E4). D'aquesta manera, l'expressió de les proteïnes virals només té lloc a les cèl·lules on el promotor és actiu. Entre les proteïnes virals que es poden controlar, en destaca E1A, ja que és la primera proteïna que s'expressa quan l'adenovirus arriba a la cèl·lula i l'expressió de les altres proteïnes virals està condicionada a la seva activació.

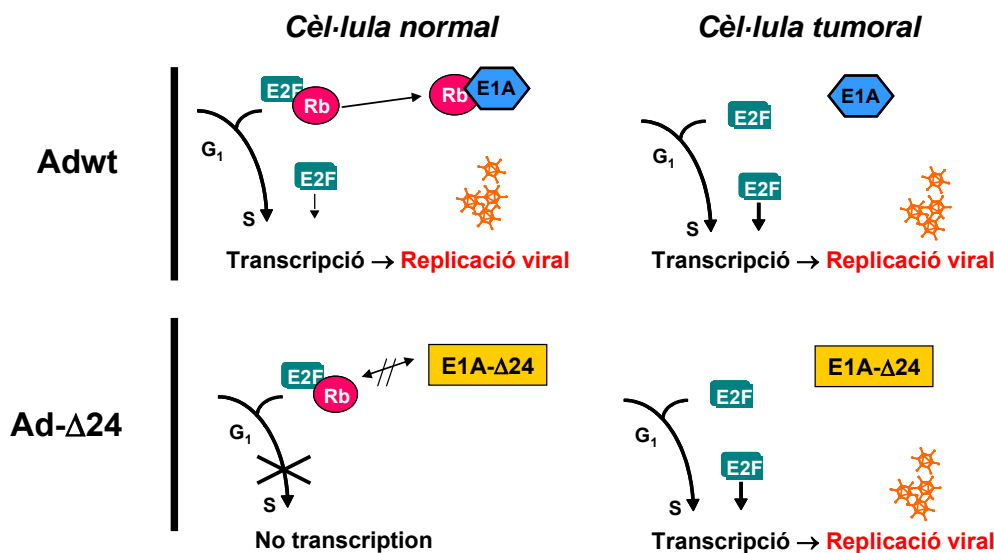


Figura 7. Mecanisme de selectivitat tumoral de l'Ad-Δ24. La proteïna E1A de l'adenovirus segresta pRB per induir l'entrada de la cèl·lula a fase S i la replicació del virus. A la cèl·lula tumoral, aquesta funció no és necessària ja que la via de RB està truncada i E2F es troba ja lliure. A cèl·lules normals, la deleció Δ24 impedeix la dissociació de RB i E2F i no hi ha replicació viral.

El primer virus dissenyat seguint aquesta estratègia va ser l'adenovirus CV706 (CN706) (Rodríguez *et al.*, 1997), on l'expressió d'E1A estava controlada pel promotor de l'antigen específic de pròstata (PSA). Aquest virus anava destinat al tractament del càncer de pròstata, tumors on l'expressió d'aquest marcador està molt incrementada. Seguint aquesta línia, s'ha utilitzat una gran quantitat de promotors diferents per al tractament de diferents tipus de tumor, incloent el promotor de la α -Fetoproteïna per al tractament de l'hepatocarcinoma (Hallenbeck *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2001) o el promotor del receptor d'estrògens per al tractament del càncer de mama (Hernandez-Alcoceba *et al.*, 2002). Fins i tot, s'han controlat dos gens virals diferents, com E1A i E2 o E1A i E4, amb dos promotors diferents per augmentar la selectivitat dels virus, tot i que, amb aquesta estratègia, la replicació dels virus a cèl·lules tumorals queda més limitada. Per altra banda, també s'ha testat el control de diferents gens virals amb el mateix promotor, però crea inestabilitat genòmica. Malgrat la selectivitat que presenta l'ús de promotors específics de teixit, un promotor actiu a un ampli rang de tipus tumorals representa un clar benefici per poder tractar un nombre més elevat de pacients i per poder tractar càncers en estat avançat, ja que les metàstasis poden haver perdut l'expressió de marcadors. Fins i tot dins d'un mateix tumor primari, l'expressió de marcadors tumorals és diferencial (Chu *et al.*, 2004), i això prioritza l'ús de promotors que explotin característiques essencials de les cèl·lules tumorals.

Un promotor potent que estigui reprimat a cèl·lules normals i activat a cèl·lules tumorals és ideal per aconseguir un potent efecte antitumoral amb baixa toxicitat als teixits normals. En els últims anys, s'han generat adenovirus utilitzant promotors que exploten característiques globals dels tumors, com la sobreexpressió de telomerasa, utilitzant el promotor hTERT (Huang *et al.*, 2003), o la hipòxia, utilitzant el promotor HIF (Post and Van Meir, 2003; Post *et al.*, 2007). Degut a la desregulació de la via de RB en el 100% dels tumors, els promotors que responen al factor de transcripció E2F atorguen un ampli tropisme als virus oncolítics. Entre aquests promotors, en destaca el promotor d'E2F-1, ja que l'estructura única de llocs d'unió d'E2F li confereix una elevada potència de transcripció. En cèl·lules normals, els virus que incorporen aquest promotor controlant E1A (Johnson *et al.*, 2002; Tsukuda *et al.*, 2002) inhibeixen la transcripció d'E1A mitjançant la unió de complexos pRB-E2F-HDAC. En cèl·lules tumorals, la unió d'E2F lliure al promotor d'E2F-1 activa l'expressió d'E1A. A la vegada, E1A activa l'expressió de tots els altres gens virals i indueix el cicle de l'adenovirus. A més, la proteïna E4-6/7, transcrita per l'acció d'E1A, s'uneix a E2F lliure i provoca un potent cercle d'autoactivació induint una unió més forta amb l'estructura única de llocs del promotor E2F-1, produint nivells més elevats d'E1A.

Una estratègia diferent per al control de la transcripció de gens virals és la construcció de promotors artificials. Els promotors artificials són seqüències modulares que combinen llocs d'unió per factors de transcripció i silenciadors o potenciadors de la transcripció (*enhancers*), tot unit al nucli d'un promotor (Hernandez-Alcoceba *et al.*, 2002; Peter *et al.*, 2003). Per altra banda, el grup del doctor Richard Iggo ha testat una aproximació més conservadora que utilitza també aquestes seqüències modulares. Aquesta estratègia consisteix en la modificació dels promotors natius virals mitjançant la inserció de llocs d'unió per factors de transcripció, com per exemple, llocs d'unió per TCF/LEF per al tractament de tumors amb la via de Wnt activada (Brunori *et al.*, 2001; Fuerer and Iggo, 2002). En aquest cas, es conserva millor la composició original del genoma de l'adenovirus, però cal considerar l'estructura dels promotors virals, ja que el lloc d'inserció i la distància entre aquests serà clau per a l'èxit de l'estratègia.

Una premissa que cal tenir en compte a l'hora de modificar el control transcripcional d'E1A són els potenciadors i els llocs críptics d'inici de la transcripció presents al braç esquerra del genoma adenoviral, que poden provocar una pèrdua de selectivitat del promotor inserit per al control d'E1A. Per evitar la transcripció iniciada pels llocs críptics, es pot situar una seqüència de poliadenilació (polyA) davant del promotor exogen (Majem *et al.*, 2006). Per evitar la funció dels potenciadors de la transcripció, s'han proposat diferents estratègies. Aquests potenciadors, que actuen sobre el promotor d'E1A i en *cis* sobre els altres promotors primerencs de l'adenovirus (Hearing and Shenk, 1986), no poden ser deletats degut a que es troben dintre de la seqüència d'encapsidació. Una estratègia, utilitzada per Hsieh i col·laboradors, consisteix en recol·locar tot el casset "promotor-E1A" en l'orientació inversa (Hsieh *et al.*, 2002), tot i que d'aquesta manera els *enhancers* continuen actuant en *cis* sobre el promotor exogen. Una altra estratègia consisteix en la recol·locació de la senyal d'encapsidació de l'adenovirus i els *enhancers* d'E1A al braç dret del genoma, al costat de l'ITR dreta (Fuerer and Iggo, 2002; Jakubczak *et al.*, 2003), tot i que els *enhancers* també actuen en *cis* i aquesta relocalització s'ha relacionat amb inestabilitat del genoma adenoviral. La utilització d'aïllants gènics per evitar l'acció dels *enhancers* en adenovirus defectius en replicació (Steinwaerder and Lieber, 2000; Martin-Duque *et al.*, 2004) o en adenovirus oncolítics (Majem *et al.*, 2006) ha demostrat millorar la fidelitat de promotors selectius, tot i que representa un augment important en la mida del genoma adenoviral i inhibeix l'acció en *cis* dels *enhancers* sobre els altres promotors virals.

A més del control transcripcional, també s'han utilitzat seqüències reguladores de la traducció per al control de l'expressió d'E1A. Entre elles, en podem destacar la inserció d'una

seqüència complementària a un microARN específic de fetge en l'extrem 3' de la regió no traduïda (UTR) (Ylosmaki *et al.*, 2008) o la utilització de UTRs de diferents gens per controlar l'estabilitat i la degradació del transcrit d'E1A (Stoff-Khalili *et al.*, 2008).

2.1.2.3. Modificació del tropisme de l'adenovirus: targeting transduccional

El *targeting* transduccional pretén que l'adenovirus infecti preferentment les cèl·lules tumorals per evitar la toxicitat i per augmentar l'efecte oncolític. Per modificar el tropisme viral, és necessari eliminar primer l'entrada del virus a la cèl·lula normal (*detargeting*), eliminant-ne sobretot el tropisme hepàtic, per després redirigir la infecció cap a la cèl·lula tumoral (*retargeting*).

Degut a l'important paper que realitza en el tropisme hepàtic la interacció amb factors sanguinis, l'eliminació de la interacció amb aquests factors disminueix dràsticament la quantitat de virus que queda retinguda al fetge (Bayo-Puxan *et al.*, 2006; Waddington *et al.*, 2008) i augmenta la quantitat de virus que arriba al tumor. Malauradament, un estudi realitzat al nostre laboratori indica que l'entrada de l'adenovirus al tumor també es veu reduïda per l'eliminació dels factors en sang (Gimenez-Alejandre *et al.*, 2008), el que dificulta el *detargeting* i prioritza la recerca de nous lligands específics de tumor que redirigeixin els virus cap a les cèl·lules tumorals.

Per a redirigir el virus cap al tumor, s'han dut a terme diferents estratègies, com la introducció de fibres d'altres serotips o xenotips, o el reemplaçament d'aquesta per altres molècules específiques de tumor. La principal estratègia per manipular el tropisme de l'adenovirus, però, ha estat la inserció de lligands específics de tumor. La inserció d'aquests lligands es realitza genèticament a les proteïnes de la càpsida, ja sigui a l'hexó, a la proteïna de la base del pentó, a la proteïna IX o a la fibra. En qualsevol d'aquests casos, el lligand inserit ha de quedar ben exposat per poder interaccionar amb el receptor diana i no modificar l'estructura de la proteïna viral on s'insereix. Mitjançant resolució cristal·logràfica de raigs X, s'han pogut identificar dominis que queden ben exposats i no interfereixen en la configuració estèrica de la proteïna. El bucle HI (*HI loop*) del domini *knob* de la fibra ha estat identificat com un d'ells i s'hi ha incorporat una gran varietat de lligands amb èxit (Krasnykh *et al.*, 1998; Xia *et al.*, 2000; Belousova *et al.*, 2002).

Entre els lligands incorporats a la fibra, el motiu CDCRGDCFC, conegut com a RGD-4C, és un dels més utilitzats. El receptor cel·lular CAR, utilitzat per l'adenovirus com a receptor primari,

està poc expressat en la majoria de cèl·lules tumorals (Bauerschmitz *et al.*, 2002). En canvi, les integrines, utilitzades com a receptor secundari mitjançant el motiu RGD de la base del pentó, es troben sobreexpressades en una gran quantitat de tumors sòlids. La incorporació del motiu RGD al *knob* de la fibra permet utilitzar les integrines com a receptor primari i l'entrada independent de CAR a la cèl·lula, augmentant així la infectivitat del virus per les cèl·lules tumorals (Bauerschmitz *et al.*, 2002).

El nostre grup ha descrit recentment una nova recol·locació del motiu RGD (Bayo-Puxan *et al.*, 2009). La substitució del motiu KKTK del *shaft* de la fibra, encarregat de la interacció amb els HSG, pel motiu RGDK, permet augmentar *in vivo* la quantitat de virus que arriba al tumor, a la vegada que disminueix la transducció del fetge.

2.1.3. ICOVIR-5

ICOVIR-5 és un adenovirus oncolític dissenyat al nostre grup per el tractament de neoplàsies disseminades mitjançant administració sistèmica (Cascallo *et al.*, 2007). Aquest virus combina varies modificacions genètiques per augmentar la selectivitat tumoral i inhibir la replicació del virus a teixits normals (**Figura 8**). ICOVIR-5 presenta una forta dependència de l'alteració de la via de RB degut a que incorpora el promotor E2F-1 controlant E1A, combinat amb la deleció $\Delta 24$. En una cèl·lula normal, la unió dels complexos pRB-E2F-HDAC al promotor d'E2F-1 provoca la inhibició de la transcripció d'E1A. La mutació $\Delta 24$ evita que E1A trenqui els complexos pRB-E2F en cas d'una expressió basal del promotor E2F-1. A més, per evitar l'acció dels llocs crítics d'inici de la transcripció i dels *enhancers* sobre el promotor, el virus incorpora una polyA i la seqüència aïllant del lloc de la distròfia muscular (DM) davant del promotor d'E2F-1. En una cèl·lula tumoral, la unió del factor de transcripció E2F lliure activa la transcripció d'E1A. E1A activa tots els altres gens virals, entre ells E4-6/7. E4-6/7 forma un complex amb E2F i activa més eficientment el promotor E2F-1 i el promotor d'E2, iniciant un cercle d'autoactivació molt potent. A més, el virus incorpora la seqüència Kozak davant del primer codó d'E1A. Aquesta seqüència afavoreix la unió del ribosoma a l'ARNm i augmenta l'eficiència de traducció (Kozak, 1986, 1987). La presència del motiu RGD a la fibra augmenta la infectivitat sobre cèl·lules tumorals.

ICOVIR-5 ha demostrat un alt nivell de selectivitat i un molt baix perfil de toxicitat després d'administrar-lo sistèmicament. A més, els estudis d'activitat antitumoral en models preclínics han mostrat uns resultats encoratjadors, tant administrat sol (Alonso *et al.*, 2007a; Cascallo *et al.*,

2007) com en combinació amb quimioteràpia (Alonso *et al.*, 2007b). Tots aquests resultats han portat al Servei d'Oncologia Mèdica de l'Institut Català d'Oncologia a plantejar un assaig clínic de fase I per avaluar la toxicitat sistèmica d'ICOVIR-5 i, de forma secundària, determinar indicis de resposta antitumoral sistèmica.

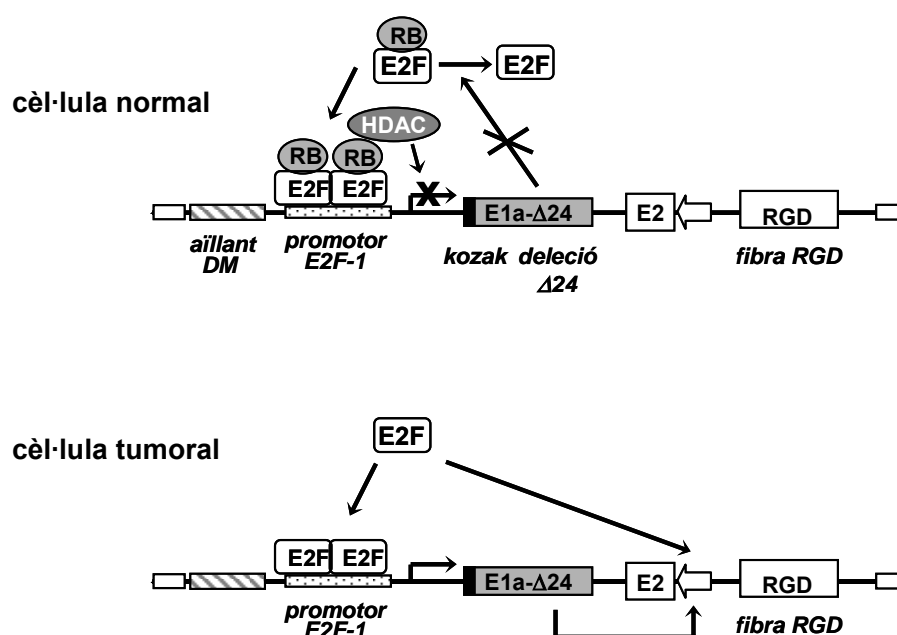


Figura 8. Diagrama de funcionament dels components genètics d'ICOVIR-5. En una cèl·lula normal, la unió de RB-E2F reprimeix la transcripció d'E1A-Δ24, que a la vegada és incapaç de desfer el complex RB-E2F. En una cèl·lula tumoral, la unió de E2F lliure activa la transcripció d'E1A, que a la vegada activa la transcripció de tots els gens virals per a la producció de virus i la lisi de la cèl·lula (modificat de Cascallo *et al.*, 2007).

No obstant això, els experiments al laboratori amb ICOVIR-5 també ens donen evidències d'una atenuació de la potència oncolítica en certs models tumorals, a més de certs impediments per superar les barreres que imposa el tumor a la dispersió del virus. Per aquest motiu, l'objectiu d'aquesta tesi és la recerca de noves estratègies que ens permetin augmentar la potència antitumoral d'ICOVIR-5 i superar les barreres que imposa el tumor a l'èxit de la viroteràpia.

2.1.4. L'experiència clínica amb adenovirus oncolítics

Diferents adenovirus oncolítics, majoritàriament l'Onyx-015, han estat testats en assajos clínics. La majoria d'aquests estudis s'han realitzat per administració intratumoral dels agents

oncolítics i, fins a la data, només dos adenovirus oncolítics han estat testats per administració sistèmica en assajos clínics de fase I i II (**Taula 1**).

Taula 1. Assajos clínics amb adenovirus oncolítics, injecció sistèmica. Fase I i II.

Virus	Dosi màxima	N	Efectes adversos	Tumor	Resposta	Referència
Onyx-015	5x 2x10 ¹² vp	11	Síntomes gripals	CRC	1/11 PR	(Reid <i>et al.</i> , 2001)
Onyx-015	1x10 ¹³ vp + Qx	27	Síntomes gripals	CRC. MH.	3/27 PR	(Reid <i>et al.</i> , 2002)
Onyx-015	2x10 ¹³ + 11x 2x10 ¹¹ vp	10	Síntomes gripals. TT. IL1, IL6, TNF α , IFN γ	Pulmó metastàtic	1/10 PR	(Nemunaitis <i>et al.</i> , 2001)
Onyx-015	1x10 ¹³ vp	5	No se'n van observar	HCC	1/5 \downarrow AFP	(Habib <i>et al.</i> , 2002)
Onyx-015	2x10 ¹³ vp	18	Síntomes gripals	CRC. MH.	4/18 \downarrow CEA	(Hamid <i>et al.</i> , 2003)
Onyx-015	2x10 ¹³ vp + Qx	10	Síntomes gripals	Metastàtic	0/10	(Nemunaitis <i>et al.</i> , 2003)
Onyx-015	4x 1x10 ¹² vp + bloquejant TNF	9	Síntomes gripals	Metastàtic	4/9 SD	(Nemunaitis <i>et al.</i> , 2007)
CG7870	6x10 ¹² vp	23	Síntomes gripals. TT. IL6, IL10	Pròstata	5/23 \downarrow PSA	(Small <i>et al.</i> , 2006)

N: número de pacients; vp: partícules virals; Qx: quimioteràpia; CRC: càncer colorectal; MH: metàstasi hepàtica; HCC: càncer hepatocel·lular; TT: transaminitis transitòria; PR: resposta parcial; SD: malaltia estable; AFP: α -fetoproteïna, marcador de progressió de tumors hepàtics; CEA: antigen carcinoembriònic, marcador de progressió de tumors colorectals; PSA: antigen prostàtic específic, marcador de progressió de tumors de pròstata.

El primer virus administrat de forma sistèmica va ser l'Onyx-015, que incorpora la deleció de la proteïna E1B-55K. Aquest virus, tot i presentar greus defectes en potència oncolítica degut a l'afectació de varies funcions virals, va ser ràpidament testat en assajos clínics degut a la baixa eficàcia que havien mostrat els adenovirus no replicatius utilitzats fins al moment (Alemany, 2007). Els primers assajos clínics d'administració intratumoral van demostrar una elevada seguretat del tractament, amb lleugers símptomes gripals com a únic efecte advers (Aghi and Martuza, 2005). La combinació del tractament amb quimioteràpia va resultar en una ràtio de respostes molt encoratjadora, amb 19/30 tumors reduint-se més d'un 50% i 8 respostes complertes (Khuri *et al.*, 2000; Lamont *et al.*, 2000). La reduïda toxicitat que es va observar

després d'administrar el virus intraperitonealment va permetre administrar el virus de forma sistèmica per al tractament de tumors colorectals, hepatocel·lulars i varis tumors sòlids metastàtics. En els diferents escalats de dosi, no es va arribar a una toxicitat limitant del tractament; malgrat això, en un estudi on un pacient va arribar a ser administrat amb 2×10^{13} vp al dia 1 de tractament, i posteriorment amb 11 administracions setmanals de 2×10^{11} vp (dosi acumulada de $4,2 \times 10^{13}$ vp), es van observar efectes adversos dependents de la dosi, com febre, vòmits, nàusees, calfreds i transaminitis transitòria (Nemunaitis *et al.*, 2001). En quant a l'activitat antitumoral, només una petita part dels pacients van presentar algun tipus de resposta, limitada a respostes parcials, malalties estables o disminució d'algun marcador tumoral. Malgrat la baixa activitat d'aquest virus, l'empresa xinesa Sunway Biotech està comercialitzant a Xina, per al tractament intratumoral del càncer de cap i coll, l'adenovirus H101, un derivat d'Onyx-015 amb l'activitat encara més reduïda, degut a la deleció dels gens E3.

L'altre adenovirus administrat sistèmicament és el CG7870. Aquest virus controla la proteïna E1A viral sota el promotor de la probasina, i la proteïna E1B sota el promotor PSA, el que el fa específic per al tractament del càncer de pròstata. Aquest virus, primer anomenat CV787 i després CG7870 degut a l'adquisició de l'empresa Calydon per part de Cell Genesys, va ser testat sistèmicament en un Fase I amb 23 pacients (Small *et al.*, 2006). A l'igual que amb l'Onyx-015, la majoria dels efectes adversos van ser símptomes gripals, però també es va observar a dosis elevades (de 6×10^{11} a 6×10^{12} vp) hipotensió de grau I i II, transaminitis transitòria de grau I i II, limfopènia de grau II i III, trombocitopènia de grau I i reducció d'un 20% dels nivells de dímer-D, a més d'una elevació d'interleucines. La reducció del marcador tumoral PSA en 3/8 pacients administrats a dosis elevades va ser l'única resposta reportada.

En general, els resultats d'assajos clínics on els adenovirus són injectats sistèmicament ens indiquen que es necessiten virus més potents i selectius. A més, aquesta via d'administració presenta una sèrie d'impediments imposats per la biologia del cos humà i pel microambient del tumor que és necessari superar per obtenir respostes antitumorals eficients.

2.1.5. Limitacions de la viroteràpia i obstacles a superar

2.1.5.1. Arribada de l'adenovirus al tumor

Els requeriments per a l'arribada del virus al tumor depenen del tipus tumoral, la seva localització i la disseminació de la malaltia. Quan la malaltia encara no es troba disseminada, l'administració local-regional del virus és una bona opció. Pel contrari, si la neoplàsia ja s'ha disseminada, l'administració via sanguínia serà necessària, tot i que presenta una sèrie de problemes i desavantatges (Figura 9). A més, la injecció intratumoral concentra tot el virus en un espai reduït, mentre que l'administració sistèmica permet l'arribada de menys virus però amb una distribució més uniforme i difusa (Wein *et al.*, 2003).

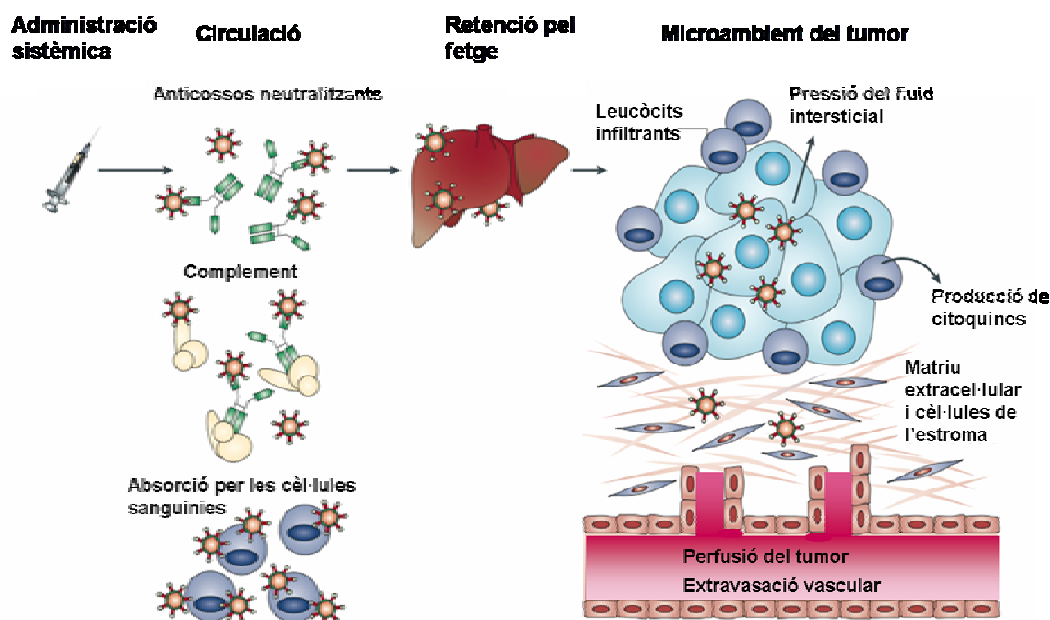


Figura 9. Barreres que dificulten l'arribada i distribució de l'adenovirus pel tumor. En el torrent sanguini, el virus pot ser neutralitzat per les cèl·lules sanguínies, per la cascada del complement o pels anticossos neutralitzants. Després, la majoria de virus queda retinguda pel fetge. El poc virus que s'escapa d'aquest òrgan torna a la circulació sanguínia i es distribueix pels altres òrgans. Perquè el virus accedeixi al tumor, s'ha d'extravasat de la vasculatura en contra del gradient de pressió present al fluid intersticial. Un cop al tumor, la seva dispersió es veu perjudicada per la presència de la matriu extracel·lular i de les cèl·lules de l'estroma. Finalment, els leucòcits infiltrats al tumor en poden limitar la seva dispersió mitjançant la seva activitat antiviral o mitjançant la secreció d'interferons i altres citoquines (modificat de Parato *et al.*, 2005).

L'adenovirus no està adaptat a la circulació pel torrent sanguini i és eliminat ràpidament després de la injecció sistèmica (Alemany *et al.*, 2000). Primerament, quan l'adenovirus entra en el torrent circulatori, aquest queda neutralitzat per la cascada del complement i per la unió a plaquetes i eritròcits (Carlisle *et al.*, 2009; Shimony *et al.*, 2009). A més, el 80% de la població presenta anticossos neutralitzants que també inactiven els adenovirus. Posteriorment, quan l'adenovirus arriba al fetge, aquest queda segrestat per diferents mecanismes. Les cèl·lules de Kupffer, els macròfags del fetge, eliminen els virus independentment de la interacció amb receptors cel·lulars (Smith *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2008). A més, els virus queden retinguts a l'espai de Disse del fetge (Di Paolo *et al.*, 2009), i aquesta retenció provoca la infecció massiva dels hepatòcits, ja sigui a través dels receptors de l'adenovirus o a través de la interacció amb factors sanguinis. Tot això provoca toxicitat hepàtica després de l'administració sistèmica i limita la biodisponibilitat del virus i la quantitat que n'arriba al tumor.

La alta permeabilitat i la desestructuració de la vasculatura del tumor facilita l'arribada de drogues per via sanguínia (Jang *et al.*, 2003). En el cas dels adenovirus, la grandària dels porus de la vasculatura del tumor, al igual que a la melsa i al fetge, permet l'extravasació de partícules de la grandària de l'adenovirus. Altres factors, com la grandària del tumor, també influeixen en la distribució del virus, ja que els tumors petits estan millor perfosos que els grans, que tenen més zones avasculares i necròtiques. Per últim, els adenovirus han de travessar l'espai intersticial (delimitat per les parets dels vasos sanguinis per un cantó i per les membranes de les cèl·lules tumorals per l'altre) dels tumors per arribar a les cèl·lules tumorals. Aquest espai presenta una pressió intersticial significativament incrementada en comparació amb un teixit normal, el que redueix el flux sanguini cap al centre del tumor i dificulta l'arribada de drogues (Baumgartner *et al.*, 1998). A més, unes concentracions més elevades de matriu extracel·lular en aquest espai també dificulta el transport de l'adenovirus (Jang *et al.*, 2003).

2.1.5.2. Dispersió intratumoral de l'adenovirus

La propagació de l'efecte oncolític dins del tumor com a conseqüència de la seva replicació és el gran avantatge de la viroteràpia. La dispersió intratumoral del virus és essencial perquè, a partir d'una dosi inicial baixa, s'amplifiqui l'efecte oncolític fins eliminar la totalitat de la massa tumoral (McCormick, 2005). La dificultat per obtenir regressions tumorals complertes, fins i tot en models de laboratori, ens indica que la distribució del virus per dins del tumor és deficient (Sauthoff *et al.*, 2003). Les característiques biològiques de l'estroma del tumor dificulten

la dispersió de l'adenovirus degut a la presència d'una matriu extracel·lular composta per col·lagen, elastina, àcid hialurònic i proteoglicans, a més de cèl·lules no tumorals, com fibroblasts, cèl·lules endotelials i cèl·lules del sistema immune. L'adaptació de l'adenovirus a la infecció i lisi de cèl·lules d'origen epitelial i la seva grandària dificulten la seva disseminació per tot el tumor.

2.1.5.3. Resposta immune contra l'adenovirus

El paper de la resposta immune en viroteràpia té dues visions diferents (Alemany and Cascallo, 2009). Per un costat, la visió immunocèntrica veu el sistema immune com un aliat per l'eradicació dels tumors. El tumor presenta un microambient immunosupressiu que dificulta les aproximacions immunoterapèutiques per al tractament del càncer (Leen *et al.*, 2007). Aquesta visió considera el virus com una senyal de dany que pot revertir aquesta immunosupressió i ajudar a la presentació d'antígens tumorals per que sigui el sistema immune el que acabi eradicant el tumor. A més, els virus es poden armar amb gens immunostimuladors que incrementin la resposta contra el tumor. Per altra banda, la visió virocèntrica veu el sistema immune con un obstacle a la viroteràpia. La resposta antiviral és tan potent i dominant que emmascara tota resposta contra el tumor. Segons aquesta visió, immunosuprimir al pacient abans i durant la teràpia permet una millor replicació dels virus, i la immunosupressió del tumor ofereix un lloc únic i privilegiat per a la replicació (Alemany and Cascallo, 2009). De fet, els resultats més prometedors en assajos clínics s'han obtingut amb pacients immunodeprimits. Les últimes aproximacions seguint aquesta visió incorporen gens immunosupressors en el genoma dels virus (Haralambieva *et al.*, 2007; Zamarin *et al.*, 2009), però cal anar amb compte, ja que un virus que evadeixi el sistema immune pot no resultar segur.

La resposta immune contra l'adenovirus és similar a la resposta observada amb altres virus del tracte respiratori (Kohlmeier *et al.*, 2008). La resposta innata comença amb el reconeixement mediat pels PRR's (*pattern recognition receptors*). Entre ells, els més coneguts són els receptors *Toll-like* (TLRs). En el cas concret de l'adenovirus, la resposta innata es desencadena a partir del reconeixement del genoma adenoviral mediat per receptor TLR9, capaç de reconèixer illes CpG no metilades. A més, altres mecanismes independents dels TLRs també activen la resposta innata (Zhu *et al.*, 2007). Aquest reconeixement activa la via de senyalització de NF- κ B i dels interferons per induir l'expressió de citocines i d'interferó de tipus I. La secreció de citocines proinflamatòries com TNF α , IL1 o IL6 indueixen l'expressió de quimiocines que recluten neutròfils i cèl·lules *Natural Killer* (NK) al focus de la infecció. Per altra banda, aquestes citocines també

indueixen la migració de les cèl·lules dendrítiques carregades d'antígens cap al nòdul limfàtic, i la seva maduració genera la resposta adaptativa. El reconeixement dels antígens per part dels limfòcits T CD4 *naive* i CD8 estimula la seva proliferació, i l'extravasació d'aquest limfòcits al focus eliminen la infecció (Alemany and Cascallo, 2009).

2.1.6. Estratègies per augmentar la potència oncolítica

Els resultats obtinguts en assajos clínics amb adenovirus oncolítics ens indiquen que és prioritari el disseny de nous virus que mostrin una eficàcia antitumoral millorada. Existeixen varies estratègies diferents destinades a compensar les mancances dels adenovirus oncolítics i algunes d'elles, com la inserció d'un transgen, doten al virus de noves eines molt útils per lluitar contra els impediments que imposa el tumor.

2.1.6.1. Millora del control d'E1A

La majoria de modificacions transcripcionals d'E1A tenen com a conseqüència una pèrdua de la quantitat d'E1A expressada en moltes cèl·lules tumorals. Malgrat que s'ha reportat que lleugeres pèrdues d'expressió d'E1A no tenen un efecte important en la potència dels virus (Hitt and Graham, 1990; Nettelbeck *et al.*, 2002), quan aquests virus són testats en un ampli ventall de línies tumorals la pèrdua de potència oncolítica es fa evident. El restabliment o fins i tot l'augment dels nivells d'E1A de l'adenovirus salvatge en totes les línies tumorals permetrà incrementar la quantitat de virus produït per cada cèl·lula tumoral. Una major quantitat de virus produït permet un augment del virus alliberat al medi extracel·lular, i aquest augment s'ha postulat en un model matemàtic com a un punt crític per a l'èxit de la viroteràpia (Wein *et al.*, 2003). En aquesta direcció, el nostre grup ja ha demostrat la recuperació de certs nivells de potència oncolítica mitjançant la seqüència Kozak (Cascallo *et al.*, 2007), tot i que aquesta modificació no és suficient per a un efecte viroterapèutic eficient.

2.1.6.2. Bioselecció de mutacions que augmenten la potència antitumoral

Una estratègia utilitzada per a desenvolupar virus més potents es basa en la selecció en condicions cuidadosament controlades al laboratori d'un estoc de virus que ha estat prèviament mutagenitzat. D'aquesta manera, es dóna avantatge selectiu a aquells mutants que compleixen un conjunt de condicions predefinides. Aquesta tècnica ha estat àmpliament utilitzada en estudis

clàssics de virologia (Williams *et al.*, 1971; Klessig, 1977) i, més recentment, per a la recerca de nous adenovirus oncolítics que augmenten la potència de l'adenovirus (Yan *et al.*, 2003; Subramanian *et al.*, 2006).

Recentment, el nostre grup ha descrit una nova mutació seleccionada mitjançant aquesta estratègia que augmenta la potència oncolítica (Gros *et al.*, 2008). Aquesta mutació consisteix en la pèrdua de la senyal de retenció al reticle endoplasmàtic de la proteïna E3-19K. La relocalització d'aquesta proteïna a la membrana plasmàtica desregula la homeòstasi intracel·lular de calci i permeabilitza la membrana, fent una funció semblant al d'una viroporina. Aquesta permeabilitat de la membrana permet un augment important de la quantitat de virus alliberada al medi a temps primerencs, el que es tradueix en un augment de la potència oncolítica. La recol·locació d'E3-19K a la membrana plasmàtica evita la retenció de MHC-I al reticle, i l'efecte d'aquesta mutació en l'entorn d'un adenovirus oncolític manca per ser avaluat.

2.1.6.3. Adenovirus oncolítics “armats”

L'expressió d'un transgen des del genoma d'un adenovirus oncolític és una aproximació molt interessant per augmentar la potència oncolítica, ja que aporta eines exògenes als virus amb funcions que no realitza cap gen viral. Els adenovirus oncolítics “armats” representen la combinació de la teràpia gènica i de la viroteràpia. Amb aquesta estratègia, la replicació del virus multiplica la quantitat de transgen administrat i, sobretot, l'expressió del transgen pot amplificar l'efecte antitumoral de la viroteràpia (Kim *et al.*, 2006).

Alhora d'inserir aquests transgens, s'ha de tenir en compte dues consideracions importants. En primer lloc, la replicació viral no es pot veure afectada per la inserció d'aquest transgen al genoma o per l'activitat de la proteïna codificada. En segon lloc, cal tenir en compte que els adenovirus tenen una capacitat d'incorporació d'ADN extern limitada. El genoma de l'adenovirus té unes 36 Kb i la seva capacitat per encapsidar el genoma és només del 105% (unes 38 Kb) (Bett *et al.*, 1993). Així, cal optimitzar molt bé l'espai disponible del genoma i eliminar totes les seqüències que no siguin imprescindibles, escollir molt bé el transgen a incorporar i triar una estratègia d'expressió que augmenti mínimament la grandària del genoma adenoviral.

Els transgens utilitzats en aquests virus busquen augmentar la citotoxicitat sobre la cèl·lula tumoral, modificar el microambient del tumor o estimular la resposta immune contra la cèl·lula tumoral (Cody and Douglas, 2009).

2.1.6.3.1. *Transgens que augmenten la citotoxicitat sobre la cèl·lula tumoral*

L'augment de la citotoxicitat s'utilitza per millorar la dispersió intratumoral del virus, permetre la propagació de l'efecte oncolític i eliminar el major número de cèl·lules tumorals possibles. Aquest efecte s'ha aconseguit a través de diferents mecanismes. Per un cantó, la introducció de proteïnes proapoptòtiques dins del genoma viral, com p53 o Smac (van Beusechem *et al.*, 2002; Pei *et al.*, 2004), millora la citotoxicitat a través de la sortida prematura del virus de la cèl·lula. Per altre cantó, la introducció de la proteïna adenoviral ADP com a un transgen facilita la sortida del virus de la cèl·lula infectada i permet una propagació més ràpida (Doronin *et al.*, 2003). A més, la introducció de gens suïcides com la citosina deaminasa (Ahn *et al.*, 2009) o la timidina quinasa (Wildner *et al.*, 1999) permet la conversió d'una prodroga (5-fluorocitosina o ganciclovir, respectivament) i provoca la mort de les cèl·lules infectades i de les cèl·lules pròximes a ella, produint l'anomenat efecte *bystander*, i augmentat la citotoxicitat dels adenovirus oncolítics. Per últim, també s'han utilitzat proteïnes fusogèniques d'altres virus, com la proteïna fusogènica del virus de la leucèmia del gibó (GALV) (Guedan *et al.*, 2008), per induir la formació de sincitis entre la cèl·lula infectada i les que l'envolten, i augmentar així la dispersió intratumoral dels adenovirus.

2.1.6.3.2. *Transgens que modifiquen el microambient del tumor*

L'alteració de la matriu extracel·lular o la inhibició de l'angiogènesi mitjançant l'expressió de transgens és una altra estratègia utilitzada per augmentar la potència antitumoral. L'expressió de TIMP3, per exemple, s'ha proposat per inhibir l'acció de les metal·loproteïnases que promouen el creixement tumoral i l'angiogènesi (Lamfers *et al.*, 2005). L'expressió de gens antiangiogènics com l'endostatina (Zhang *et al.*, 2004) també ha demostrat un benefici en activitat antitumoral. Per últim, l'expressió de proteïnes que degraden la matriu extracel·lular, com la relaxina (Kim *et al.*, 2006) o la hialuronidasa PH20 (Guedan *et al.*, 2010, acceptat a Molecular Therapy i annexat en aquest treball), disminueix la pressió intersticial del tumor i facilita la dispersió del virus, augmentant de manera molt important el potencial terapèutic dels adenovirus oncolítics.

2.1.6.3.3. Transgens que immunostimulen

Aquesta estratègia pretén complementar la immunostimulació que provoca el virus dins del tumor mitjançant l'expressió d'algun gen que recluti cèl·lules del sistema immune. L'expressió d'IFN- γ , d'IFN- α , de GM-CSF, de les interleucines IL-4, IL-12 i IL-24, i d'altres proteïnes com la hsp-70 ha demostrat ocasionalment una activació de la resposta immune contra el tumor (Sarkar *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2006; Ramesh *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2006; Post *et al.*, 2007; Shashkova *et al.*, 2007; Bortolanza *et al.*, 2009). S'ha observat, però, que l'estimulació de la resposta immune antitumoral requereix una important oncòlisi massiva (Liu *et al.*, 2006), i aquest requeriment pot quedar limitat degut a que la immunostimulació també facilita l'eliminació del virus.

2.1.6.4. Combinació amb drogues i altres teràpies

A més de la modificació genètica dels adenovirus oncolítics, la combinació amb les teràpies convencionals del càncer beneficia l'activitat antitumoral dels agents viroterapèutics. La mort de les cèl·lules tumorals per l'efecte de les drogues amplia l'espai intersticial lliure i permet una millor difusió de l'adenovirus dins del tumor (Jang *et al.*, 2003). Els adenovirus oncolítics han mostrat sinergisme amb cisplatí, 5-fluorouracil, doxorubicina i paclitaxel (Khuri *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2001; Cheong *et al.*, 2008), i també amb radioteràpia (Dilley *et al.*, 2005). També s'ha demostrat que la combinació amb drogues que indueixen l'autofàgia, com el RAD001 o la rapamicina, també augmenten la potència oncolítica (Alonso *et al.*, 2008; Yokoyama *et al.*, 2008), així com també alguns bloquejants dels canals de calci com el verapamil (Gros *et al.*, 2010). A més, l'ús de drogues que bloquegen l'activitat de les cèl·lules de Kupffer augmenta l'arribada de virus al tumor (Shashkova *et al.*, 2008), i la combinació amb drogues immunosupressores, com la ciclofosfamida, inhibeix la resposta antiviral i augmenta l'efecte antitumoral de la viroteràpia (Thomas *et al.*, 2008).

OBJECTIUS

Entre les noves teràpies per al tractament del càncer, els adenovirus de replicació selectiva representen una alternativa molt prometedora i atractiva gràcies a la seva capacitat d'amplificar-se selectivament al tumor. Alguns d'aquests agents ja han estat testats a la clínica, incloent una gran varietat de tipus tumorals i de rutes d'administració. Els resultats clínics obtinguts mostren un bon perfil de toxicitat i seguretat, encara que amb algun cas preocupant de toxicitat després de l'administració d'elevades dosis. Després de la injecció d'aquests virus, la majoria de respostes observades van resultar transitòries, i el tractament no va ser capaç d'alterar significativament el curs de la malaltia. La incapacitat d'aquests agents per distribuir-se eficientment per tota la massa tumoral, juntament amb la disminució de la potència provocada per mutacions que atorguen selectivitat, són alguns dels obstacles que cal superar per aconseguir respostes significatives i duradores en humans.

L'objectiu general d'aquesta tesi és:

Desenvolupar un adenovirus oncolític que presenti un baix perfil de toxicitat, que provoqui un gran efecte terapèutic en un ampli rang de tipus tumorals després de ser administrat sistèmicament i que, a la vegada, sigui capaç d'acomodar eficientment dins del seu genoma un transgen que l'ajudi a distribuir-se millor per la massa tumoral.

Per aconseguir aquest objectiu general, es van plantejar aquests objectius específics:

- Modificar el control transcripcional d'E1A mitjançant llocs palindròmics d'unió del factor de transcripció E2F per redirigir la replicació del virus en resposta a l'estat de la via de RB, i avaluar, tant *in vitro* com *in vivo*, els beneficis en potència oncolítica i en selectivitat que atorguen aquestes caixes d'unió.
- Avaluar la capacitat dels virus resultants d'aquestes modificacions per incorporar un transgen dins del seu genoma sense afectació de la potència oncolítica.
- Estudiar els beneficis que poden aportar, en el context d'un adenovirus oncolític, dos modificacions descrites amb anterioritat al nostre grup, la mutació T1 i la fibra RGDK, tant en termes de selectivitat com d'activitat antitumoral.

MATERIALS I MÈTODES

1. TÈCNIQUES DE MANIPULACIÓ DE BACTÈRIES

Per a l'obtenció de grans quantitats d'ADN plasmídic, es requereix l'amplificació en bactèries. Per que l'amplificació sigui possible, el plasmidi d'interès ha de contenir un origen de replicació que permeti la replicació en la sòca bacteriana d'interès. A més, per evitar contaminacions, és molt recomanable que incorporin també un gen de resistència a un antibiòtic (ampicil·lina o kanamicina). En aquest treball s'han emprat les soques bacterianes d'*Escherichia coli* BJ5183, DH5 α i HB101. Per poder amplificar els diferents plasmidis d'interès, a les bactèries pertinents se'ls va induir l'estat de competència per poder transformar-les posteriorment.

1.1. PREPARACIÓ DE BACTÈRIES COMPETENTS

L'estoc mare de bactèries es troba conservat a -80°C en forma de glicerinat. Per a la inducció de l'estat de competència, es rasca el glicerinat mare amb una punta de pipeta estèril 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 tub Falcon de 50 ml 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 de 0,6-0,7 a 600 nm de longitud d'ona. En aquest moment, la solució bacteriana es redistribueix en ampolles de 250 ml (aptas per al seu ús a la centrifuga SORVALL) i es submergeixen en un bany d'aigua i gel durant 40 min per aturar el creixement bacterià. A partir d'aquest moment, la manipulació dels bacteris es realitza sempre a 4°C . A continuació, les bactèries es centrifuguen a 4000 g durant 15 min a 4°C en una centrifuga SORVALL. El sobrenedant es descarta i el pèl·let 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 pèl·let final bacterià es resuspèn en 3 ml d'aigua amb un 10% de glicerol. A continuació, es mira la DO d'una dilució 1/100 de la suspensió final bacteriana a 600 nm. La DO de la dilució 1/100 ha de ser propera a 1 (OD=1 equival aproximadament a 2.5×10^8 bactèries/ml). Finalment, la suspensió bacteriana es distribueix en alíquotes de 50 μl , congelades immediatament en neu carbònica, i s'emmagatzemen al congelador de -80°C fins al moment del seu ús.

1.2. TRANSFORMACIÓ DE BACTÈRIES COMPETENTS

En aquest treball s'han utilitzat dos mètodes per transformar les bactèries 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). Per a la transformació de la resta de soques bacterianes preparades al laboratori, s'ha emprat el mètode de la transformació per electroporació.

1.2.1. Transformació per xoc tèrmic

Per dur a terme la transformació, una alíquota de les cèl·lules comercials HB101 (100 µl) es descongela en gel i s'hi afegien 2 µl d'una dilució en aigua 1/5 o 1/20 de la lligació. 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 les bactèries comercials), i s'incubaven durant 1 h en agitació a 37°C. Finalment, la suspensió es plaquejava en plaques de LB amb l'antibiòtic de selecció adequat per a cada plasmidi.

1.2.2. Transformació per electroporació

Per dur a terme la transformació per electroporació, les alíquotes de cèl·lules competents (50 µl) es descongelen en gel i s'hi afegia de 10 pg a 25 ng d'ADN 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 ManipulatorTM 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 en plaques de LB amb l'antibiòtic de selecció adequat per a cada plasmidi.

1.3. OBTENCIÓ D'ADN PLASMÍDIC A PARTIR DE CULTIUS DE BACTÈRIES

Els protocols emprats en aquest treball per l'aïllament d'ADN plasmídic d'*E.coli* es basen en un mètode de lisis alcalina amb SDS, i es van realitzar a partir de cultius saturats crescuts en LB amb antibiòtic. S'han realitzat preparacions d'ADN a petita i a gran escala.

1.3.1. Obtenció d'ADN plasmídic a petita escala

Les minipreparacions d'ADN plasmídic es van realitzar seguint una adaptació del protocol descrit per Birnboim i Doly (Birnboim and Doly, 1979). Aquest procediment permet obtenir petites quantitats d'ADN plasmídic (de 20-50 µg). El procediment a seguir es detalla a continuació.

Primerament, s'inocula en 2 ml de LB-antibiòtic una colònia crescuda en una placa de LB amb antibiòtic, i es creix durant tota la nit. El dia següent, es pren una alíquota de 1,5 ml del cultiu bacterià saturat i es centrifuga a 15000 g durant 1 min. El pèl·let bacterià es resuspèn amb l'ajuda d'un vòrtex en 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 s'inverteix fins que el precipitat blanc que apareix sigui homogeni. La barreja s'incuba 5 minuts en gel i es centrifuga a 15000 g durant 15 min. A continuació, es recull el sobrenedant transparent, sense agafar el pèl·let blanc on es troba l'ADN cel·lular, les proteïnes i el SDS. El sobrenedant es barreja amb 2 volums d'etanol, i la mescla es deixa reposar 15 min a temperatura ambient. A continuació, l'ADN plasmídic es precipita per centrifugació durant 10 minuts a 15000 g. El sobrenedant es descarta, i el pèl·let es renta amb etanol al 70%. La barreja es centrifuga 5 min més a 15000 g, es descarta el sobrenedant i el pèl·let d'ADN es deixa assecar durant 10 minuts. Finalment, l'ADN plasmídic es resuspèn amb 50 µl de TE amb RNAsa (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 0,1 mg/ml RNAsa).

1.3.2. Obtenció d'ADN plasmídic a gran escala

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

2. TÈCNIQUES DE MANIPULACIÓ DE LLEVATS

En aquest treball, la majoria de recombinacions homòlogues s'ha realitzat en llevats degut a l'elevada eficiència de recombinació que presenten aquests organismes. Per tal de poder amplificar els plasmidis en llevats, caldrà introduir-hi els elements necessaris per a 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 a la construcció d'adenovirus recombinants (Sikorski and Hieter, 1989). La seqüència CAU consta d'un centròmer, un origen de replicació de 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 a 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 molècules (ura3-53, lys2-801, ade2-101, his3- Δ 200, trp1- Δ 63, leu2- Δ 1cyh2R). 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 amb medis que continguin tots aquests aminoàcids, a excepció d'uracil.

Per poder realitzar les recombinacions homòlogues, els dos ADNs d'interès es van transformar linealitzats a llevats als que prèviament se'ls havia induït l'estat de competència.

L'homologia necessària perquè es doni la recombinació homòloga en llevats entre un plasmidi linealitzat i un 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. Per obtenir una placa de llevats frescos, es rasca el glicerinat amb una punta de pipeta i es dibuixa una estria en una placa d'agar amb medi ric pel creixement de llevats (YPDA⁺⁺). Es deixen créixer els llevats a 30°C durant tres dies i la placa amb el creixement de llevats es guarda a 4°C durant un màxim de dues setmanes.

A l'hora de fer els llevats competents, es pica una colònia de la placa de YPDA⁺⁺ i es creix durant tota la nit en 5 ml de YPDA⁺⁺ líquid a 30°C , en agitació a 200 rpm. Al dia següent, es mesura la DO d'una dilució 1/10 del cultiu ($\text{DO}_{600}=1$ equival a 1.5×10^7 llevats/ml) i es prepara una suspensió de llevats que tingi una $\text{DO}=0.15$ en un volum de 50 ml ($\text{DO}_{600}=0,15$ equival a 2.25×10^6 llevats/ml). La suspensió es deixa créixer a 30°C i 200 rpm fins obtenir una $\text{DO}_{600}=0.4$ to 0.9 (aproximadament 5 h). A continuació, la suspensió de llevats es traspassa a un tub Falcon de 50 ml i es centrifuga a $3000 g$ durant 5 min en una centrifuga Hermle Z383k a temperatura ambient. El sobrenedant es descarta i el pèl·let es renta amb 25 ml d'aigua miliQ autoclavada. El rentat es torna a centrifugar a $3000 g$ durant 5 min i el sobrenedant es torna a descartar. El pèl·let es resuspèn en 1 ml d'aigua i la suspensió es traspassa a un tub eppendorf de 1,5 ml per centrifugar-lo 30 segons a $6500 g$ en una microcentrífuga. El sobrenedant es torna a descartar i el pèl·let es resuspèn amb aigua en un volum final de 1 ml. A partir d'aquesta suspensió, es fan alíquotes de $100 \mu\text{l}$ (10^8 cèl·lules) i es centrifugen durant 30 segons a $6500 g$ en una microcentrífuga. El sobrenedant es descarta i el pèl·let de llevats ja està disponible per ser transformat amb ADN. Els llevats competents s'han d'utilitzar frescos en cada transformació.

2.2. TRANSFORMACIÓ DE LLEVATS PEL MÈTODE LiAc/SS-CARRIER ADN/PEG PER REALITZAR RECOMBINACIONS HOMÒLOGUES

Per tal de transformar els llevats competents, s'ha utilitzat el mètode del LiAc/SS-carrier ADN/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 desestabilitzar les membranes del llevat. A més, també s'utilitza

un ADN de cadena simple (SS-carrier ADN) per bloquejar possibles zones repetides on es podria unir de forma inespecífica l'ADN a transformar i s'introdueix l'ADN mitjançant un xoc tèrmic.

Primer de tot, es bull l'ADN de cadena simple (ADN d'esperma de salmó), durant 5 min a 95°C. A continuació, per a cada transformació, es prepara una barreja que contingui: 240 µl de PEG al 50% en pes/volum, 36 µl d'acetat de liti 1M, 10 µl d'ADN d'esperma de salmó a 10mg/ml i 74 µl d'una dilució en aigua milliQ dels ADNs d'interès per a la recombinació homòloga. La quantitat d'ADN a afegir per a una recombinació homòloga és d'uns 100 ng de l'insert que volem introduir i uns 10 cops menys quantitat en mols del vector al qual hi introduïm l'insert. La barreja s'afegeix al pèl·let de l'alíquota de llevats abans preparats, es barreja amb l'ajuda del vòrtex i s'incuba durant 40 min a 42°C. Passat aquest temps, la barreja es centrifuga 30 s a 6500 g i s'elimina el sobrenedant. El pèl·let de llevats es resuspèn en 100 µl d'aigua i es plaqueja en una placa d'agar amb medi SC Ura-. Les plaques s'incuben a 30°C durant dos dies fins que apareixen a la placa unes colònies petites i blanques que corresponen als plasmidis recombinants.

2.3. OBTENCIÓ DE L'ADN PLASMÍDIC

L'aïllament de l'ADN 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-. Es traspasa 1,5 ml del cultiu a un tub eppendorf de 1,5 ml i es centrifuga durant 5 segons a màxima velocitat. El sobrenedant es descarta i el pèl·let de llevats es resuspèn en 400 µl d'una solució que conté: 2% Tritó-X100, 1% SDS, 0,1 M NaCl, 10mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA. A continuació, s'hi afegeixen 400 µl de fenol-cloroform i 0,3 g 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 15000 g. El sobrenedant es traspasa a un tub eppendorf nou i l'ADN plasmídic es precipita amb 2 volums d'acetat sòdic al 2% en etanol durant 30 min a -20°C. Passat aquest temps, l'ADN plasmídic es centrifuga durant 20 min a 16500 g a temperatura ambient; el sobrenedant es descarta i el pèl·let es renta amb etanol al 70%. Finalment, el pèl·let d'ADN es resuspèn en 40 µl d'aigua.

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

3. CULTIUS CEL·LULARS

3.1. MODELS CEL·LULARS I SECCIONS DE TEIXIT PRIMARI

En aquest treball s'han emprat línies cel·lulars normals i tumorals per a l'avaluació de les característiques dels adenovirus recombinants. A més, la línia cel·lular HEK293 s'ha utilitzat per a la generació d'adenovirus. També s'han establert cultius primaris d'hepatòcits a partir d'una biòpsia per a testar la selectivitat dels adenovirus. Per altra banda, un model de seccions molt fines de teixit a partir de biòpsies humanes de fetge i metàstasis s'ha utilitzat com a una aproximació més representativa de les condicions fisiològiques.

3.1.1. Cèl·lules HEK293

Les cèl·lules 293 (HEK293) deriven de cèl·lules primàries de ronyó embrionari humà i han estat transformades amb l'11% de l'extrem esquerra del genoma de l'adenovirus, incloent el gen E1A (Graham *et al.*, 1977). Les cèl·lules 293 són altament permissives a la infecció i al creixement dels adenovirus, i són fàcilment transfectables pel mètode del fosfat càlcic. Són cèl·lules empaquetadores i s'empren per a la generació i la titulació d'adenovirus oncolítics.

3.1.2. Cèl·lules tumorals

Tant per a la realització d'experiments *in vitro* com *in vivo*, s'han utilitzat diverses línies tumorals, que queden resumides en la següent taula:

Taula 2. Línies tumorals utilitzades en aquest treball.

Línia cel·lular	Origen
A549	Carcinoma de pulmó humà
NP9	Adenocarcinoma pancreàtic humà
NP18	Adenocarcinoma pancreàtic humà
PC3	Carcinoma de pròstata humà
Sk-mel28	Melanoma humà
1.36.1.5	Melanoma humà
Isrec-01	Adenocarcinoma de còlon humà
HCT-116	Adenocarcinoma de còlon humà
SCC-25	Càncer de cap i coll humà
C33A	Càncer de cèrvix humà
Saos-2	Osteosarcoma humà
HP-1	Carcinoma pancreàtic de hámster
Amel-3	Melanoma de hámster

Entre elles, destaca la línia de carcinoma de pulmó A549, que ha estat emprada per a l'amplificació dels adenovirus recombinants degut a la seva eficiència en la producció de virus. Les línies cel·lulars NP9 i NP18 han estat establertes al 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). La línia cel·lular 1.36.1.5 ha estat cedida pel doctor F.X. Real, de l'Institut Municipal d'Investigació Mèdica de Barcelona. La línia cel·lular Isrec-01 ha estat cedida pel doctor R. Iggo, de la University of St. Andrews de St. Andrews (Escòcia, Regne Unit). Les línies cel·lulars de hámster HP-1 i Amel-3 han estat cedides pel doctor R. Hernández-Alcoceba, del CIMA de Pamplona. La resta de les línies tumorals han estat obtingudes de la ATCC (*American Type Cell Culture*). Totes les línies tumorals 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, a excepció de Isrec-01, 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. Isrec-01 es manté

amb DMEM suplementat amb un 10% de sèrum fetal boví. Als medis de cultiu s'hi 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.

3.1.3. Cèl·lules normals

3.1.3.1. Cèl·lules HUVEC

Les cèl·lules HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) són cèl·lules endotelials normals extretes de vena de cordó umbilical i es van obtenir de Cambrex BioScience Baltimore Inc. (Baltimore, MD, Estats Units). Per al seu creixement en monocapa cel·lular es necessari un recobriment de col·lagen de la superfície d'adhesió. El manteniment es realitza en medi específic per a cèl·lules endotelials suplementat amb un 10% de FBS. Per al seu ús com a cèl·lula normal, es necessari arrestar-les 24 hores abans de realitzar l'experiment mitjançant la deprivació del FBS. Es mantenen, al igual que les cèl·lules tumorals, en un incubador humidificat a 37°C en una atmosfera al 5% en CO₂.

3.1.3.2. Establiment de cultius primaris d'hepatòcits

Les biòpsies de fetge normal (càpsules de Glisson) es van obtenir del Servei de Cirurgia de l'Hospital Universitari de Bellvitge (L'Hospitalet de Llobregat) amb l'aprovació del comitè mèdic. El protocol d'obtenció dels cultius primaris es va establir a partir d'una col·laboració amb l'Hospital de La Fe (Valencia). El sistema es basa en la recirculació mitjançant una bomba peristàltica d'una solució de colagenasa a través dels vasos circulatoris de la càpsula de Glisson mitjançant un circuit de fluids recirculats. Posteriorment, el teixit s'acaba disseccionant mecànicament.

Després de muntar el sistema de recirculació de fluids immers en un bany a 38°C, es fa circular a través de la càpsula de Glisson una solució de 300 ml de tampó HBSS (0,4 g/l KCl, 0,06 g/l fosfat de monopotassi, 8 g/l NaCl, 0,35 g/l bicarbonat sòdic, 0,06 g/l fosfat disòdic dihidratat, 1 g/l D-glucosa) suplementat amb 0,5 mM EGTA i 1 mM de L-NAME. Un cop han circulat els 300 ml de la solució de rentat, es canvia el circuit per a fer recircular durant 1 hora per la biòpsia 100 ml de la solució de digestió (100 ml HBSS, 10 mM HEPES, 5 mM de clorur càlcic, 73 mg colagenasa

A (Roche)). A continuació, s'esmicola la biòpsia utilitzant unes pinces en una placa de cultiu estèril. Es filtra utilitzant una malla de niló i es renta amb 100 ml de la solució de rentat sense L-NAME, prèviament refrigerada en gel. Es centrifuga 5 minuts a 50 g i es renta amb 20 ml de medi Williams E comercial abocant-lo poc a poc, de tal manera que només aixequem les cèl·lules epitelials, no les cèl·lules sanguínies, que es mantindran al fons del tub. La suspensió de cèl·lules es transvasa a un tub net i es fa un recompte de cèl·lules i de viabilitat per resuspendre-les a una concentració de 100000 cèl/ml amb medi complert 2%FBS (50% medi Williams E, 50% medi Ham's F12, 0,1 µM insulina, 25 µM transferrina, 0,1 µM seleniat de sodi, 65,5 µM etanolamina, 2 mM L-glutamina, 1% solució penicil·lina/estreptomocina, 5% FBS). Es plaquegen les cèl·lules en plaques pre-tractades amb col·lagen i 24 hores després es canvia el medi per medi complert suplementat amb 0,1 µM dexametasona. Per realitzar experiments, es necessari arrestar els hepatòcits 24 hores abans de realitzar l'experiment mitjançant la substitució del FBS del medi complert per 0,1% de BSA. Es mantenen en un incubador humidificat a 37°C en una atmosfera al 5% en CO₂.

3.1.4. Model de seccions de teixit primari

Les biòpsies de fetge normal i metàstasis es van obtenir del Servei de Cirurgia de l'Hospital Universitari de Bellvitge (L'Hospitalet de Llobregat) amb l'aprovació del comitè mèdic. Per realitzar els talls dels teixits (*slices*), es va utilitzar un *Krumdieck Tissue Slicer* model MD4000 (**Figura 10**) d'Alabama R&D (Munfor, AL, Estats Units) tal i com està descrit en la literatura (Olinga *et al.*, 2001; Kirby *et al.*, 2004).

Primerament, es realitza un tall cilíndric de 8 mil·límetres de diàmetre de la biòpsia utilitzant una ganiveta cilíndrica. S'introdueix la peça en la màquina prèviament omplerta amb medi Williams E i es realitzen els talls a un grossor de 250 µm. Es recullen les seccions de teixit i es distribueixen en plaques de cultiu de 24 pous amb 1 ml de medi Williams E suplementat amb 0,1 µM insulina, 25 mM glucosa, 50 µg/ml gentamicina, 1% L-glutamina, 1% solució penicil·lina/estreptomocina, 5% FBS. Es fan 3 rentats amb medi fresc cada 30 minuts. Es mantenen en un incubador humidificat a 37°C en una atmosfera al 5% en CO₂.



Figura 10. El Krumdieck Tissue Slicer MD-4000

3.2. RECOMPTE 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 a l'interior de la cèl·lula únicament quan la membrana cel·lular està deteriorada. Es compten les cèl·lules viables presents a cadascun dels 4 o 8 quadrants de la cambra de Newbauer i es fa una mitja. El càlcul de cèl·lules per ml es realitza segons la següent formula:

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

Aquest mètode 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 a la concentració desitjada.

3.3. CONGELACIÓ I DESCONGELACIÓ DE LES LÍNIES CEL·LULARS

Per a la congelació, 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% de FBS inactivat i un 10% de l'agent crioprotector DMSO (Dimetil-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 4 hores, 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 1000 g . El medi de congelació es canvia per aspiració i les cèl·lules es resuspenen amb el medi de cultiu que 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 eliminar les cèl·lules mortes.

3.4. CONTROL DE MICOPLASMA

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 3**).

Taula 3. Seqüència dels encebadors utilitzats per a la detecció de micoplasma.

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

Per a la realització de la PCR, es parteix del medi de les cèl·lules que han 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 dona 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.

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 a la **Taula 4**.

En aquest apartat dels materials i mètodes, es descriuen les tècniques més rellevants emprades per a la construcció dels diferents adenovirus recombinants i per a la obtenció i caracterització dels estocs de virus purificats.

4.1. CONSTRUCCIÓ DELS ADENOVIRUS RECOMBINANTS

Les tècniques emprades per a la generació dels diferents vectors adenovirals són, principalment, tall i lligació i recombinació homòloga. La recombinació homòloga l'hem dut a terme en dos organismes diferents: la soca *recA* positiva d'*E.Coli* BJ5183 i la soca de llevats YPH857. Un cop tenim les modificacions desitjades en el genoma adenoviral, el pas final consisteix en alliberar l'ADN de suport, que permet la manipulació en bacteries i llevats mitjançant una digestió amb l'enzim de restricció *PacI*. El genoma viral alliberat es transfecta a les cèl·lules HEK293 per a la generació dels adenovirus.

A continuació, es descriuen els passos seguits per a la construcció de cadascun dels vectors que han estat generats en el marc d'aquest treball (**Figura 11**).

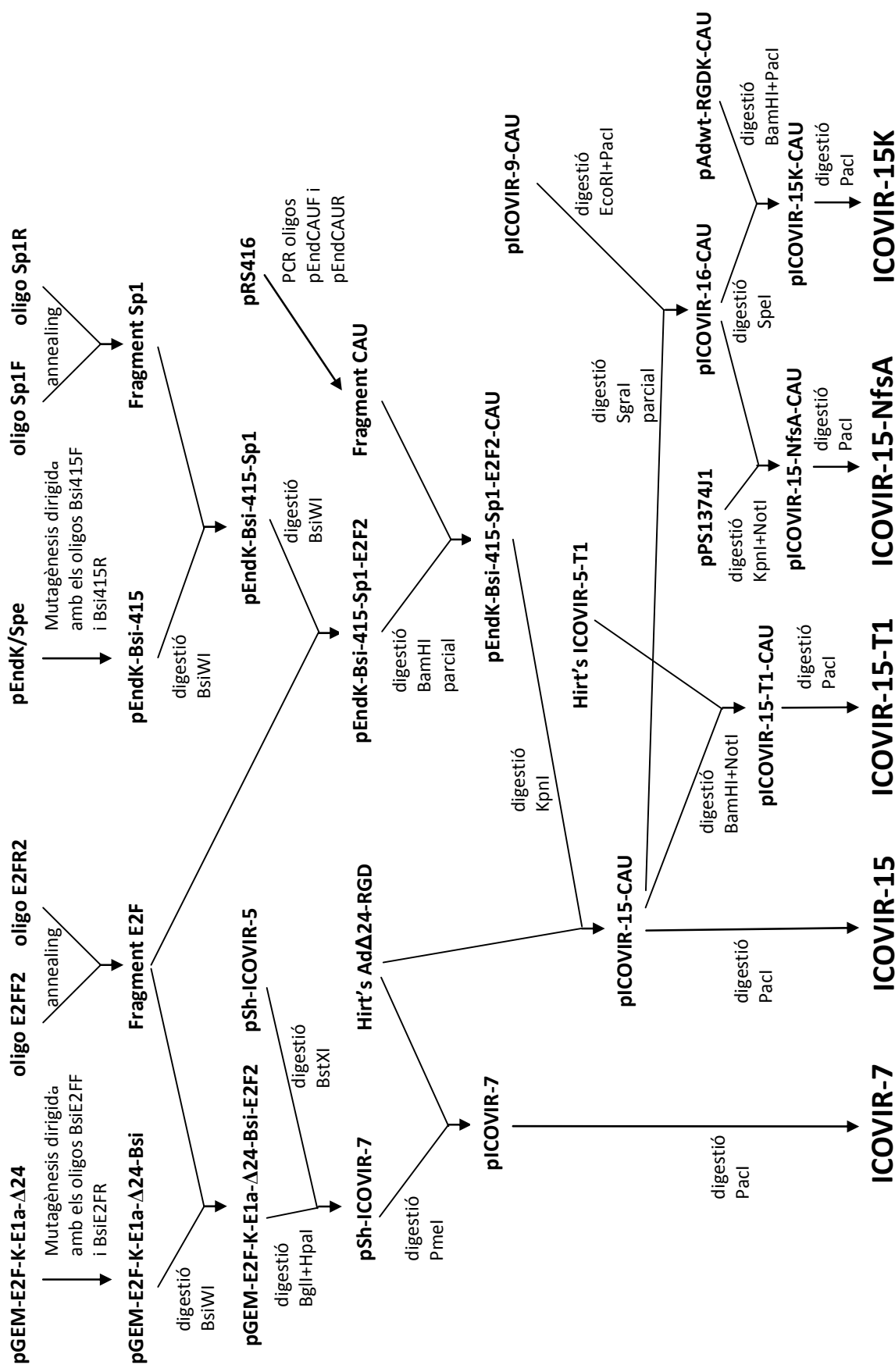


Figura 11. Esquema simplificat de les estratègies de clonatge emprades per a la construcció dels adenovirus recombinants generats en el marc d'aquesta tesi

Taula 4. Descripció dels adenovirus recombinants emprats en aquest treball

Nom	Aïllant	Promotor E1A	E1A	E3	Fibra	Transgen	Origen
AdTL-RGD	-	CMV	GFP/ Luciferasa	wt	RGD en HI-loop	-	(Dmitriev <i>et al.</i> , 1998)
Adwt-RGD	-	wt	wt	wt	RGD en HI-loop	-	(Bauerschmitz <i>et al.</i> , 2002)
ICOVIR-5	DM-1	E2F-1	Kozak/ Δ 24	wt	RGD en HI-loop	-	(Cascallo <i>et al.</i> , 2007)
ICOVIR-7	DM-1	E2F-1 modificat	Kozak/ Δ 24	wt	RGD en HI-loop	-	En aquest treball
ICOVIR-15	-	wt modificat	Δ 24	wt	RGD en HI-loop	-	En aquest treball
ICOVIR-15-NfsA	-	wt modificat	Δ 24	wt	RGD en HI-loop	3VDE- NfsA-pA	En aquest treball
ICOVIR-15-T1	-	wt modificat	Δ 24	Mutació T1 a E3-19K	RGD en HI-loop	-	En aquest treball
ICOVIR-15K	-	wt modificat	Δ 24	wt	RGD en Shaft	-	En aquest treball

4.1.1. Construcció de l'adenovirus ICOVIR-7

Per a la modificació del promotor E2F-1, es va partir del plasmidi pGEM-E2F-K-E1A- Δ 24. Aquest plasmidi conté el promotor E2F-1 clonat davant de la proteïna kozak-E1A- Δ 24 (Cascallo *et al.*, 2007). Mitjançant els oligonucleòtids BsiE2FF i BsiE2FR (Taula 5), es va realitzar una mutagènesi dirigida per PCR per introduir un lloc únic de restricció per l'enzim BsiWI dintre del promotor E2F-1, abans de la capsa CAAT d'inici de la transcripció, creant el plasmidi pGEM-E2F-K-E1A- Δ 24-Bsi. A partir dels oligonucleòtids E2FF2 i E2FR2 (Taula 5) hibridats entre si, es va crear un fragment d'ADN que conté quatre seqüències d'unió per al factor de transcripció E2F organitzades en dos palíndroms, simulant l'estructura existent en el promotor E2F-1. A més a més, aquest fragment incorpora dianes per l'enzim de restricció BsiWI a cada un dels seus extrems. Després de la restricció amb BsiWI d'aquest fragment d'ADN i del plasmidi pGEM-E2F-K-E1A- Δ 24-Bsi, es va realitzar una lligació amb la ligasa T4 i es va seleccionar per restricció el plasmidi pGEM-E2F-K-E1A- Δ 24-Bsi-E2F2, que incorpora dues còpies del fragment E2F al promotor E2F-1.

Un cop seleccionat aquest plasmidi i mitjançant la restricció amb els enzims BglI i HpaI, es va alliberar la construcció *promotor E2F modificat-kozak-E1A-Δ24* i es va lligar al plasmidi pSh-ICOVIR-5 (Cascallo *et al.*, 2007) prèviament digerit amb BglI i HpaI. El plasmidi resultant, pSh-ICOVIR-7, conté zones d'homologia a ambdós extrems del genoma de l'adenovirus tipus 5, el que ens permet generar el genoma complet d'ICOVIR-7 mitjançant una recombinació homòloga. La recombinació homòloga es va realitzar en la soca *recA* positiva d'*E.Coli* BJ5183 després de la transformació del pSh-ICOVIR-7 digerit amb PmeI i del genoma de l'adenovirus Ad-Δ24-RGD (Suzuki *et al.*, 2001), que ens permet assegurar la presència de la deleció Δ24 i del motiu RGD al genoma final. Finalment, el plasmidi final pICOVIR-7 va ser digerit amb l'enzim de restricció PacI per tal d'alliberar el genoma viral; el genoma de l'ICOVIR-7 va ser transfectat a cèl·lules HEK293 per tal de generar el virus.

4.1.2. Construcció de l'adenovirus ICOVIR-15

Per a la modificació del promotor endogen d'E1A, es va partir del plasmidi pEndK/Spe. Aquest plasmidi conté ambdós extrems del genoma de l'adenovirus salvatge tipus 5 (Carette *et al.*, 2004). Mitjançant els oligonucleòtids Bsi415F i Bsi415R (**Taula 5**), es va realitzar una mutagènesi dirigida per PCR per introduir un lloc únic de restricció per l'enzim BsiWI en la posició 415 del genoma adenoviral, abans de la caps CAAT i TATA d'inici de la transcripció, creant el plasmidi pEndK-Bsi-415. A partir dels oligonucleòtids Sp1F i Sp1R (**Taula 5**) hibridats entre sí, es va crear un fragment d'ADN que conté una seqüència d'unió del factor de transcripció Sp1. A més a més, aquest fragment incorpora dianes per l'enzim de restricció BsiWI a cada un dels seus extrems. Després de la restricció amb BsiWI d'aquest fragment d'ADN i del plasmidi pEndK-Bsi-415, es va realitzar una lligació amb la ligasa T4 i es va seleccionar per restricció el plasmidi pEndK-Bsi-415-Sp1, que incorpora una còpia del fragment Sp1 a la posició 415 de l'adenovirus. Per lligació i a partir del mateix fragment d'ADN E2F digerit amb BsiWI utilitzat per a la construcció de l'adenovirus ICOVIR-7, es va construir el plasmidi pEndK-Bsi-415-Sp1-E2F2, que incorpora vuit seqüències d'unió per al factor de transcripció E2F organitzades en quatre palíndroms asimètrics, a més de la seqüència d'unió per a Sp1. Aquest plasmidi conté seqüències homòlogues a ambdós extrems de l'adenovirus tipus 5, el que ens permet generar el genoma final per recombinació homòloga.

Per poder realitzar la recombinació homòloga en llevats, un sistema molt més eficient que la recombinació homòloga en bacteris, es necessària la inserció de la seqüència CAU al plasmidi.

Aquesta seqüència es va amplificar per PCR mitjançant els oligonucleòtids pEndCAUF i pEndCAUR (**Taula 5**), que incorporen 40 pb d'homologia a cada extrem per poder inserir el fragment per recombinació homòloga en la soca de llevat YPH857 i poder seleccionar els clons en una placa on hi manca uracil. Un cop obtingut el plasmidi pEndK-Bsi-415-Sp1-E2F2-CAU, es va obtenir el plasmidi final pICOVIR-15-CAU per recombinació homòloga en llevats del plasmidi anterior digerit amb KpnI amb el genoma de l'adenovirus Ad-Δ24-RGD. Finalment, aquest plasmidi va ser digerit amb l'enzim de restricció PacI per tal d'alliberar el genoma viral i aquest va ser transfectat a cèl·lules HEK293 per tal de generar el virus.

4.1.3. Construcció de l'adenovirus ICOVIR-15-NfsA

El casset FibraRGD-3VDE-NfsA-pA ja es trobava construït amb anterioritat al plasmidi pPS1374J1, cedit pel Dr. Peter Searle. Aquest casset es va alliberar del plasmidi gràcies a una digestió amb els enzims de restricció KpnI i NotI i es va realitzar una recombinació homòloga en llevats entre aquest fragment i la digestió SpeI del plasmidi pICOVIR-16-CAU. El pICOVIR-16-CAU és un derivat de l'ICOVIR-15 que incorpora la proteïna GALV darrera de la fibra (tesi doctoral Sònia Guedan). La proteïna GALV incorpora un lloc de tall per l'enzim de restricció SpeI que permet alliberar una porció del genoma adenoviral que inclou la fibra i la proteïna GALV. El producte d'aquesta recombinació homòloga és el plasmidi pICOVIR-15-NfsA. Aquest plasmidi es va digerir amb PacI per alliberar-ne el genoma viral; el genoma de l'ICOVIR-15-NfsA-CAU es va transfectar a cèl·lules HEK293 per tal de generar el virus.

4.1.4. Construcció de l'adenovirus ICOVIR-15-T1

El genoma del vector ICOVIR-15-T1 va ser generat per recombinació homòloga en llevats entre el plasmidi pICOVIR-15-CAU digerit amb BamHI i NotI i el genoma de l'adenovirus ICOVIR-5-T1, una versió prèvia d'adenovirus de replicació condicionada que incorporava la mutació T1 (tesi doctoral Alena Gros). El plasmidi resultant, pICOVIR-15-T1-CAU, va ser digerit amb PacI per alliberar-ne el genoma viral; el genoma de l'ICOVIR-15-T1 es va transfectar a cèl·lules HEK293 per tal de generar el virus.

4.1.4. Construcció de l'adenovirus ICOVIR-15K

Per a la incorporació de la fibra amb el motiu RGDK, també es va emprar el plasmidi pICOVIR-16-CAU (tesi doctoral Sònia Guedan). Per recombinació homòloga en llevats entre el pICOVIR-16-CAU digerit amb SpeI i un fragment que conté la fibra RGDK extret de la digestió BamHI i PacI del plasmidi pAdwt-RGDK-CAU, generat a la vegada a partir del pAdTL-RGDK (Bayo-Puxan *et al.*, 2009), es va generar el plasmidi pICOVIR-15K-CAU. Aquest plasmidi va ser digerit amb PacI per alliberar-ne el genoma viral; el genoma de l'ICOVIR-15K es va transfectar a cèl·lules HEK293 per tal de generar el virus.

Taula 5. Oligonucleòtids utilitzats per als clonatsges d'ICOVIR-7, ICOVIR-15 i ICOVIR-15-NfsA

Nom	nt	Seqüència (5'→3')
BsiE2FF	34	CATTGGCCGTACGCCCGCCCGCCGCCGCCCA
BsiE2FR	32	CGCGGGGCGGGCGTACGGCCAATGGCGGGGCGG
E2FF2	63	GTACGTGGCGGCTCGTGGCTCTTTCGCGGCAAAAAGGATTTGGCGCGTAAAA GTGGTTTCGAA
E2FR2	63	GTA CTT CGA ACC ACT TTT AC GCG CCA AAT CCT TTT T GCC GCG A A A G A G C C A C G A GCCGCCGAC
Bsi415F	34	GTTTTCCGCGTACGGGGTCAAAGTTGGCGTTTTA
Bsi415R	35	CAACTTTGACCCCGTACGCGGAAAACACCTGAGAA
Sp1F	50	GTACGTGACCACAAACCCGCCAGCGTCTTGTCATTGGCGTCGACGCT
Sp1R	50	GTACAGCGTCGACCCAATGACAAGACGCTGGGCGGGGTTTGTGGTCGAC
pEndCAUF	66	CTATAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCGTCTTCAAGTTCGAACCTGGGT CCTTTTCATCAC
pEndCAUR	71	CAAAATAAGGTATATTATTGATGATGTTAATTAAGAATTCGGATCTTCGAACATC TGTGCGGTATTCACA

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 l'ADN viral recombinant en cèl·lules especialitzades per a que iniciï el seu cicle viral i es generi l'adenovirus. Un cop a l'interior de la cèl·lula empaquetadora, l'ADN viral recombinant activa la replicació de l'ADN i la transcripció de les proteïnes de la càpside. L'ADN

viral fruit de la replicació s'encapsida per donar lloc a la progènie viral, que s'allibera al medi extracel·lular, on infecta noves cèl·lules. Un cop generat, l'adenovirus recombinant s'amplifica per successives rondes de propagació en les cèl·lules i 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 de la construcció plasmídica per digestió amb l'enzim de restricció *PacI* i es transfecta a les cèl·lules 293 pel mètode del fosfat de calci. Aquest mètode és molt eficient quan es fan servir les cèl·lules 293 o derivades per a la introducció de l'ADN. Els precipitats formats per l'ADN i el fosfat càlcic es generen lentament durant 16 h d'incubació en el medi de cultiu.

Primerament, 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 clorur càlcic 2 M
- 3 µg d'ADN
- 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 eppendorf, s'afegeix 162 µl de la solució HBS 2X (NaCl 274 mM, HEPES 50 mM, fosfat sòdic 1,5 mM en H₂O, pH ajustat a 6,95 amb NaOH). Amb l'ajuda d'una pipeta s'aireja fent bombolles mentre es va afegint la mescla que conté l'ADN gota a gota, i s'aireja 5 segons més per garantir que s'ha mesclat bé. Ens esperem 1 minut per a que reposi, i la mescla s'afegeix a les cèl·lules mentre la placa s'agita suaument per a una millor distribució de la solució. Els precipitats són visibles a les 4h després de la transfecció. A les 16 hores, es canvia el medi de cultiu per medi fresc.

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 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 llisten 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 lisat inicial (passatge 0) a partir del qual es procedeix a amplificar l'adenovirus en successives rondes de propagació.

4.3. SELECCIÓ DE CLONS DELS ADENOVIRUS RECOMBINANTS MITJANÇANT L'ASSAIG DE FORMACIÓ DE CALBES

Per tal de disposar d'un estoc homogeni de cada un dels virus recombinants, es va obtenir clons aïllats mitjançant l'assaig de formació de calbes. L'assaig de formació de calbes es va realitzar en 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 empaquetadores. Un cop aïllats, els clons es van caracteritzar i els correctes van ser amplificats per tal d'emprar-los en 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 lisat inicial de l'adenovirus. A continuació, es recobreix la monocapa de 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. D'aquesta manera, els virions alliberats de la primera infecció només arriben a infectar les cèl·lules veïnes i s'arriba a observar en successives rondes de replicació una calba de lisi en la monopaca cel·lular.

Primerament, es prepara un banc de dilucions seriades (10^{-4} a 10^{-9}) a partir del lisat inicial en medi DMEM al 5% de sèrum fetal boví desactivat (FBS). Amb 100 µl de cada dilució, s'infecta un pou d'una placa de 6 pous (6 mm de diàmetre) que conté cèl·lules A549 al 80-90% de confluència. Un cop s'ha produït la infecció (4-6 hores), es retira el medi i s'afegeix 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'afegeix 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 les primeres calbes virals, cadascuna corresponent a un clon diferent. Per tal d'obtenir les calbes, es retira el medi líquid que recobreix l'agarosa i es perfora l'agarosa amb la punta d'una pipeta de 200 µl. Les calbes s'aspiren amb la pipeta i es resuspenen en 500 µl de DMEM.

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 de les restes de 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 E1 amb el corresponent promotor i per tal d'evitar la possible recombinació homòloga entre el gen E1 del genoma de les 293 i el de l'adenovirus recombinant, tots els virus de replicació condicionada han estat amplificats en la línia tumoral A549. La resta d'adenovirus, els 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 s'amplifica per successives infeccions de plaques cada vegada més grans. En condicions normals de propagació, el lisat 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*, es continua l'amplificació fins a obtenir de 20-30 plaques de 150 mm infectades. L'extracte cel·lular final es purifica mitjançant gradients de clorur de cesi.

Per a la infecció, ja sigui a partir de virus purificat o partir del lisat cel·lular, les cèl·lules han d'estar a una confluència del 80%. 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 es desenganxen el 80% de les cèl·lules, es recull l'extracte cel·lular i 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 centrifuga en tubs de 50ml tipus Falcon durant 5 minuts a 1000 g. El sobrenedant s'elimina i els pèl·lets cel·lulars de les diferents plaques s'ajunten en un sol tub

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 i hámsters 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 lisat cel·lular (càpsides virals buides, restes cel·lulars...) i concentrar les partícules virals. El canvi de formulació es fa per diàlisi contra el tampó desitjat (**Figura 12**).

Per tal d'alliberar les partícules virals de l'interior de la cèl·lula, els pèl·lets cel·lulars provinents de l'amplificació es lisen duent a terme tres cicles de congelació i descongelació. L'extracte viral lisat es centrifuga durant 5 minuts a 1000 g per a precipitar les restes cel·lulars. Al sobrenedant d'aquesta centrifugació l'anomenem extracte cel·lular clarificat (CEC, *Cell Extract Clarified*). El CEC conté els adenovirus a purificar i es carrega en els gradients de clorur de cesi per separar les partícules adenovirals de les restes del cultiu cel·lular.

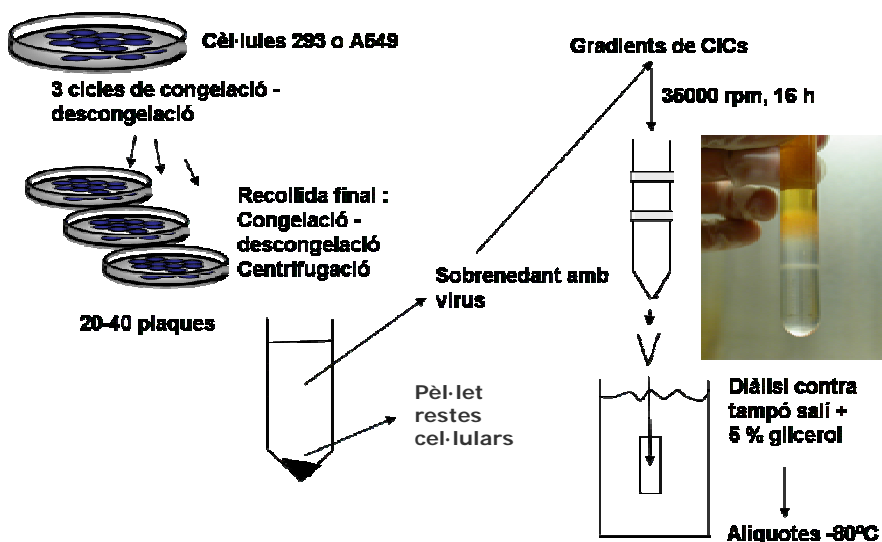


Figura 12. Esquema del procés de purificació viral. La fotografia mostra un tub d'ultracentrifugació amb el gradient de clorur de cesi discontinu i l'extracte cel·lular clarificat (CEC) després de la primera ultracentrifugació. La banda blanca correspon a les càpsides virals plenes

Els gradients de clorur de cesi es preparen en els tubs de la ultracentrífuga (Beckman). Primer, s'afegeix 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 d'un lisat cel·lular de 20-40 plaques, es preparen entre 4 i 6 tubs d'ultracentrífuga. Els tubs es centrifuguen una hora a 10°C a 150000 g (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 ultracentrífuga s'omplen amb les bandes de virus mesclades amb la solució de 1,35 mg/ml de clorur de cesi i es centrifuguen 16 hores a 10°C a 150000 g. Al final de la segona ultracentrifugació s'obté una banda blanquinosa 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⁺⁺ (PBS suplementat amb clorur de calci i de magnesi) 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 a -80°C. Finalment, s'aliquoten diferents volums del virus i es conserven a -80°C.

4.5. TÈCNIQUES EMPRADES PER A LA TITULACIÓ D'ADENOVIRUS

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

Aquest protocol es basa en determinar l'absorbància de l'ADN 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 és de $1,1 \cdot 10^{12}$ per cada unitat de DO.

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

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

4.5.2. Determinació de partícules víriques funcionals per tinció d'hexó (TU/ml)

Aquest protocol es basa en comptar el número de cèl·lules positives per a una immunotinció de la proteïna viral de l'hexó en una monocapa de cèl·lules infectada amb dilucions seriadades del virus. Aquesta tècnica 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 50000 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 l'anticòs primari contra la proteïna de l'hexó extret de l'hibridoma 2Hx-2 (ATCC, Manassas, VA, Estats Units), diluït 1:5, durant 1 h a 37°C. Passat aquest temps, es fan tres rentats més i s'incuben amb un anticòs secundari anti-ratolí conjugat amb el fluorocrom 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, s'utilitza la següent fórmula:

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

4.6. TÈCNIQUES EMPRADES PER A LA CARACTERITZACIÓ D'ADENOVIRUS

4.6.1. Mètodes per a l'obtenció de l'ADN adenoviral

L'ADN 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:

4.6.1.1. *Obtenció de l'ADN adenoviral a partir del sobrenedant de cèl·lules infectades*

Es recullen 340µl del sobrenedant de cèl·lules infectades als quals s'hi afegeix:

- 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 del SDS degrada la càpside proteica i l'EDTA intervé d'agent protector de l'ADN alliberat. La mescla es deixa temperar i l'ADN s'extreu amb fenol:cloroform. Es recupera la fase aquosa i es precipita l'ADN amb etanol al 2% d'acetat sòdic. Finalment, el pèl·let d'ADN es resuspèn en 25 µl d'aigua bidestil·lada. En aquest procediment s'obté molt poca quantitat d'ADN i es fa servir quan no és possible obtenir l'ADN a partir de les cèl·lules infectades o del virus purificat.

4.6.1.2. *Obtenció de l'ADN adenoviral a partir de cèl·lules infectades (Hirt's)*

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

Primer de tot, s'infecten cèl·lules 293 o A549 sembrades en una placa de 100 mm de diàmetre, al 80% de confluència, amb una desena part del lisat cel·lular que conté el virus. Quan l'efecte citopàtic es complert, l'extracte cel·lular total es recull i es centrifuga 5 minuts a 1000 g. Es retira el sobrenedant, el pèl·let cel·lular es dissol en 1,5 ml de PBS i es passa a un tub tipus eppendorf. Les cèl·lules es centrifuguen 5 minuts a 8000 g. El sobrenedant es retira i el pèl·let 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), es mescla 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 a l'ADN cel·lular. Per tal d'eliminar l'ADN cel·lular, la suspensió es centrifuga durant 30 minuts a 15000 *g* 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 de l'ADN amb fenol:cloroform i es precipita amb etanol al 2% en acetat sòdic. Finalment, l'ADN es dissol en 25 µl d'aigua bidestil·lada o en TE pH 8,0.

4.6.1.3. Obtenció de l'ADN adenoviral a partir de virus purificat

Aquest procediment s'ha fet per 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 segons l'apartat 4.4.2. Es pren una alíquota que contingui 2×10^{10} partícules virals, que es corresponen a 1 µg d'ADN, i 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 barreja s'incuba a 56°C durant 2 hores. A continuació, es fa una extracció amb fenol:cloroform de l'ADN i es precipita amb etanol al 2% en acetat sòdic. El pèl·let d'ADN es dissol en 25 µl d'aigua bidestil·lada o TE pH 8.0.

4.6.2. Digestió amb enzims de restricció i seqüenciació de l'ADN adenoviral

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

4.6.2.1. Digestió amb enzims de restricció

Es parteix aproximadament de 500-800 ng d'ADN viral obtingut a partir de les cèl·lules infectades o del virus purificat i s'hi afegeix 1 unitat de l'enzim de restricció, el tampó adient per 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 en un gels d'agarosa preparada a l'1 % en Tris-Acetate-EDTA (TAE) juntament amb una digestió del vector no modificat emprat com a control i amb un marcador de pes molecular comercial. Els enzims de restricció emprats han estat *HindIII* i *EcoRV*. El patró de digestió de l'ADN viral amb aquests enzims ens permet fer una valoració de la integritat del genoma viral.

4.6.2.2. Reacció de seqüenciació

Per a la seqüenciació de l'ADN viral, es parteix de 100 ng d'ADN i s'hi afegeix 5 µl de la mix de seqüenciació 3.1 de la casa comercial Applied Biosystems (conté els dNTPs i ddNTPs, cadascun d'ells marcat amb un fluorocrom diferent), 5 µl del tampó de seqüenciació 5X i 3.2 pmol 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.

5. ASSAJOS *IN VITRO* AMB ADENOVIRUS RECOMBINANTS

5.1. DETECCIÓ DE PROTEÏNES PER WESTERN-BLOT

5.1.1. Obtenció de l'extracte proteic

Primerament, es sembra en una placa de 24 pous un número conegut de cèl·lules per tal de que en el moment de la infecció estiguin al 80% de confluència. Per a la infecció de les cèl·lules, es retira el medi de cultiu per aspiració i les cèl·lules s'infecten per duplicat amb 500 µl de les dilucions virals prèviament preparades. La MOI (multiplicitat d'infecció o TU/cèl·lula) necessària per assolir la infecció del 80% de les cèl·lules depèn de cada línia cel·lular emprada: les A549 es van infectar amb una MOI de 10, les SKMel28, les NP-9, les Isrec-01, les 1.36.1.5 i les Saos-2 amb una MOI de 20 i les SCC-25 amb una MOI de 40. Els cultius primaris d'hepatòcits es van infectar amb una MOI de 10.

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. Un cop han transcorregut

24 hores després de la infecció, les cèl·lules es renten amb PBS i es tripsinitzen suaument. Es recullen els duplicats i s'ajunten en un sol tub eppendorf per tal d'obtenir més quantitat de proteïna, i es centrifuguen a 6000 *g* durant 5 minuts. Es tornen a rentar amb PBS i es tornen a centrifugar per tal de congelar-les eixutes a -80°C.

A continuació, es resuspenen les cèl·lules en el tampó Shieh's de lisi i es deixa actuar en agitació suau durant 45 minuts a 4°C. Un cop passats els 45 minuts, es centrifuguen els tubs i es recull l'extracte proteic en tub eppendorf i es congela per a titular-lo. El tampó Shieh's conté:

- Tris-HCl 10 mM pH 7,4 (50 µl d'un estoc 1 M pH 7,5)
- NaCl 400 mM (400 µl d'un estoc 5 M)
- NaF 5 mM (50 µl d'un estoc 0,5 M)
- Glicerol 10% (500 µl d'un estoc 100%)
- EDTA 1 mM (10 µl d'un estoc 0,5 M)
- Ortovanadat 1 mM (10 µl d'un estoc 0,5 M)
- Nomidet P-40 0,5% (25 µl d'un estoc 100%)
- Còctel d'inhibidors de proteases 1x (100 µl d'un estoc 50x Complete Mini, Roche, Suïssa)

5.1.2. Titulació de l'extracte proteic

En una placa de 96 pous, es fa una recta patró de concentració de proteïna utilitzant BSA comercial de concentració coneguda. Per triplicat, es dilueix la BSA en els pous per tal de que quedi 0, 1, 2, 3, 4 i 5 µg de proteïna en 160 µl. En uns altres pous, es fan dos dilucions diferents per duplicat del nostres extractes proteics (normalment, 5 µl i 10 µl d'una dilució 1/10 en 160 µl), sempre treballant en gel. Als 160 µl de les dilucions, se'ls afegeix 40 µl del reactiu de Bradford i es barreja sense fer bombolles. Després de 5 minuts d'incubació a temperatura ambient, es fa una lectura de la DO a 595 nm. Mitjançant l'absorbància de les concentracions de BSA, es dibuixa una recta patró que ens permetrà obtenir la concentració dels nostres extractes per regressió.

5.1.3. SDS-PAGE i transferència a membrana

Primerament, es polimeritza un gel d'acrilamida-bisacrilamida al 10% utilitzant vidres de 1,5 mm de Bio-Rad (Hercules, Califòrnia, Estats Units). El gel polimeritzat consta de dues parts:

- *Stacking*: 4,4 ml d'aigua, 0,75 ml d'acrilamida-bisacrilamida al 40%, 0,75 ml de Tris-HCl 1,5 M pH 6,8, 60 µl SDS al 10%, 60 µl d'una dilució d'APS al 10% i 6 µl de TEMED.

- *Resolving*: 4,65 ml d'aigua, 2,55 ml d'acrilamida-bisacrilamida al 40%, 2,6 ml de Tris-HCl 1,5 M pH 8,8, 100 µl SDS al 10%, 100 µl d'una dilució d'APS al 10% i 10 µl de TEMED.

Un cop el gel està polimeritzat, es carrega entre 2 i 20 µg de proteïna dels nostres extractes diluïts amb un tampó de càrrega 6x (300 mM Tris-HCl pH 6,8, 600 mM DTT, 12% SDS, 0,6% blau de bromofenol, 60% glicerol) i bullit durant 5 minuts a 100°C. A més, també hi carreguem un marcador de pes molecular de proteïnes. El gel es submergeix en tampó d'electroforesi (25 mM Tris, 192 mM glicina, 0,1% SDS) i es deixa corre durant unes dues hores a 100 V i 20 mA (40 mA si estem corrent dos gels a la vegada).

A continuació, es procedeix a la transferència a una membrana de nitrocel·lulosa. Es realitza el següent muntatge en l'aparell de transferència: una esponja, 3 papers Wattman, gel d'acrilamida amb les proteïnes, membrana de nitrocel·lulosa, 3 papers Wattman i una esponja. Es transfereix durant 1 hora a 400 mA en agitació contínua a 4°C.

5.1.4. Bloqueig, hibridació i detecció

Primerament, es bloqueja la membrana durant 40 minuts utilitzant tampó TBS-0,05% Tween amb un 5% en pes de llet en pols per prevenir la unió inespecífica de l'anticòs a la membrana. Seguidament, es fan tres rentats de 10 minuts amb TBS-0,05% Tween i s'incuba la membrana amb l'anticòs primari durant tota la nit a 4°C diluït en TBS-0,05% Tween amb un 1% en pes de llet en pols. A la **Taula 6** s'indiquen els anticossos primaris utilitzats i a les dilucions utilitzades. Al matí següent, es renta 4 cops la membrana durant 10 minuts amb TBS-0,05% Tween i s'incuba durant 2 hores a temperatura ambient amb l'anticòs secundari diluït en TBS-0,05% Tween amb un 1% en pes de llet en pols. A la **Taula 6** s'indiquen els anticossos secundaris utilitzats i a les dilucions utilitzades. Finalment, es renta 4 cops la membrana, es desenvolupa amb ECL d'Amersham (GE Healthcare, Piscataway, Nova Jersey, Estats Units) durant 1 minut i es revela en un film per revelar quimiolumiscència, també d'Amersham. La quantificació de les bandes de Western-blot es va realitzar per densitometria utilitzant un densitòmetre BIO-RAD GS-800.

Taula 6. Anticossos primaris i secundaris utilitzats en les deteccions per Western-blot

Anticòs	Antigen	Origen	Dilució	Casa Comercial
sc-430	E1A Adenovirus-2/5	Policlonal de conill	1/500	SantaCruz
sc-247	Ciclina E	Monoclonal de ratolí	1/1000	SantaCruz
ab-16667	Ki-67	Monoclonal de conill	1/1000	Abcam
Sèrum anti-NfsA	NfsA	Policlonal d'ovella	1/100	Alta Bioscience
HRP antirabbit	Anticossos de conill	Monoclonal de cabra	1/1000	DakoCytomation
HRP antimouse	Anticossos de ratolí	Monoclonal de cabra	1/1000	DakoCytomation
HRP antisheep	Anticossos d'ovella	Monoclonal de burro	1/1000	Sigma

5.2. ASSAJOS DE PRODUCCIÓ VIRAL

Per tal de realitzar els assajos de producció viral, es sembra un número conegut de cèl·lules en plaques de 24 pous amb un volum de 1 ml de medi, de tal manera 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 MOI (multiplicitat d'infecció)), de manera que s'infectin el 80% de les cèl·lules en cultiu. La MOI necessària per assolir la infecció del 80% de les cèl·lules depèn de cada línia cel·lular emprada: les 293, les A549 i les C33A es van infectar amb una MOI de 10, les SKMel28, les NP-9, les PC-3, les Isrec-01, les 1.36.1.5, les Saos-2 i les HCT-116 amb una MOI de 20 i les SCC-25 i les HUVEC amb una MOI de 40. Els cultius primaris d'hepatòcits es van infectar amb una MOI de 10. Les seccions de teixit es van infectar amb una MOI de 50 segons un número estimat de cèl·lules de 1×10^6 basat en que 250 µm de grossor correspon a 10 capes de cèl·lules, amb un diàmetre de 8 mm (Kirby *et al.*, 2004).

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 a 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 tant 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 12 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 5000 g i els sobrenedants lliures de cèl·lules es titulen pel mètode de la tinció d'hexó prèviament descrit. Les mostres de sobrenedant es titulen directament sense necessitat de fer els cicles de congelació i descongelació i sense necessitat de centrifugar-los.

5.3. ASSAJOS DE 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. Per a aquest anàlisi, s'ha emprat el mètode de quantificació de la proteïna total mitjançant l'assaig de l'àcid bicinonínic (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) amb l'elevada sensibilitat i selectivitat que tenen aquests ions (Cu^{1+}) de ser detectats utilitzant l'àcid bicinonínic. 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 540 nm.

Per realitzar l'assaig de citotoxicitat, es van preparar 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 a un volum final per pou de 50 μl . La concentració viral al primer pou va ser de 180 a 250 MOI 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, 1/4 per les cèl·lules Sk-mel28 i les NP9, i 1/3 per les NP-18 i Saos-2. A continuació es va afegir 100 μl d'una suspensió cel·lular a raó de 2×10^4 (A549 o NP-18), $1,5 \times 10^4$ (NP-9 ó Saos-2) o 1×10^4 (PC3 i Sk-mel28) 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. El medi d'infecció es retira i les cèl·lules es renten amb PBS per tal d'eliminar el FBS romanent del medi de cultiu. A continuació, s'afegeix 200 µl de la solució BCA i s'incuba a 37°C durant 30 minuts. Finalment, l'absorbància es quantifica a 540 nm.

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 necessària per llisar el 50% de les cèl·lules en cultiu) va ser estimada a partir de corbes dosi-resposta per regressió estàndard no lineal (GraFit; Erithacus Software Ltd., Surrey, United Kingdom) utilitzant una adaptació de l'equació de Hill.

5.4. ASSAJOS DE TAMANY DE CALBES

Primerament, es prepara un banc de dilucions seriades (10^{-4} a 10^{-9}) a partir del lisat de virus en medi DMEM al 5% de sèrum fetal boví desactivat (FBS). Amb 100 µl de cada dilució s'infecta un pou d'una placa de 6 pous (6 mm de diàmetre) que conté cèl·lules A549 al 80-90% de confluència. Un cop donada la infecció (4-6 hores), es retira el medi d'infecció i s'afegeix 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 les primeres calbes virals. Per a una millor visualització de les calbes, es procedeix a tenyir-les amb MTT. Per a fer-ho, s'afegeix al sobrenedant de l'agarosa 0,1 volum d'una dilució 5 mg/ml de MTT (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) en DMEM 5% FBS i s'incuba durant 3 hores a 37°C.

6. ASSAJOS *IN VIVO* AMB ADENOVIRUS RECOMBINANTS

6.1. ANIMALS EMPRATS I CONDICIONS D'ESTABILACIÓ

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 ratolins eren mascles de 4 a 8 setmanes d'edat, amb un pes d'entre 20 i 30 grams.

Per als experiments amb hámsters, s'han utilitzat femelles de hámster daurat o siri (*Mesocricetus auratus*) de 5 setmanes d'edat, amb un pes d'entre 80 i 100 grams. Els animals es mantenien estabulats a una temperatura controlada d'entre 22 i 24°C amb un cicle de llum/foscó de 12 h i una dieta estàndard amb aigua i menjar *ad libitum*. La manipulació i l'estabulació dels animals s'ha realitzat a les instal·lacions de l'IDIBELL (unitat 105 de l'AAALAC (*Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care*)) 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'IDIBELL.

6.2. IMPLANTACIÓ SUBCUTÀNIA DE CÈL·LULES TUMORALS I MONITORATGE DELS TUMORS

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 contenen, 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 150 µl per tumor. El número de cèl·lules implantades per tumor als ratolins varia entre 3×10^6 i 1×10^7 cèl·lules, en funció de la línia cel·lular emprada. En els experiments amb hámsters, el número de cèl·lules tumorals implantades va ser en tots els casos de 5×10^5 cèl·lules, prèvia depilació utilitzant crema depilatòria i anestèsia mitjançant un còctel de ketolar i xilogèsic. La implantació dels tumors es va realitzar mitjançant l'administració subcutània dels 200 µl de suspensió cel·lular en els flancs posteriors del ratolí, dos tumors per animal. La injecció subcutània es va realitzar amb una xeringa hipodèrmica amb agulla de 29 G. 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 a 150mm³, depenent del tipus tumoral, els animals es van distribuir a l'atzar en grups experimentals i es va realitzar l'experiment oportú.

6.3. ADMINISTRACIÓ DELS ADENOVIRUS

Les solucions virals administrades *in vivo* corresponen a dilucions fetes en PBS a partir dels estocs de virus purificats. Per administrar sistèmicament els adenovirus als ratolins, es van preparar estocs virals per a injectar una quantitat de 5×10^{10} o 1×10^{11} partícules virals per ratolí, en un volum de 0,2 ml. La injecció es va realitzar amb agulles hipodèrmiques de 29 G i es va realitzar per les venes laterals de la cua, prèvia dilatació mitjançant fregues amb alcohol i calor. Per a l'administració sistèmica de virus als hámsters, es van preparar estocs virals per injectar una quantitat de 4×10^{11} partícules virals per hámster, en un volum de 0,3 ml. La injecció es va fer amb agulles hipodèrmiques de 30 G a través de la vena cefàlica, prèvia anestèsia de l'animal i depilació de la pota davantera.

6.4. OBTENCIÓ DE MOSTRES

Tant l'obtenció d'òrgans com de sang per al seu anàlisi es van fer previ sacrifici de l'animal en una cambra de CO₂.

6.4.1. Obtenció de sèrum per a la determinació de la virèmia

La sang es va obtenir 6 hores després de la administració de virus a través d'un petit tall de la cua del ratolí. Després d'una centrifugació de 5 min a 6500 *g*, es va titular la quantitat de virus en el sèrum pel mètode de la tinció de l'hexó.

6.4.2. Obtenció de sang i sèrum per a anàlisi hematològic i bioquímic

L'extracció de sang es va realitzar per punció intracardíaca després del sacrifici de l'animal i es va realitzar amb una agulla hipodèrmica de 25 G. Les mostres de sang per a hematologia es van recollir en un tub amb EDTA i es van enviar al Servei d'Hematologia de la Facultat de Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona per al seu anàlisi. Les mostres per a anàlisi bioquímic del sèrum es van recollir en tubs amb citrat. Després d'una centrifugació de 5 min a 6500 *g*, les mostres de sèrum es van enviar al Servei de Bioquímica Clínica Veterinària de la Facultat de Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona per a l'anàlisi de AST, ALT i Creatinina.

6.4.3. Obtenció d'òrgans

Previ sacrifici dels animals, es van obtenir els fetges en els experiments de toxicitat i els tumors en els experiments de potència. Els òrgans es van extreure i separar del teixit connectiu amb l'ajut de material quirúrgic i, 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 a la seva posterior inclusió en parafina, i l'altra s'inclouïa en OCT.

6.4.3.1. Inclusió de teixits en parafina

La fixació i inclusió de teixits en parafina permet conservar la morfologia dels teixits i els hi dona la consistència necessària per permetre la seva secció en 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.

El 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. Al 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 al 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, juntament amb una placa que està a una temperatura de 4°C i que permet la solidificació homogènia dels blocs.

6.4.3.2. 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 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 temperatura ambient 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 parafinat

A partir dels blocs de parafina prèviament refredats a -20°C , es van realitzar talls de $4\ \mu\text{m}$ de gruix utilitzant 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. Els talls es conserven a temperatura ambient.

7.1.2. Talls histològics congelats

En aquest cas, partim de les mostres preservades en OCT a -80°C . Els blocs es tallen en seccions de $5\ \mu\text{m}$ 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 que està a temperatura ambient. La diferència de temperatura entre la mostra congelada i el portaobjectes permet l'adhesió ràpida de la mostra. Les crioseccions es guarden a -80°C fins al moment del seu processament.

7.2. TINCIÓ AMB EOSINA-HEMATOXILINA DE TALLS PARAFINATS

En aquest treball s'han realitzat tincions amb eosina-hematoxilina de talls parafinats de fetge de ratolí per observar la toxicitat causada pels adenovirus sobre el parènquima hepàtic.

Primerament, es procedeix a desparafinar les mostres sotmetent-les a una bateria de 4 xilens (10 min cada xilè), 3 etanols absoluts, 3 etanols 96° , 1 etanol 70° i 1 etanol 50° (5 min cada etanol). Seguidament, les mostres s'hidraten submergint-les 5 minuts en aigua bidestil·lada. Es

tenyeixen durant 10 minuts amb una solució d'hematoxilina de Harris (Merck) prèviament filtrada. Es renten sota l'aixeta i es fa virar el color de la tinció primerament a vermell submergint-les en una solució d'HCl a l'1%, i després a blau submergint-les en una solució d'aigua amoniacal. A continuació, es tenyeixen amb una solució d'eosina (Merck) al 25% en etanol 80º durant 30 segons. Finalment, les preparacions es deshidraten utilitzant una bateria ràpida d'un etanol 70º, 3 etanols 96º, 3 etanols absoluts (1 min cada etanol) i 4 xilens (3 min cada xilè). Les mostres es munten amb medi de muntatge DPX (VWR International) i s'observen en un microscopi òptic.

7.3. IMMUNOHISTOQUÍMIQUES SOBRE TALLS PARAFINATS

En aquest treball s'han realitzat immunohistoquímiques per detectar adenovirus sobre tall parafinats de tumor. A la **Taula 7** s'indiquen els anticossos primaris i secundaris emprats per a la detecció dels adenovirus. Les incubacions es van realitzar sempre a cambres humides sense permetre que es sequessin els teixits. A més, totes les solucions es van preparar al moment del seu ús.

Taula 7. Anticossos primaris i secundaris utilitzats en les immunohistoquímiques sobre talls parafinats.

Anticòs	Antigen	Origen	Dilució	Casa Comercial
Ab6982	Proteïnes càpside adenoviral	Policlonal de conill	1/100	Abcam
EnVision ⁺ System-HRP antirabbit	Anticossos de conill	Monoclonal de cabra	-	DakoCytomation

Primerament, es procedeix a desparafinar les mostres tal i com s'indica a l'apartat de tinció amb eosina-hematoxilina. Després d'hidratar-les 5 minuts en aigua bidestil·lada, les mostres es renten 3 cops amb PBS pH 7.4 durant 5 minuts. A continuació es realitza el desemascament dels antígens posant les mostres en una olla a pressió amb tampó citrat sòdic pH 6 durant 2 minuts a màxima temperatura. Un cop es refreden les mostres, es renten per immersió en aigua bidestil·lada durant 5 minuts i 3 cops en PBS pH 7.4 durant 5 minuts. Seguidament, es procedeix al bloqueig per a reduir les unions inespecífiques de l'anticòs. Les mostres es cobreixen amb una solució al 20% de sèrum de cavall en PBS i es deixen una hora a

temperatura ambient en una cambra humida. Es retira la solució de bloqueig i es cobreixen les seccions amb una dilució de l'anticòs primari en PBS durant tota la nit a 4°C. Al dia següent, les mostres es temperen durant 30 minuts i es renten 3 cops amb PBS-0,2% Tritó-100 durant 5 minuts. Després dels rentats, les seccions es cobreixen amb EnVision⁺-System-HRP i s'incuben durant 30 minuts a temperatura ambient. Les mostres es renten 3 cops més amb PBS-0,2% Tritó-100 durant 5 minuts i es cobreixen amb el substrat cromogènic DAB+ (Envision Kitt, Dako Cytomation K3468) i s'incuba durant aproximadament 30 segons fins l'aparició d'un substrat marró. La reacció s'atura submergint les mostres en aigua de l'aixeta durant 10 minuts. Es contratenyeixen les mostres amb hematoxilina de Harris durant 1-2 minuts i es tornen a rentar sota l'aixeta durant 10 minuts. Finalment, es rehidraten les mostres en una bateria gradual d'alcohols, tal i com s'indica a l'apartat de tinció amb eosina-hematoxilina, i es munten amb medi de muntatge DPX (VWR International).

7.4. IMMUNOHISTOFLUORESCÈNCIES SOBRE TALLS CONGELATS

En aquest treball s'han realitzat immunohistofluorescències en talls congelats per detectar adenovirus sobre fetge i sobre tumor. La detecció d'adenovirus sobre 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 teixit es conserva pitjor. El protocol utilitzat per a la detecció d'adenovirus ha estat el mateix, variant només els anticossos primaris i secundaris emprats en funció del teixit (**Taula 8**). Per a la detecció en fetge, es va utilitzar un anticòs primari contra la proteïna E1A degut a que l'adenovirus es defectiu en replicació al ratolí. Per a la detecció en els tumors, es va utilitzar un anticòs primari contra les proteïnes de la càpside adenoviral ja que l'adenovirus sí que replica en teixit tumoral humà i el soroll de fons es veu molt disminuït amb aquest anticòs. 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.

Taula 8. Anticossos primaris i secundaris utilitzats en les immunohistofluorescències sobre talls congelats.

Anticòs	Antigen	Origen	Dilució	Casa Comercial
sc-430	E1A Adenovirus-2/5	Policlonal de conill	1/100	SantaCruz
Ab6982	Proteïnes càpside adenoviral	Policlonal de conill	1/100	Abcam
Alexa488 antirabbit	Anticossos de conill	Monoclonal de cabra	1/100	Invitrogen

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 amb aigua destil·lada i un de 10 minuts en PBS+0,05% Tween-20, les seccions es cobreixen amb la solució de bloqueig (20% sèrum de cabra o de cavall en PBS) i s'incuben durant 30 minuts a temperatura ambient en una cambra humida. Passat aquest temps, 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 un anticòs inespecífic del mateix origen que l'anticòs primari diluït 1/100 en PBS+0.05% Tween-20. La incubació amb l'anticòs primari es realitzava durant 1h a temperatura ambient. 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 es realitzava el muntatge de les seccions amb medi de muntatge que conté el colorant DAPI (DAKO) per tenyir els nuclis i poder observar-los al microscopi de fluorescència. Les imatges per detectar la presència d'adenovirus 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).

RESULTATS

1. MODIFICACIÓ DEL PROMOTOR E2F-1 PER AUGMENTAR LA POTÈNCIA D'ADENOVIRUS ONCOLÍTICS

1.1. CONSTRUCCIÓ DE L'ADENOVIRUS RECOMBINANT ICOVIR-7

En treballs anteriors a la realització d'aquesta tesi, el nostre grup va generar l'adenovirus oncolític ICOVIR-5, que controla la transcripció de la proteïna E1A sota el promotor E2F-1 i, per tant, subjuga la replicació del virus a la desregulació de la via de RB i a la presència d'E2F lliure (Cascallo *et al.*, 2007). Degut a que l'especificitat tumoral del promotor E2F-1 present a ICOVIR-5 ve donada per l'estructura única de llocs d'unió del factor de transcripció E2F (Neuman *et al.*, 1994, 1995), al nostre grup es va decidir augmentar el número d'aquestes estructures palindròmiques per augmentar la dependència sobre E2F de la replicació viral. ICOVIR-7 es va generar mitjançant la introducció de vuit nous llocs d'unió d'E2F, organitzats en quatre palíndroms imperfectes, al promotor E2F-1 d'ICOVIR-5 (**Figura 13a**). La modificació es va fer davant de les caixes CAAT del promotor per no influir en l'inici de la transcripció. Degut al doble paper que juga E2F en la transcripció, activant-la quan es troba lliure i reprimint-la quan es troba unit a pRB (Black and Azizkhan-Clifford, 1999), amb aquesta modificació preteníem un augment tant de la selectivitat com de la potència oncolítica (**Figura 13b**). A cèl·lules quiescents, la unió del complex pRB-E2F als llocs d'unió reprimiria la transcripció d'E1A- Δ 24 degut a la unió de HDACs i d'altres factors que remodelen la cromatina. La deleció Δ 24 d'E1A, a més, no és capaç de desfer la unió entre pRB i E2F en cas d'una pèrdua de fidelitat del promotor i evitaria un bucle positiu d'activació. Complementàriament, la seqüència aïllant DM-1 evita pèrdues de selectivitat degudes als *enhancers* d'E1A (Majem *et al.*, 2006). En canvi, a cèl·lules tumorals, la desregulació de la via de RB provocaria l'alliberament d'E2F i la unió d'aquest factor als nous llocs d'unió, activant de la transcripció d'E1A. A més, la seqüència Kozak millora la traducció d'E1A i n'augmenta la quantitat (Kozak, 1986). A continuació, E1A activaria totes les altres proteïnes virals, incloent E4-6/7, la qual forma un complex amb E2F i promouria la unió activa d'E2F a les estructures úniques palindròmiques del promotor E2F modificat i d'E2, activant un potent cercle d'activació que provocaria la replicació millorada del virus.

Un cop vàrem tenir el virus construït, ben caracteritzat, amplificat i purificat, vam procedir a determinar les seves característiques, tant de selectivitat com de potència oncolítica, per determinar el benefici que comporta respecte a la seva versió anterior, ICOVIR-5.

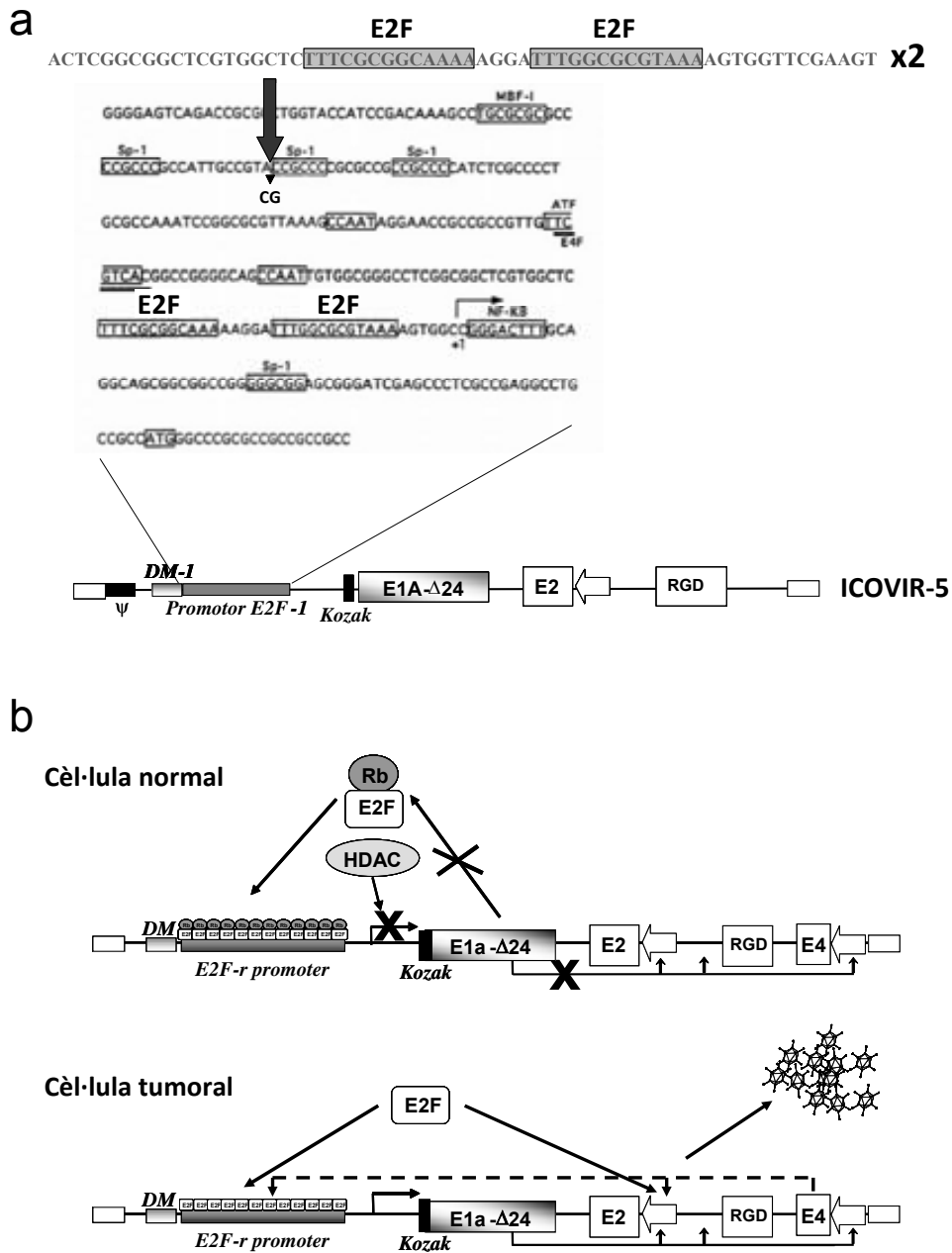


Figura 13. Modificació del promotor E2F-1 i mecanisme d'acció. (a) Mutació realitzada al promotor E2F-1 d'ICOVIR-5. En la figura, s'indica la seqüència del promotor salvatge E2F-1 i els llocs descrits d'unió a diferents factors de transcripció. El promotor salvatge E2F-1 conté dos palíndroms de llocs d'unió d'E2F davant del lloc d'inici de la transcripció. La mutació introduïda al promotor a ICOVIR-7 consisteix en la doble incorporació d'una seqüència, indicada a la figura, que incorpora dos palíndroms de llocs d'unió d'E2F. (b) Mecanisme d'activació i repressió de la replicació viral. A cèl·lules normals, la unió de complexos pRb-E2F reprimeix la transcripció d'E1A-Δ24 i la replicació viral. A cèl·lules tumorals, la unió d'E2F lliure activa un bucle d'autoactivació que culmina en la replicació viral i la lisi de la cèl·lula.

1.2. SELECTIVITAT D'ICOVIR-7

Per determinar si els nous llocs d'unió d'E2F milloren la repressió de la transcripció d'E1A a cèl·lules normals, vàrem avaluar l'efecte d'una infecció comparativa vers ICOVIR-5 en diferents models de toxicitat, tant *in vitro* com *in vivo*.

1.2.1. Replicació a cèl·lules HUVEC

Després de l'administració d'elevades dosis d'adenovirus, el dany de l'endoteli vascular s'ha descrit com un dels efectes més importants (Morral *et al.*, 2002). Per avaluar si ICOVIR-7 podia disminuir el dany causat sobre les cèl·lules endotelials de la vasculatura, vàrem realitzar un assaig comparatiu de producció viral a cèl·lules HUVEC (cèl·lules endotelials humanes de vena de cordó umbilical). Per arrestar les cèl·lules i poder-les utilitzar com a model de cèl·lula normal, es va deprivar el sèrum del medi 24 hores abans de la infecció i es va determinar la progènie viral 5 dies després. Com es pot veure a la **Figura 14**, la quantitat de virus produïda a la infecció amb ICOVIR-7 es redueix a la meitat respecte als virus produïts amb ICOVIR-5, indicant un augment de la selectivitat. La quantitat de virus produïda amb ICOVIR-7 es redueix 7 cops respecte a la produïda amb l'Adwt-RGD, un adenovirus que controla la transcripció d'E1A sota el promotor salvatge.

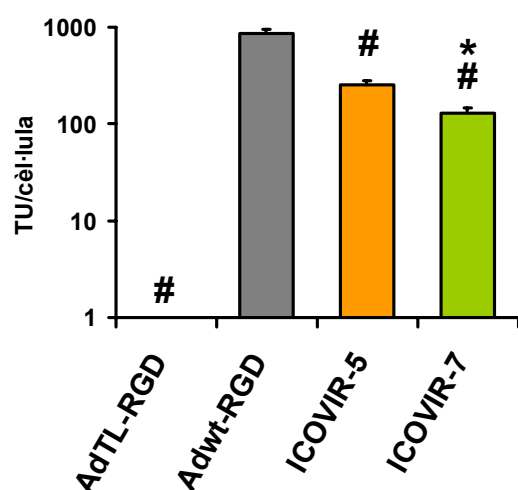


Figura 14. Replicació a HUVEC. Les cèl·lules HUVEC, prèvia deprivació del sèrum, es van infectar amb l'adenovirus no replicatiu AdTL-RGD, amb Adwt-RGD, ICOVIR-5 o ICOVIR-7 (amb una MOI de 40) i la progènie viral es va determinar a dia 5 post-infecció pel mètode de la tinció de la proteïna hexó. Les barres d'error +SD s'indiquen a la figura. #, significant ($p < 0,000005$) en un test t de Student de dues cues desaparellades, comparat amb el grup Adwt-RGD. *, significant ($p < 0,03$) en un test t de Student de dues cues desaparellades, comparat amb el grup ICOVIR-5.

1.2.2. Model d'hepatòcits humans en cultiu

Quan l'agent oncolític és administrat de forma sistèmica, una gran proporció d'ell queda retingut al fetge, fet que provoca toxicitat hepàtica (Parato *et al.*, 2005). Com a una primera aproximació de l'avaluació de la toxicitat hepàtica, vam establir cultius primaris d'hepatòcits humans a partir d'una biòpsia de fetge seguint un mètode combinat de perfusió de col·lagenasa i disrupció mecànica. Els hepatòcits obtinguts amb aquest mètode s'infectaven bé amb el virus AdTL-RGD a una MOI de 5 i presentaven la morfologia típica del parènquima hepàtic (**Figura 15a**).

Després d'una infecció comparativa amb Adwt-RGD, ICOVIR-5 i ICOVIR-7, en vàrem determinar la quantitat d'E1A produïda i la progènie viral generada. En un Western-blot anti-E1A realitzat 24 hores després de la infecció, ICOVIR-5 era capaç d'inhibir de forma completa l'expressió d'E1A (**Figura 15b**). En canvi, ICOVIR-7 presentava certs nivells d'aquesta proteïna, fet que indicava que la repressió de la transcripció no era completa amb la nova modificació. Per corroborar aquests resultats, vàrem determinar la quantitat de progènie viral produïda després de la infecció dels hepatòcits amb ambdós virus. En aquest assaig, els resultats varen ser similars, reduint ICOVIR-7 a la meitat la quantitat de virus produïda respecte al Adwt-RGD, però molt lluny de les 13 vegades que la redueix l'ICOVIR-5 (**Figura 15c**). L'explicació a aquest resultat es va aclarir amb la detecció de marcadors de replicació, com es mostra més endavant.

1.2.3. Model de seccions de fetge humà

Per comprovar si realment la toxicitat hepàtica es veia incrementada amb ICOVIR-7 respecte ICOVIR-5, vàrem establir un model *in vitro* de toxicitat hepàtica molt més fidedigne a les condicions fisiològiques. Les seccions de teixit són talls molt fins d'un teixit tallades de tal manera que es mantingui l'estructura original d'aquest i la viabilitat de les cèl·lules (Olinga *et al.*, 2001). Després del tall, les seccions es poden mantenir viables entre 6-10 dies en cultiu. Per poder utilitzar seccions d'una biòpsia de fetge humà com a model de toxicitat, primer vàrem determinar quina multiplicitat d'infecció ens permetia infectar un nombre més elevat de cèl·lules. Com s'observa a la **Figura 16a**, la MOI amb la qual s'observava un nombre més elevat de cèl·lules verdes després d'una infecció amb AdTL-RGD era de 50. Amb una MOI superior (100), el número de cèl·lules transduïdes era la mateixa i no obteníem un benefici clar utilitzant el doble de virus.

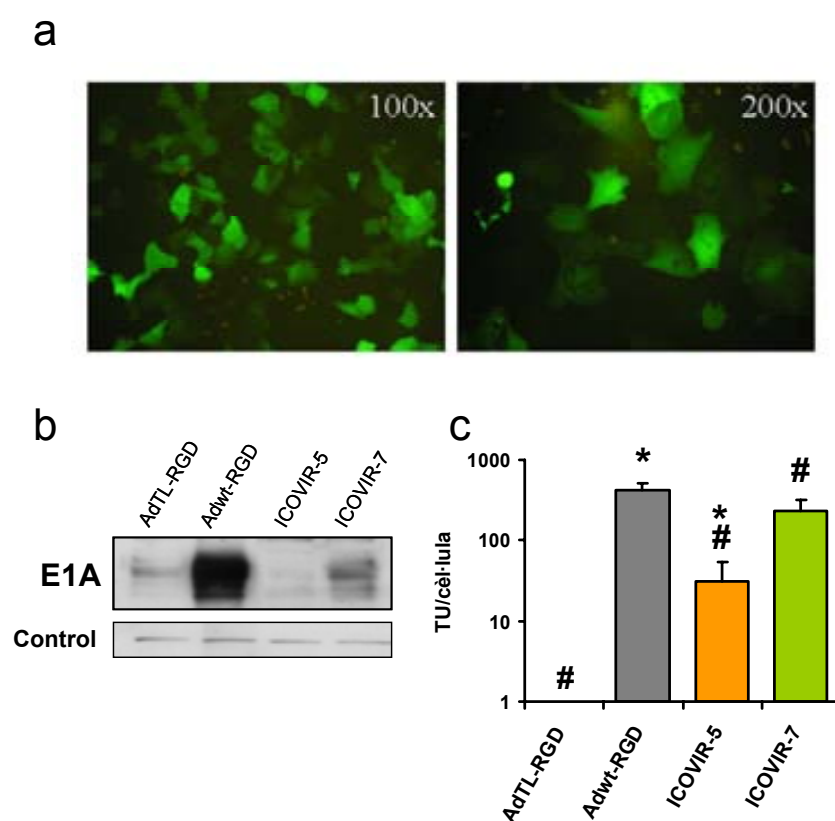


Figura 15. Selectivitat d'ICOVIR-7 a hepatòcits en cultiu. (a) Hepatòcits en cultiu 48 hores després d'una infecció amb AdTL-RGD a una MOI de 5. Fotografies fetes a 100 i 200 augments amb un microscopi de fluorescència. (b) Western-blot anti-E1A realitzat sobre extractes cel·lulars obtinguts 24 hores després de la infecció dels hepatòcits a 5 MOI. El control de càrrega es correspon a una banda inespecífica de l'anticòs anti-E1A. (c) Replicació d'ICOVIR-7 a hepatòcits. Els hepatòcits es van infectar a 5 MOI i l'extracte cel·lular es va recollir 5 dies després de la infecció. La quantitat de virus a cada extracte es va determinar pel mètode de la tinció de la proteïna hexó. Les barres d'error +SD s'indiquen a la figura. #, significant ($p < 0,002$) en un test t de Student de dues cues desaparellades, comparat amb el grup Adwt-RGD. *, significant ($p < 0,0004$) en un test t de Student de dues cues desaparellades, comparat amb el grup ICOVIR-7.

Després d'una infecció comparativa amb Adwt-RGD, ICOVIR-5 i ICOVIR-7, es va recollir l'extracte de les seccions 6 dies després de la infecció i se'n va determinar la quantitat de virus produïda. En aquest cas, s'observa com ICOVIR-7 era capaç d'inhibir completament la replicació, ja que la quantitat de virus produïda era similar a la de l'AdTL-RGD, un virus no replicatiu utilitzat com a control (**Figura 16b**). ICOVIR-5 també va ser capaç d'inhibir completament la replicació viral. Com a anàlisi complementari a la determinació de la progènie viral, vàrem incloure les seccions de teixit criopreservat en OCT 6 dies després de la infecció i vàrem realitzar una immunodetecció dels focus de replicació viral utilitzant un anticòs anti-proteïnes de la càpsida adenoviral. Com es pot veure a la **Figura 16c**, tant amb ICOVIR-5 com amb ICOVIR-7 no s'observaven focus de replicació viral en tota la superfície de la secció. En canvi, amb l'Adwt-RGD

sí que s'observava una gran quantitat de focus de replicació. Per tant, en aquest model de toxicitat hepàtica sembla que ICOVIR-7 mantenia l'elevada selectivitat que presenta ICOVIR-5, i calia doncs determinar quin dels dos models de toxicitat hepàtica *in vitro* avaluats és més fiable per concloure si la modificació d'ICOVIR-7 provoca o no una pèrdua de la selectivitat.

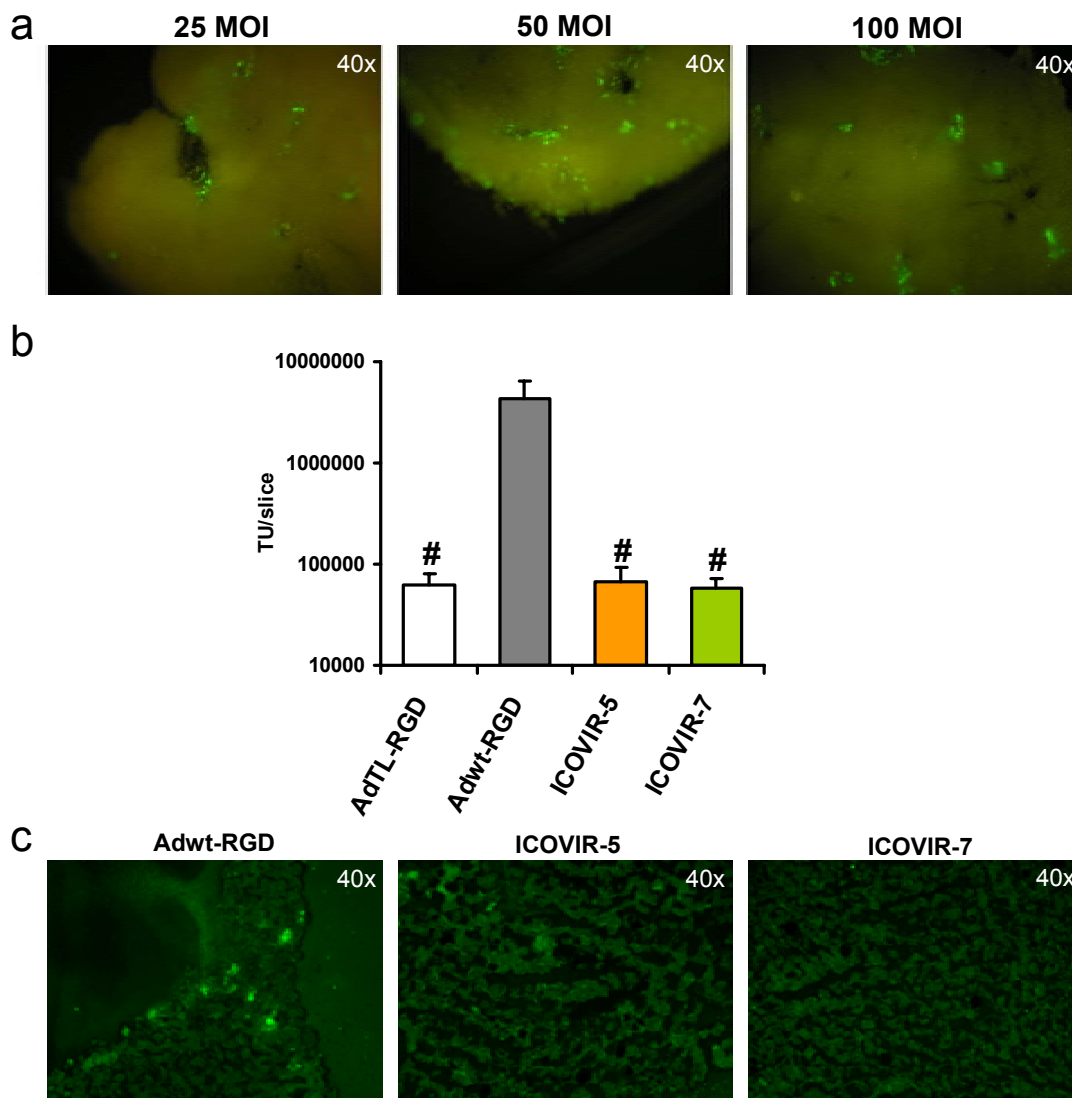


Figura 16. Selectivitat d'ICOVIR-7 a un model de seccions de fetge humà. (a) Assaig d'infektivitat de les seccions de fetge. Les seccions es van infectar amb les MOI indicades amb l'AdTL-RGD i 48 hores després de la infecció se'n va observar la fluorescència (fotografies fetes a 40 augments amb un microscopi de fluorescència). (b) Replicació d'ICOVIR-7 a les seccions de fetge. Les seccions es van infectar a 50 MOI i l'extracte de la secció es va recollir 6 dies després de la infecció. La quantitat de virus a cada extracte es va determinar pel mètode de la tinció de la proteïna hexó. Les barres d'error +SD s'indiquen a la figura. #, significant ($p < 0,002$) en un test t de Student de dues cues desaparellades, comparat amb el grup Adwt-RGD. (c) Immunofluorescència de les seccions per determinar la replicació viral. 6 dies després de la infecció a 50 MOI, es van incloure les seccions en OCT, es van congelar a -80°C i es van tallar tal i com s'indica als materials i mètodes. La immunofluorescència es va realitzar amb un anticòs anti-proteïnes de la càpsida adenoviral i les fotografies es van pendre a 40 augments a un microscopi de fluorescència.

Quan una cèl·lula normal es troba en cultiu, és necessària l'activació de la seva replicació per poder fer-la créixer i amplificar-la. Per fer-la servir com a model de cèl·lula normal, és necessari arrestar-la i aturar la seva replicació. En el nostre cas, l'arrest es va dur a terme per privació del sèrum fetal del medi de cultiu 24 abans de la infecció. Per tal de comprovar si aquesta privació és suficient per l'arrest de les cèl·lules, vàrem detectar per Western-blot dos marcadors de replicació cel·lular (Ki-67 i ciclina E (Mazumder *et al.*, 2004; Bullwinkel *et al.*, 2006)) sobre extractes cel·lulars dels diferents models de cèl·lula normal utilitzats. Tal i com s'observa a la **Figura 17**, la privació de sèrum no era suficient per arrestar els models de cèl·lules HUVEC i d'hepatòcits humans, ja que es van detectar ambdós marcadors de replicació i, per tant, no es poden considerar un bon model de cèl·lula normal quiescent. En canvi, en el model de seccions de fetge humà no es va detectar cap dels dos marcadors, indicant la seva fiabilitat com a model de cèl·lula normal.

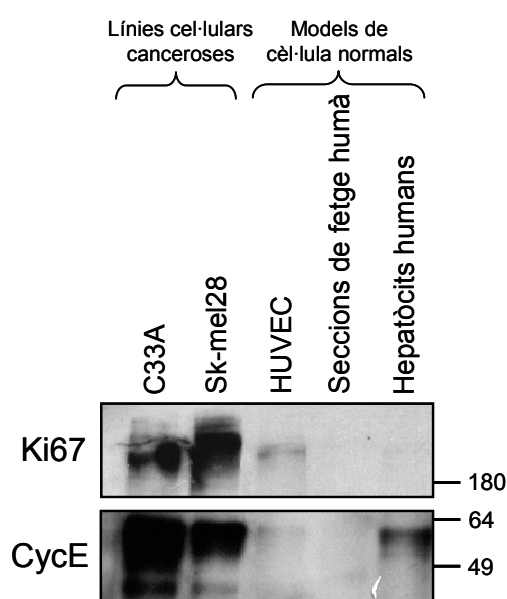


Figura 17. Detecció per Western-blot de marcadors de replicació cel·lular als models de cèl·lula normal. Els extractes cel·lulars dels diferents models es van quantificar i s'hi va immunodetectar els marcadors Ki-67 i ciclina E. A l'esquerra de la imatge es mostren dues línies tumorals com a control positiu de la detecció. A la dreta de la imatge es mostra el marcador de pes molecular, en kDa.

1.2.4. Perfil de toxicitat a ratolins

Per determinar si la modificació del promotor E2F-1 que incorpora ICOVIR-7 manté l'elevada selectivitat *in vivo* que presentava ICOVIR-5, es van injectar sistèmicament ratolins immunocompetents Balb/C amb dosis creixents d'ICOVIR-7 o dels virus control. Els animals es van pesar diàriament i, a dia 5 post-injecció, es van sacrificar per determinar la concentració d'enzims hepàtics en sang (AST i ALT) i els paràmetres hematològics. Per al grup injectat amb

Adwt-RGD, les mostres es van obtenir a dia 3 post-injecció degut a l'elevada toxicitat i mortalitat que presenta aquest virus a aquesta dosi (IC_{50} a dia 4) (Cascallo *et al*, 2007). En canvi, cap animal va presentar signes de toxicitat als grups injectats amb ICOVIR-5 o ICOVIR-7 en cap de les dues dosis administrades.

Primerament, vàrem monitorar el pes dels ratolins després de la injecció dels adenovirus. La injecció d'Adwt-RGD provocà una disminució de pes del 6,5% a dia 3 (**Figures 18a**), amb signes evidents de toxicitat. Pel contrari, la injecció de 5×10^{10} partícules virals d'ICOVIR-5 o d'ICOVIR-7 no va disminuir el pes dels ratolins. Després de l'administració de la dosi més alta dels ICOVIRs, es va observar una lleugera pèrdua de pes que voltava l'1%, però els ratolins no presentaven signes de malestar.

Degut a que s'ha descrit que el dany provocat per l'administració sistèmica d'adenovirus provoca una elevació de transaminases en sang (Aghi and Martuza, 2005), vàrem avaluar les concentracions tant d'AST com d'ALT a la sang dels ratolins. Com es pot veure a la **Figura 18b**, l'administració d'una dosi de 5×10^{10} partícules virals d'Adwt-RGD per ratolí provocà una elevació molt important d'ambdues transaminases, de 60 vegades en AST i de 113 vegades en ALT, respecte el grup tractat amb PBS. En canvi, l'administració de la mateixa dosi d'ICOVIR-7 no va incrementar significativament els nivells d'aquests enzims respecte el grup PBS. Quan es va administrar una dosi superior, de 1×10^{11} partícules virals per ratolí, només es va observar un increment molt discret, de 10 vegades en AST i de 17 vegades en ALT. Si comparàvem aquesta toxicitat amb la causada per ICOVIR-5, vàiem que eren molt similars, no sent significatives les diferències entre ambdós virus.

A més de l'elevació de transaminases, en assajos clínics amb humans també s'ha observat la variació de certs paràmetres sanguinis després de l'administració sistèmica d'adenovirus, com la disminució de la concentració de plaquetes o de limfòcits (Nemunaitis *et al.*, 2001). Als nostres experiments, podíem observar com l'Adwt-RGD a una concentració de 5×10^{10} partícules virals per ratolí provocà una depleció molt important de plaquetes, reduint unes quatre vegades la concentració en sang respecte al grup injectat amb PBS (**Figura 18c**). En canvi, tant amb ICOVIR-5 com amb ICOVIR-7, no es va observar trombocitopènia, ni a 5×10^{10} ni a 1×10^{11} partícules virals per ratolí. Pel que refereix als limfòcits, l'Adwt-RGD va provocar una limfopènia de 2,5 vegades comparat amb el grup PBS, mentre que la injecció d'ICOVIR-5 o d'ICOVIR-7 no va provocar cap efecte en la concentració de limfòcits en sang, amb cap de les dues dosis administrades (**Figura 18d**).

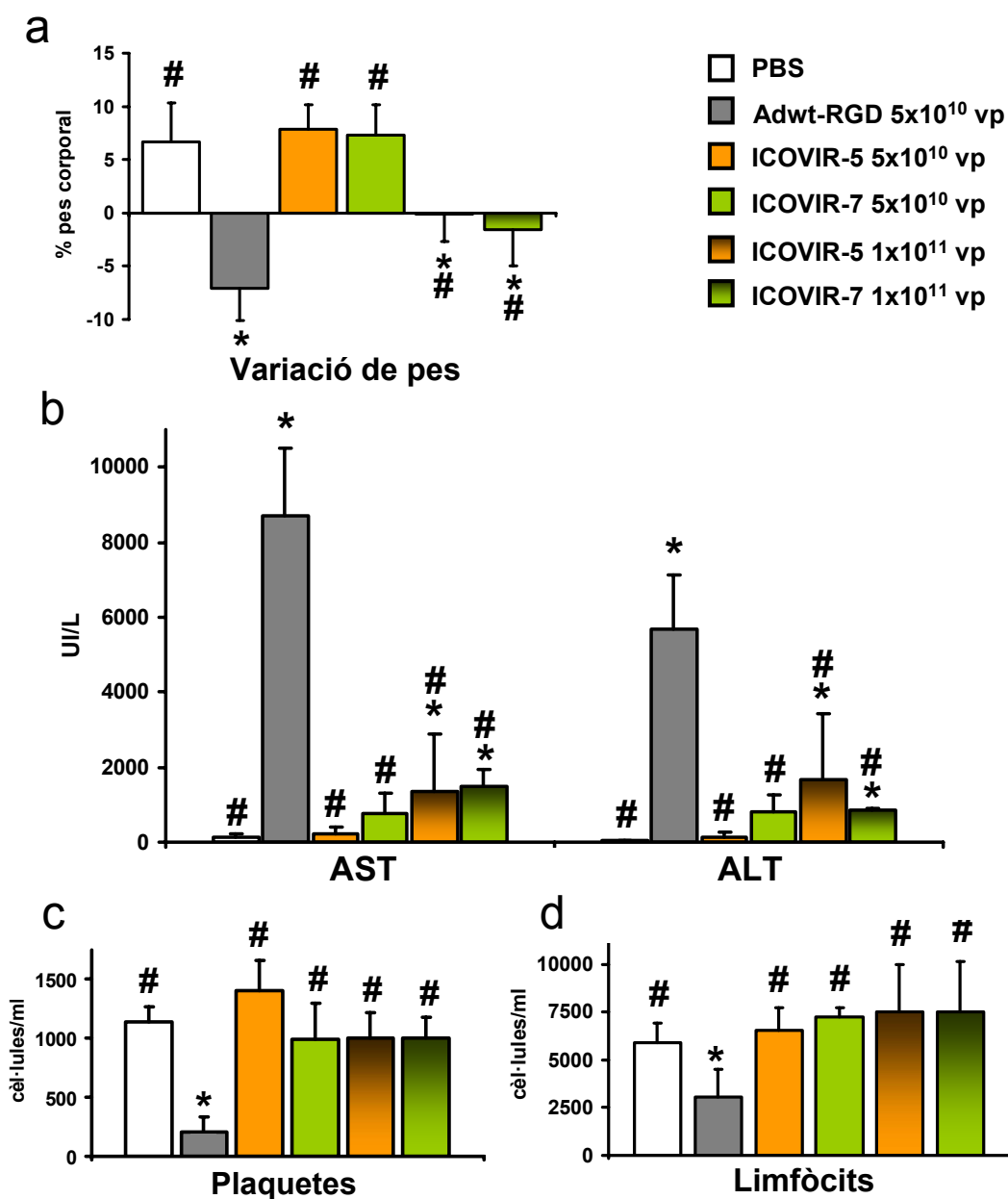


Figura 18. Perfil de toxicitat *in vivo* d'ICOVIR-7. La variació de pes (a), així com la concentració de transaminases del sèrum (b) i de plaquetes (c) i limfòcits (d) en sang, es van determinar a ratolins Balb/C immunocompetents a dia 5 després de la injecció sistèmica de PBS, ICOVIR-5 o ICOVIR-7. Les dades del grup injectat amb Adwt-RGD corresponen a dia 3 post-injecció degut a que la dosi administrada representa més de la LD₅₀ a dia 4. n= 5 ratolins per grup. Les barres d'error +SD s'indiquen a la figura. #, significat (p<0,05) en un test t de Student de dues cues desaparellades, comparat amb el grup Adwt-RGD. *, significat (p<0,05) en un test t de Student de dues cues desaparellades, comparat amb el grup PBS.

A causa de la incapacitat dels adenovirus humans de replicar eficientment a cèl·lules murines, la toxicitat causada al fetge dels ratolins està associada a l'expressió d'E1A (Engler *et al.*, 2004). Per detectar la quantitat d'E1A expressada pels diferents virus als fetges dels ratolins, vàrem realitzar una immunodetecció d'E1A sobre talls de fetges congelats en OCT a dia 3 després de l'administració dels adenovirus. Com es pot observar a la **Figura 19a**, als fetges dels ratolins injectats amb Adwt-RGD es detectà una gran quantitat de proteïna E1A. En canvi, molta poca quantitat de proteïna es detectà als fetges injectats tant amb ICOVIR-5 com amb ICOVIR-7, fins i tot a la dosi de 1×10^{11} partícules virals per ratolí. Complementàriament, vàrem realitzar un anàlisi histològic dels talls de fetge tenyits amb eosina-hematoxilina. Els fetges dels ratolins injectats amb Adwt-RGD presentaven signes evidents de cirrosi degenerativa (macrosteatosi, presència de cossos de Councilman i grans zones de necrosi) (**Figura 19b**). Pel contrari, el parènquima hepàtic dels ratolins injectats amb ICOVIR-5 o ICOVIR-7 presentaven un aspecte similar als injectats amb PBS, amb pocs cossos de Councilman superficials i símptomes de regeneració hepàtica, com cèl·lules en mitosi.

1.3. POTÈNCIA ONCOLÍTICA D'ICOVIR-7

Degut a la doble funció dels llocs d'unió d'E2F, la modificació del promotor E2F-1 introduïda a ICOVIR-7 hauria d'augmentar la potència oncolítica d'ICOVIR-5. Per tal d'avaluar-ho, vàrem testar la capacitat oncolítica d'aquest nou virus en comparació amb la produïda pel seu antecessor en diferents models de potència oncolítica de diferents tipus tumorals, tant *in vitro* com *in vivo*.

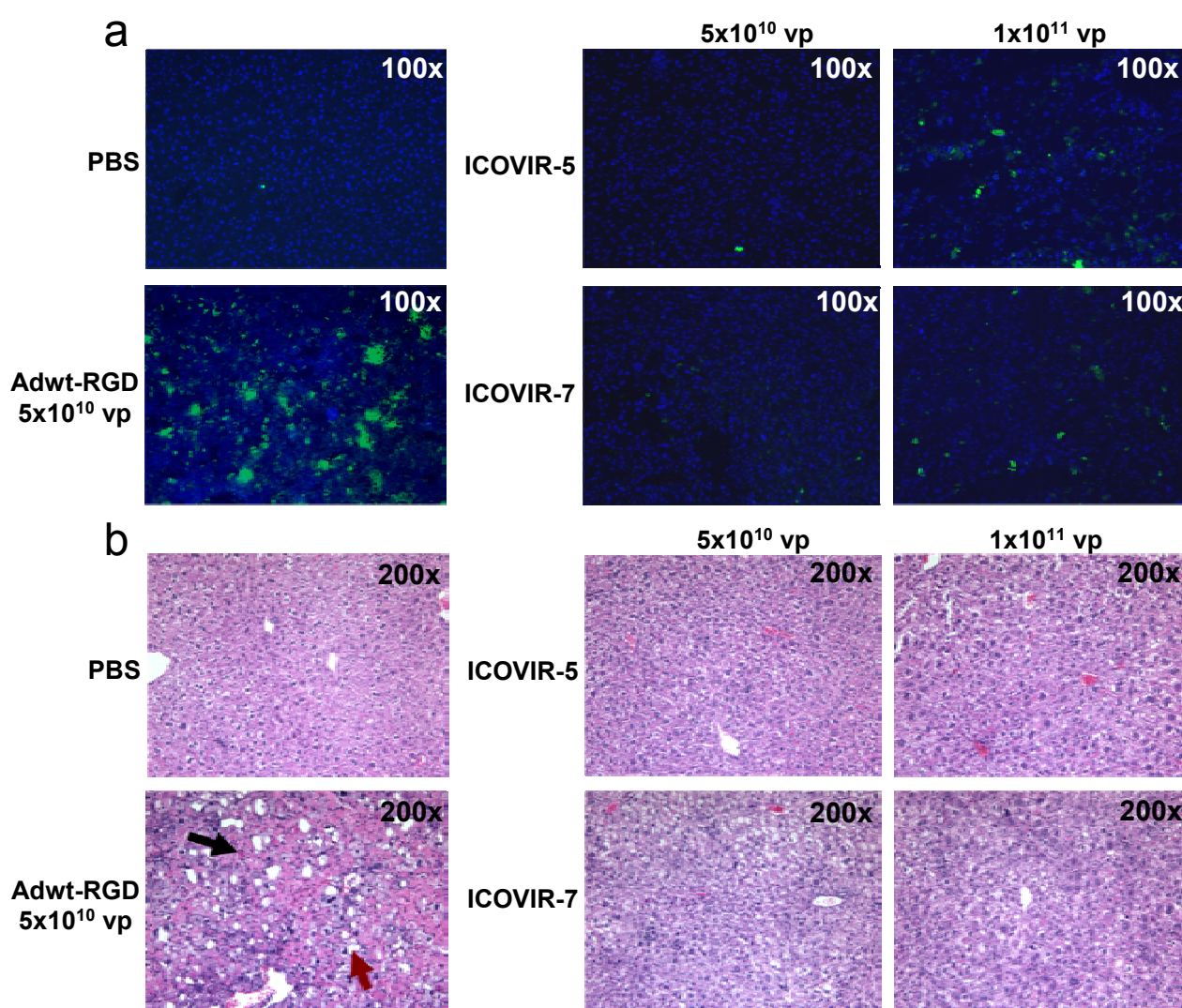


Figura 19. Histologia dels fetges de ratolins injectats amb ICOVIR-7. Es va realitzar una immunodetecció d'E1A sobre talls congelats (a) i una tinció eosina-hematoxilina (b) sobre talls parafinats. Els fetges es van incloure en OCT o parafina a dia 3 post-administració de PBS o dels virus. Els fetges dels ratolins administrats amb Adwt-RGD presentaven una intensa expressió d'E1A que correlacionava amb símptomes de cirrosi degenerativa, com macrosteatosi (fletxa vermella) i grans zones necròtiques amb cossos de Councilman (fletxa negra).

1.3.1. Expressió d'E1A i producció viral a cèl·lules tumorals

Per avaluar si la unió de més factor de transcripció E2F, en associació amb E4-6/7, incrementa l'expressió d'E1A a cèl·lules tumorals, vàrem realitzar una detecció d'E1A per Western-blot 24 hores després de la infecció de diferents línies tumorals amb els diferents adenovirus. Com es pot veure a la **Figura 20a**, ICOVIR-5 presentava certes pèrdues d'expressió en línies com Saos-2, 1.36.1.5 o SCC-25. En canvi, ICOVIR-7 era capaç d'incrementar aquestes

quantitats, expressant E1A a nivells similars a l'Adwt-RGD. Després d'una quantificació densitomètrica de les bandes, es va poder determinar que ICOVIR-7 millorava els nivells d'E1A respecte ICOVIR-5 1,17 vegades a A549, 2,52 vegades a Saos-2, 2,19 vegades a 1.36.1.5 i 3,54 vegades a SCC-25.

Aquest increment dels nivells d'E1A hauria de traduir-se en un increment de la progènie viral produïda per cada cèl·lula tumoral. Per testar-ho, es va analitzar la producció 4 dies després de la infecció a alta MOI d'un ampli ventall de línies tumorals, incloent línies de carcinoma de pulmó, cèrvix, pròstata, còlon i cap i coll, de melanoma i també d'osteosarcoma. En aquest experiment, ICOVIR-7 va ser capaç de millorar significativament la quantitat de virus produïda per cèl·lules tumorals com Sk-mel28, 1.36.1.5, C33A, Saos-2 o Isrec-01 (**Figura 20b**). Malgrat això, la producció encara restava molt allunyada de la de l'Adwt-RGD en certes línies tumorals, sobretot en HCT116, indicant que encara caldria alguna modificació per recuperar la potència oncolítica en tots els tipus i línies tumorals.

1.3.2. Capacitat citotòxica *in vitro*

Addicionalment, la determinació de la citotoxicitat dels diferents virus ens dóna una idea de la capacitat d'aquests per matar cèl·lules tumorals i de propagar-se en diferents cicles de replicació. Així, es van infectar diferents cèl·lules tumorals amb un ampli rang de MOI i a dia 5-8 després de la infecció es va determinar el percentatge de supervivència cel·lular i es va calcular el valor IC_{50} per cada virus i cada línia cel·lular. Com es pot observar a la **Figura 21a**, ICOVIR-7 incrementava la quantitat de cèl·lules tumorals mortes respecte ICOVIR-5 en iguals condicions. Si calculem el valor IC_{50} de cada virus (**Figura 21b**), veiem com ICOVIR-7 millora ICOVIR-5 en totes les línies tumorals, però la seva capacitat citotòxica queda encara molt lluny de la de l'Adwt-RGD en certes línies, com PC-3, NP-18 o Sk-mel28.

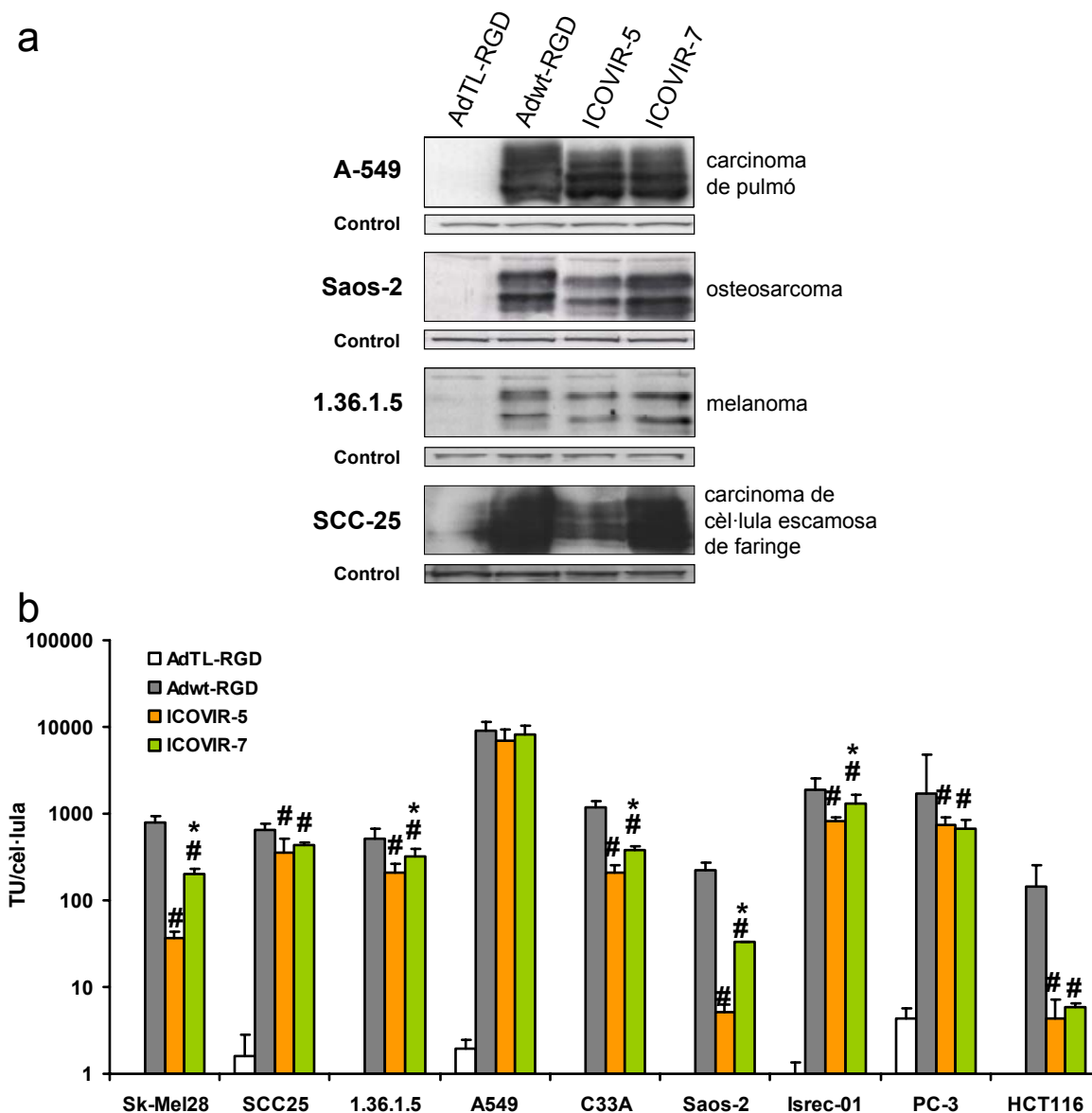
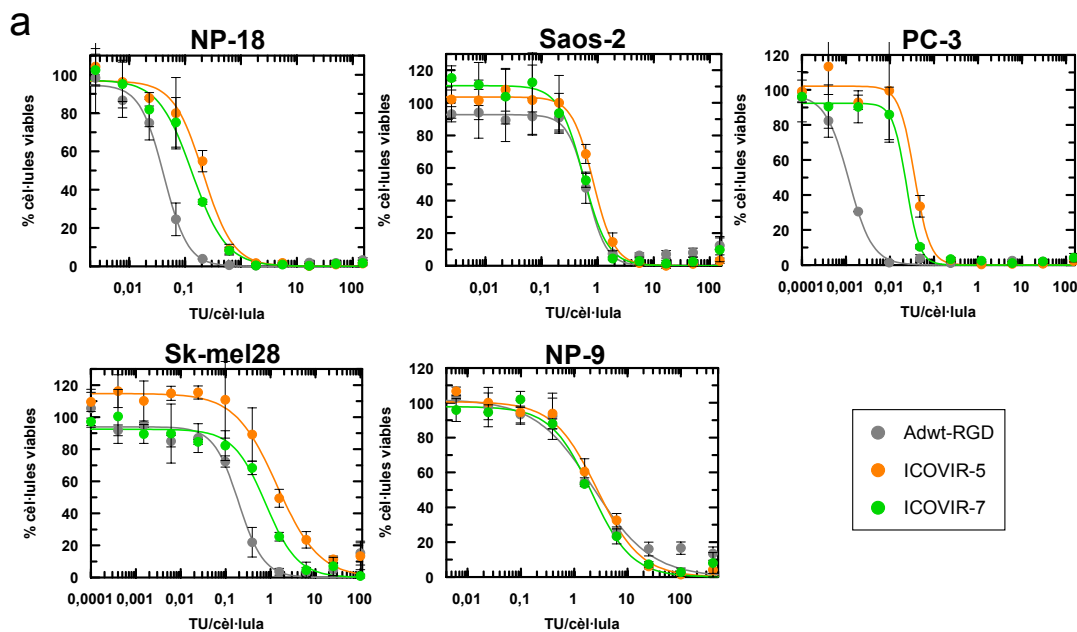


Figura 20. Expressió d'E1A i progènie viral produïda per cèl·lules tumorals infectades amb ICOVIR-7. Un panell de línies tumorals es van infectar amb una MOI que permetés una infecció del 80% de les cèl·lules (40 MOI per SCC-25, 20 MOI per HCT116, Saos-2, Sk-mel28, 1.36.1.5, Isrec-01 i PC-3, i de 10 per A549 i C33A). 24 hores després de la infecció, es va obtenir un lisat proteic i se'n va detectar E1A per Western-blot (a). A dia 4 post-infecció, es va obtenir l'extracte cel·lular de les diferents línies i se'n va titular, pel mètode de tinció de la proteïna hexó, la quantitat de progènie viral produïda per cada virus (b). Les barres d'error +SD s'indiquen a la figura. #, significant ($p < 0,05$) en un test t de Student de dues cues desaparellades, comparat amb el grup Adwt-RGD. *, significant ($p < 0,05$) en un test t de Student de dues cues desaparellades, comparat amb el grup ICOVIR-5.



b

IC ₅₀	Adwt-RGD	ICOVIR-5	ICOVIR-7	Guany ICOVIR-7 vers ICOVIR-5	Pèrdua ICOVIR-7 vers Adwt-RGD
NP-18	0,042 ±0,003	0,212 ±0,024	0,135 ±0,015	x1,57	x3,2
Saos-2	0,65 ±0,08	0,83 ±0,03	0,56 ±0,05	x1,48	x0,86
PC-3	0,0012 ±0,0001	0,036 ±0,006	0,023 ±0,002	x1,57	x19,73
Sk-mel28	0,19 ±0,04	1,39 ±0,23	0,77 ±0,12	x1,8	x4,05
NP-9	2,29 ±0,63	2,68 ±0,34	2,09 ±0,28	x1,28	x0,91

Figura 21. Capacitat citotòxica d'ICOVIR-7. Les línies tumorals NP-18, Saos-2, PC-3, Sk-mel28 i NP-9 van ser infectades amb un rang de dosis des de 150 MOI fins a 0,0001 MOI, depenent de la susceptibilitat de cada línia. Entre els dies 5 i 8 post-infecció es va procedir a la determinació de la viabilitat cel·lular. (a) Corba dosi-resposta en les diferents línies tumorals. Les barres d'error ±SD s'indiquen a cada punt. (b) Taula amb els valors d'IC₅₀ ±SD obtinguts, expressats com TU/cèl·lula necessàries per matar el 50% de les cèl·lules en cultiu. La ràtio entre les IC₅₀ d'ICOVIR-7 i ICOVIR-5 es troba també indicada a la taula.

1.3.3. Efecte antitumoral *in vivo*

Els experiments *in vivo* de potència s'han de realitzar a ratolins immunodeprimits (*nude*) als quals se'ls implanta subcutàniament cèl·lules tumorals humanes degut a la incapacitat dels adenovirus humans de replicar de forma eficient a cèl·lules de ratolí. Per representar un ampli ventall de tipus tumorals, es van triar cèl·lules de les línies C33A (adenocarcinoma de cèrvix), Sk-mel28 (melanoma), NP-18 (adenocarcinoma pancreàtic) i PC-3 (adenocarcinoma de pròstata) per ser implantades als ratolins. Un cop els tumors estaven formats i havien arribat a un volum de 100 mm³, els diferents adenovirus es van injectar sistèmicament per la vena de la cua dels

ratolins. En aquests experiments, no es va testar l'Adwt-RGD ja que la dosi de treball, 5×10^{10} partícules virals per ratolí, provoca la mort d'aquests. Com es pot observar a la **Figura 22a**, el tractament amb ICOVIR-7 va provocar una disminució del creixement dels tumors C33A de 7,3 vegades comparat amb el grup tractat amb PBS. Comparat amb ICOVIR-5, la disminució del creixement va ser de 1,75 vegades, encara que no va resultar significativa. Quan es van tractar els tumors Sk-mel28, la disminució va ser de 2,6 vegades respecte el PBS (**Figura 22b**). Aquest cop, la disminució respecte el grup ICOVIR-5 sí que va resultar significativa, reduint-los 1,7 vegades. En el model de pàncrees (NP-18), ICOVIR-7 també va reduir significativament el creixement dels tumors comparat amb els tractats amb ICOVIR-5 (1,5 vegades) i PBS (2 vegades). Per últim, en els tumors PC-3, un model que presenta grans quantitats de matriu extracel·lular (Ricciardelli *et al.*, 2007), la injecció sistèmica d'ICOVIR-7 no va provocar una reducció del creixement tant important com en els altres models, tot i que va aconseguir reduir-lo 1,7 vegades respecte el grup PBS i 1,2 vegades respecte el grup injectat amb ICOVIR-5 (no significatiu).

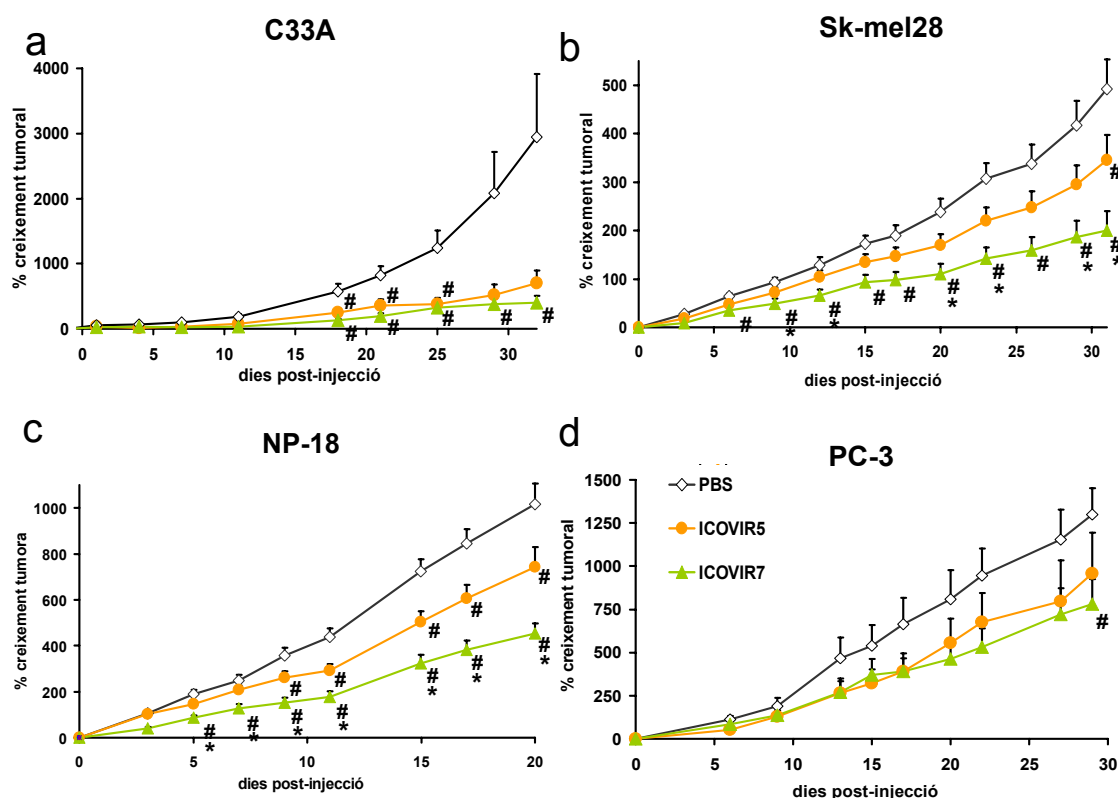


Figura 22. Eficàcia sistèmica antitumoral *in vivo*. Ratolins *nude* amb tumors xenògrafs ($\sim 100 \text{ mm}^3$) de C33A (a), Sk-mel28 (b), NP-18 (c) o PC-3 (d) es van randomitzar i injectar amb una única dosi de PBS, ICOVIR-5 o ICOVIR-7. $n=10-16$ tumors per grup. La dosi injectada és de 1×10^{11} en (a) i de 5×10^{10} partícules virals per ratolí en (b-d). A les gràfiques es mostra el percentatge de creixement tumoral respecte al dia de tractament +SE. #, significant ($p < 0,05$) en un test t de Student de dues cues desaparellades, comparat amb el grup PBS. *, significant ($p < 0,05$) en un test t de Student de dues cues desaparellades, comparat amb el grup ICOVIR-5.

Quan els ratolins van ser sacrificats degut al creixement incontrolat del grup PBS, els tumors es van extreure i es van incloure o bé amb OCT o bé en parafina per detectar la replicació viral dins dels tumors. Als tumors Sk-mel28 criopreservats, s'hi va realitzar una immunohistofluorescència per detectar les proteïnes de la càpsida viral, i es van poder observar focus de replicació de major mida als tumors dels ratolins injectats amb ICOVIR-7 comparat amb els tumors del grup ICOVIR-5 (**Figura 23a**). A més, als tumors C33A se'ls va realitzar una immohistoquímica per detectar també les proteïnes de la càpsida viral. Comparant la tinció amb una eosina-hematoxilina de seccions similars, es va poder observar una certa correspondència de les zones necròtiques amb les zones de replicació viral (**Figura 23b**).

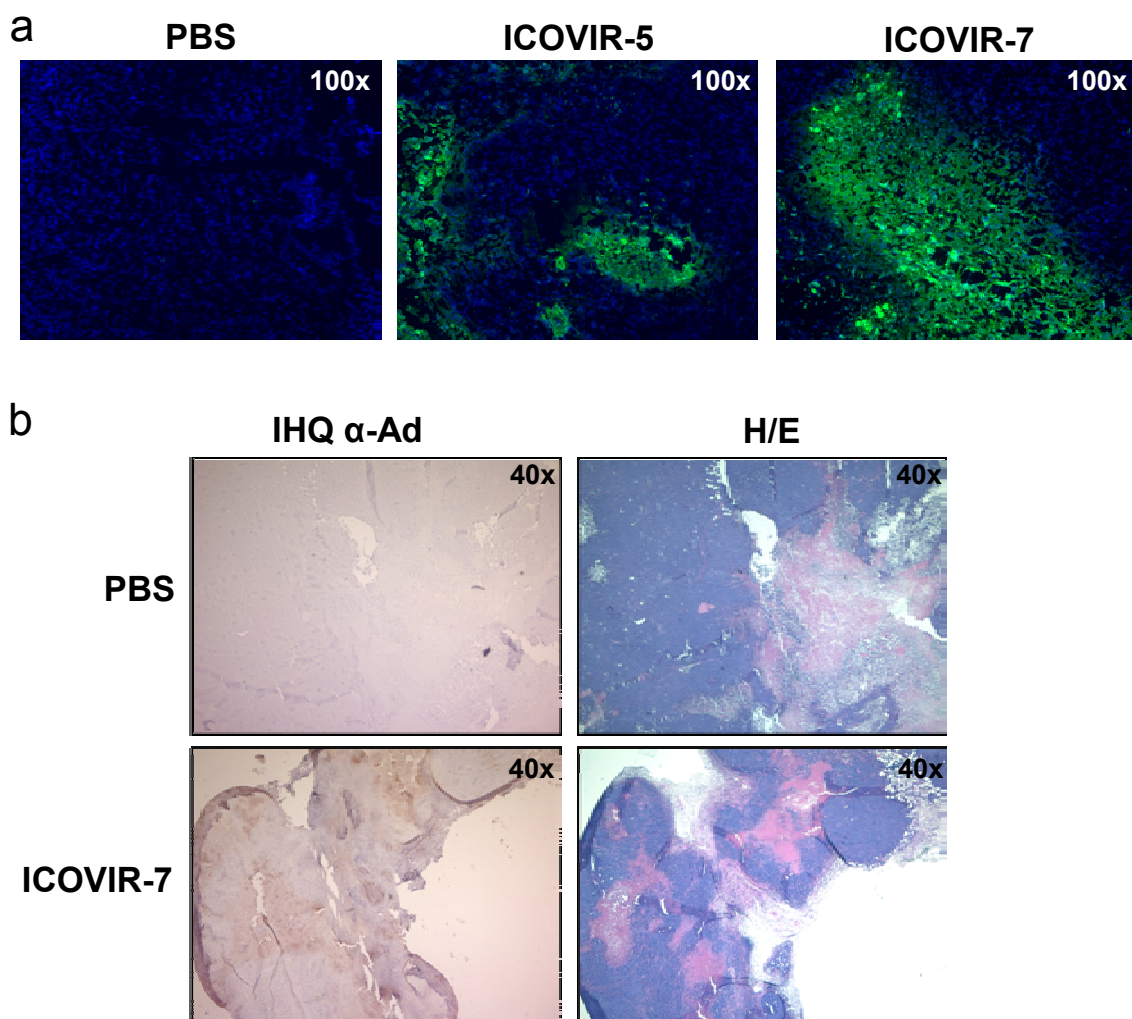


Figura 23. Detecció de la replicació d'ICOVIR-7 dins dels tumors. (a) Immunohistofluorescència contra les càpsides adenovirals sobre talls de tumors Sk-mel28 obtinguts a dia 25 post-injecció. Les tincions es van contratenyir amb 4',6-diamino-2-fenilindol per revelar els nuclis cel·lulars. (b) Immunohistoquímica contra les càpsides adenovirals i tincions eosina-hematoxilina sobre talls de tumors C33A obtinguts a dia 20 després de la injecció.

1.3.4. Supervivència de ratolins amb tumors subcutanis

Finalment, vàrem analitzar la supervivència de ratolins amb tumors subcutanis després de la injecció sistèmica dels adenovirus oncolítics. Com s'observa a la **Figura 24**, el tractament amb ICOVIR-7 va ser capaç d'augmentar significativament la supervivència respecte el grup PBS en tres dels quatre models testats, però la diferència amb el grup tractat amb ICOVIR-5 no va ser en cap model significativa, tot i que resultà molt evident en el model de C33A.

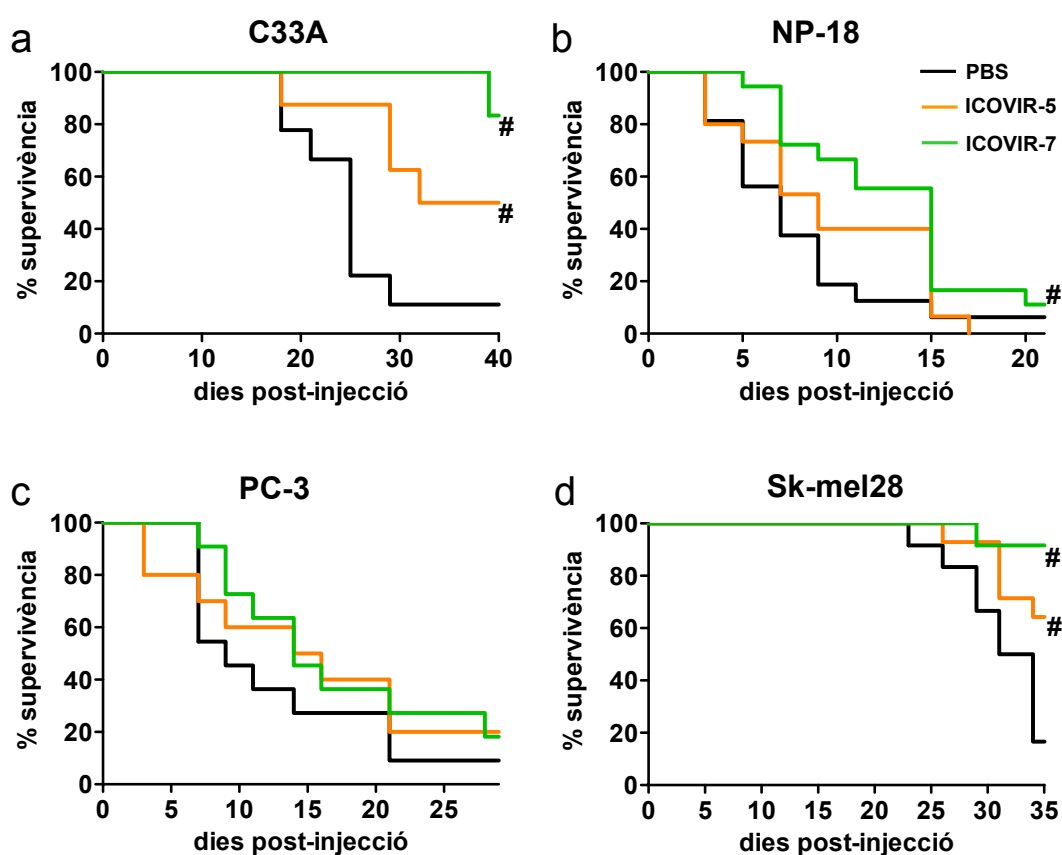


Figura 24. Supervivència dels ratolins tractats amb ICOVIR-7. Corbes Kaplan-Meier de supervivència dels ratolins amb tumors C33A (a), NP-18 (b), PC-3 (c) o Sk-mel28 (d) injectats amb PBS o amb els virus oncolítics. El criteri de punt final es va establir a un volum tumoral de 500 mm³. #, significat ($p < 0,05$) en un test log-rank comparat amb el grup tractat amb PBS.

Malgrat el benefici de potència oncolítica obtingut amb aquest virus, no aconseguim regressions complertes en els models de ratolí. Això és degut, en gran mesura, a que les masses tumorals, a més de cèl·lules canceroses, estan compostades per zones d'estroma tumoral, que inclouen fibroblasts, cèl·lules endotelials i del sistema immune, i components de la matriu com

col·lagen o àcid hialurònic. La presència d'aquestes àrees limita la dispersió del virus pel tumor, especialment si la replicació del virus està limitada a cèl·lules tumorals (Geoerger *et al.*, 2004). La incorporació al genoma de l'adenovirus de transgens que degradin la matriu extracel·lular o ajudin a destruir les barreres de fibroblasts i cèl·lules endotelials és una aproximació que s'ha mostrat molt eficient per poder superar aquestes barreres (Cody and Douglas, 2009). Per evitar que l'efecte d'aquests transgens influeixi en el cicle viral, la millor opció és introduir-los sota el control del promotor major tardà, de tal manera que l'expressió del transgen es produeix quan el virus ja s'ha replicat i els efectes sobre el cicle viral són mínims. El genoma d'ICOVIR-7, en principi, sembla una bona estructura per incorporar-hi aquests transgens degut al control tan estricte que exerceix sobre E1A. Ja que l'expressió tardana està subjugada a l'expressió d'E1A, la incorporació d'un transgen que s'expressés en la fase tardana d'ICOVIR-7 no influiria en el cicle viral i no provocaria toxicitat a les cèl·lules normals. Malgrat això, la capacitat d'encapsidació dels adenovirus està limitada al 105% del genoma de l'adenovirus salvatge (Bett *et al.*, 1993), i les modificacions que incorpora ICOVIR-7 eleven la mida del seu genoma a 37053 pb, molt a prop del límit del 105%.

En resum, els nostres resultats indiquen que ICOVIR-7 millora la potència oncolítica respecte al seu antecessor, ICOVIR-5, i en manté la seva baixa toxicitat després de l'administració sistèmica. Degut a la gran mida del seu genoma, però, no s'hi pot incorporar transgens que serien molt útils per ajudar a l'eradicació dels tumors; per tant, calia buscar una nova modificació del promotor que controla E1A que conferís una elevada selectivitat i potència oncolítica, però que suposés un augment mínim en la mida del genoma per poder incorporar-hi transgens sense afectar a l'encapsidació i a la replicació del virus.

2. INSERCIÓ DE LLOCS D'UNIÓ DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓ E2F-1 AL PROMOTOR ENDOGEN D'E1A

2.1. CONSTRUCCIÓ DE L'ADENOVIRUS RECOMBINANT ICOVIR-15

Seguint la direcció d'ICOVIR-5 i d'ICOVIR-7 de condicionar la replicació del virus a la desregulació de la via de RB, i per seguir aprofitant el potent bucle d'autoactivació que es genera entre els llocs palindròmics d'E2F controlant E1A i entre E4-6/7, al nostre grup vàrem construir ICOVIR-15. ICOVIR-15 és un adenovirus oncolític derivat de l'Ad Δ 24-RGD que incorpora, darrera de la senyal d'encapsidació, vuit llocs d'unió d'E2F organitzats en quatre palíndroms imperfectes. A més, també s'hi va incorporar un lloc d'unió de Sp-1 degut a que s'ha descrit que ambdós factors interactuen per activar cooperativament la transcripció (Karlseder *et al.*, 1996). A la **Figura 25** es pot veure un esquema dels diferents factors de transcripció que s'uneixen al promotor d'E1A de l'adenovirus salvatge i d'ICOVIR-15. Tal i com passava amb el promotor modificat d'ICOVIR-7, la unió d'E2F lliure als nous llocs d'unió activaria la transcripció d'E1A a cèl·lules tumorals. E1A, a la vegada, activaria totes les altres proteïnes virals, incloent E4-6/7, que forma un complex amb l'E2F lliure i s'uneix de forma activa als palíndroms presents al promotor d'E1A i d'E2, iniciant la replicació del virus i la lisi de la cèl·lula tumoral. En canvi, a cèl·lules quiescents, la unió de complexos E2F-pRB-HDAC als palíndroms hauria d'inhibir la transcripció d'E1A i la replicació viral. També en aquest cas, la presència de la deleció Δ 24 a E1A evitaria la disrupció dels complexos E2F-pRB en cas de que hi hagués certs nivells d'expressió basal del promotor. A diferència de la modificació d'ICOVIR-7, en aquest cas modifiquem el promotor endogen d'E1A i no afegim un promotor forà, de tal manera que no cal l'aïllament d'aquest, i ens estalviem el pes molecular que suposa el promotor i l'aïllant gènic. El resultat final és que amb aquesta modificació només augmentem en 151 pb el pes molecular del genoma de l'Ad5 natiu. Aquest genoma ens hauria de permetre incorporar-hi transgens sense afectació de la replicació viral i de la potència oncolítica. A més, aquesta modificació preserva l'estructura original del genoma adenoviral i manté la funció dels *enhancers* d'E1A d'activar totes les proteïnes virals en *cis*, fet que pot ser transcendental per aconseguir una replicació selectiva eficient a la cèl·lula tumoral sense afectar la potència oncolítica.

Un cop vàrem tenir el virus construït, ben caracteritzat, amplificat i purificat, vàrem determinar si els llocs d'unió d'E2F realitzaven la seva funció dins del promotor endogen d'E1A. Amb aquest objectiu, vàrem realitzar diversos experiments, tant *in vitro* com *in vivo*, per

comparar la toxicitat i potència antitumoral d'aquest virus en comparació amb ICOVIR-7 i Adwt-RGD.

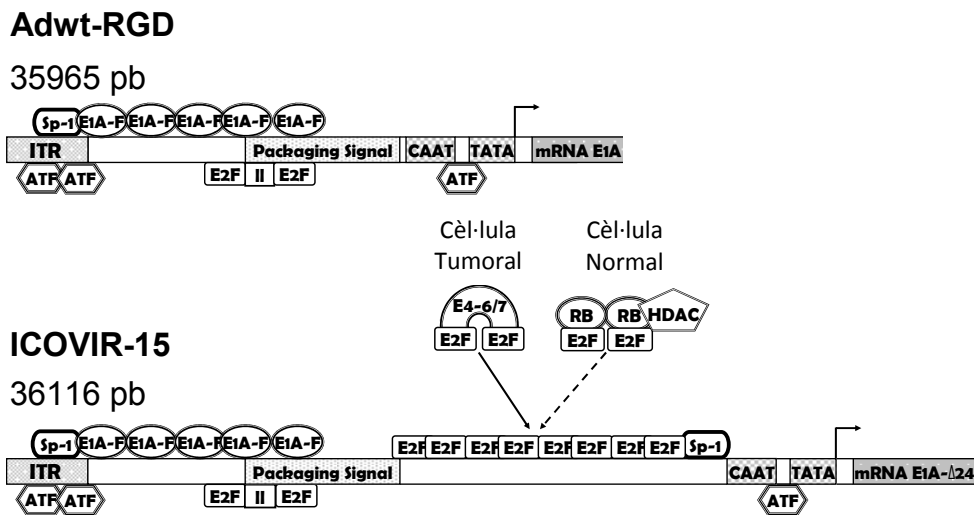


Figura 25. Representació esquemàtica del control transcripcional d'E1A per part d'ICOVIR-15. ICOVIR-15, a més dels factors de transcripció que controlen la transcripció d'E1A en l'adenovirus salvatge, incorpora vuit llocs d'unió d'E2F organitzats en quatre palíndroms imperfectes. A més, incorpora un lloc extra d'unió de Sp-1 darrera dels palíndroms. En funció de si es tracta d'una cèl·lula normal o tumoral, la unió de diferents complexos als nous llocs d'unió reprimeix o activa la transcripció. A la figura, a més, s'indiquen els pesos moleculars d'ambdós genomes.

2.2. TOXICITAT D'ICOVIR-15

2.2.1. Perfil de toxicitat a ratolins

Tal i com s'explicarà en l'apartat de la discussió, la selectivitat d'ICOVIR-15 només es va poder testar en models *in vivo*. Per determinar si la modificació del promotor d'E1A que incorpora ICOVIR-15 redueix la toxicitat causada després de l'administració sistèmica d'adenovirus salvatges, es va injectar sistèmicament una dosi de 5×10^{10} partícules virals per ratolí d'Adwt-RGD i d'ICOVIR-15 a ratolins immunocompetents Balb/C. A més, es va incloure ICOVIR-7 als experiments per determinar si la reducció de toxicitat aconseguida amb ICOVIR-15 és comparable amb l'aconseguida amb ICOVIR-7. Els animals es van pesar diàriament i, a dia 4 post-injecció, es van sacrificar per determinar la concentració d'enzims hepàtics en sang (AST i ALT) i els paràmetres hematològics. En aquest cas, a més, es van determinar aquests mateixos paràmetres a dia 12 per monitorar la recuperació després de l'administració. Per al grup injectat

amb Adwt-RGD, les mostres només es van obtenir a dia 4 post-injecció degut a l'elevada toxicitat i mortalitat que presenta aquest virus, que produeix una disminució de pes de més del 12% abans de ser sacrificats a dia 4 (**Figura 26a**). Pel contrari, tant els ratolins injectats amb ICOVIR-15 com amb ICOVIR-7 no van presentar signes de toxicitat i van experimentar una evolució de pes molt semblant a la dels ratolins injectats amb PBS, amb només una lleugera pèrdua de pes de l'1% (no significativa) a dia 3 en el grup injectat amb ICOVIR-15.

Tal i com es va realitzar als experiments de toxicitat amb ICOVIR-7, vàrem analitzar les transaminases (AST i ALT) en la sang dels ratolins, ja que el seu augment està descrit com una de les conseqüències més greus de l'administració sistèmica d'adenovirus (Nemunaitis *et al.*, 2001; Aghi and Martuza, 2005). Els ratolins injectats amb Adwt-RGD presentaven una elevació de més de 65 vegades en els nivells d'AST i d'ALT respecte el grup tractat amb PBS (**Figura 26b**). En canvi, als animals injectats amb ICOVIR-15, només es va poder detectar una lleugera elevació transitòria: a dia 4 després de l'administració, vàrem detectar una elevació no significativa de 7 vegades en els nivells d'AST respecte el grup PBS, i d'11 vegades en els nivells d'ALT, però aquest nivells es reduïen fins al nivell del grup PBS quan els analitzàvem a dia 12 post-injecció. Si comparàvem aquest nivells amb els produïts per la injecció d'ICOVIR-7 a dia 4, es podia observar com els nivells de transaminases estaven lleugerament més elevats en el grup ICOVIR-15 (2,5 vegades en AST i 2,9 vegades en ALT), tot i que les diferències no eren significatives. En canvi, sembla que els ratolins injectats amb ICOVIR-15 experimentaven una recuperació més ràpida respecte els injectats amb ICOVIR-7, ja que els nivells detectats a dia 12 eren significativament més baixos amb ICOVIR-15 (2,3 vegades en AST i 12,9 vegades en ALT).

Pel que refereix a la concentració de plaquetes en sang, mentre que el grup injectat amb Adwt-RGD presentava una seriosa trombocitopènia de 5 vegades respecte el grup injectat amb PBS, els ratolins injectats amb ICOVIR-15 només presentaven una reducció no significativa d'1,5 vegades a dia 4 i una concentració normal a dia 12 (**Figura 26c**). Altra vegada, comparant amb els nivells de plaquetes del grup ICOVIR-7, sembla que ICOVIR-15 produïa un lleuger augment de la toxicitat a temps curts, però els ratolins experimentaven una recuperació més ràpida, tot i que les diferències entre aquests dos grups no eren significatives.

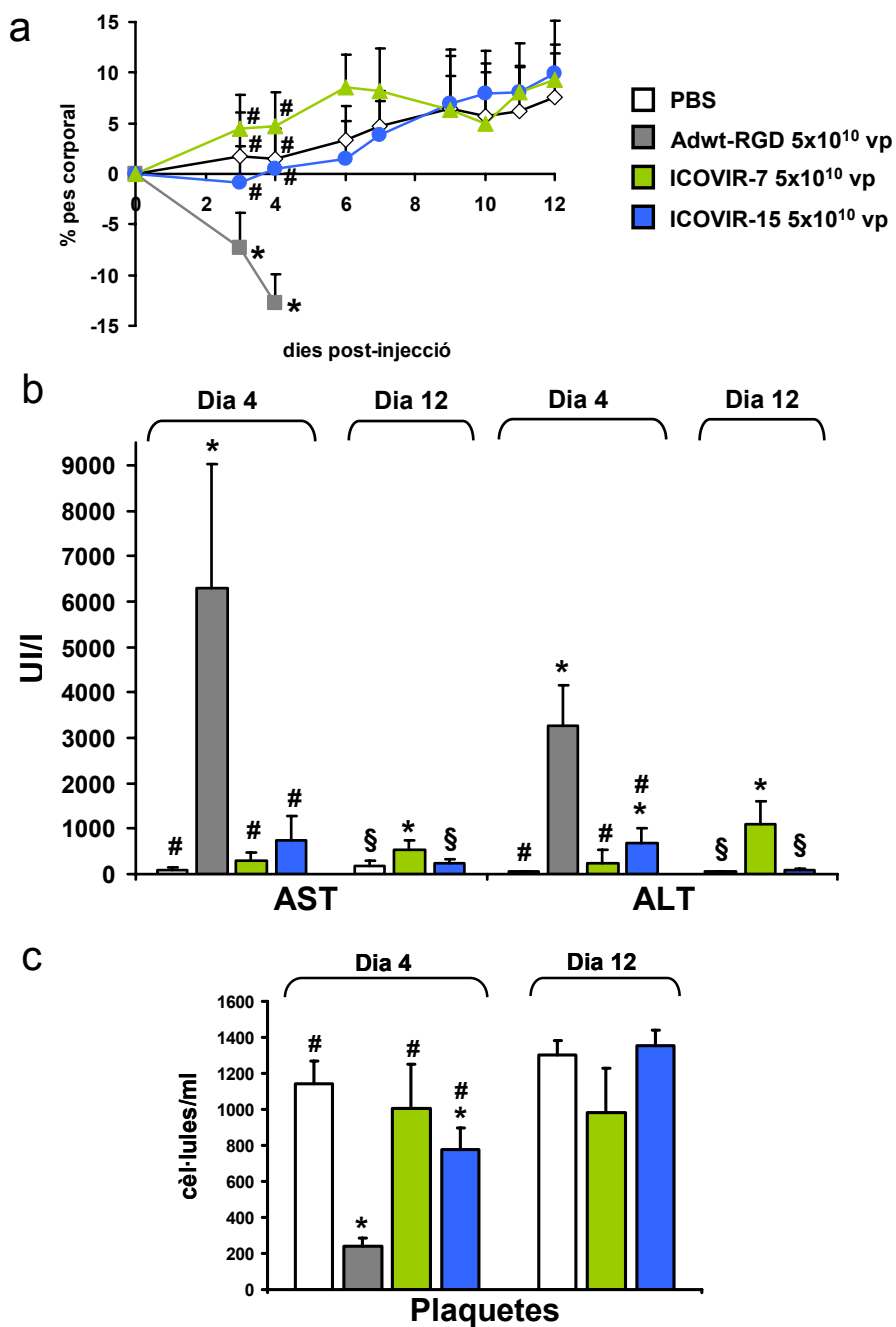


Figura 26. Perfil de toxicitat d'ICOVIR-15 a ratolins. La variació del pes (a), així com les concentracions de transaminases del sèrum (b) i plaquetes en sang (b) es van determinar a ratolins Balb/C immunocompetents a dia 4 i 12 després de la injecció sistèmica de PBS, Adwt-RGD, ICOVIR-7 o ICOVIR-15. Les dades del grup injectat amb Adwt-RGD es mostren únicament a dia 4 post-injecció degut a que la dosi administrada representa més de la LD₅₀ a dia 4. n= 5-10 ratolins per grup. Les barres d'error +SD s'indiquen a la figura. #, significat (p<0,05) en un test t de Student de dues cues desaparellades, comparat amb el grup Adwt-RGD. *, significat (p<0,05) en un test t de Student de dues cues desaparellades, comparat amb el grup PBS. §, significat (p<0,05) en un test t de Student de dues cues desaparellades, comparat amb el grup ICOVIR-7.

A més, es va avaluar l'expressió d'E1A als fetges murins a través d'una immunodetecció sobre talls congelats, ja que aquesta expressió és la causa més important de la toxicitat a ratolins (Engler *et al.*, 2004). Quatre dies després de tractar els ratolins amb Adwt-RGD, els fetges presentaven quantitats molt importants d'E1A. En canvi, la immunotinció detectada als fetges dels ratolins tractats amb ICOVIR-15 era molt similar a la dels ratolins tractats amb ICOVIR-7, sent aquesta gairebé nul·la (**Figura 27a**). Aquests resultats es correlacionaven amb un anàlisi histològic dels talls de fetge tenyits amb eosina-hematoxilina. Mentre que els fetges dels ratolins injectats amb Adwt-RGD presenten signes evidents de cirrosi degenerativa (macrosteatosi, presència de cossos de Councilman i grans zones de necrosi), els fetges dels ratolins injectats amb ICOVIR-15 o ICOVIR-7 presentaven un fenotip pràcticament normal, amb només símptomes lleus d'inflamació i regeneració (**Figura 27b**).

2.2.2. Perfil de toxicitat a hámsters

Per complementar els resultats obtinguts en el model de ratolí, vàrem testar també la selectivitat d'ICOVIR-15 a hámsters. El model de hámster siri o daurat (*Mesocricetus auratus*) va ser descrit com a semi-permissiu per a la replicació de l'adenovirus humà als anys 80 (Hjorth *et al.*, 1988). Durant la realització d'aquesta tesi, però, es va començar a utilitzar aquest model en diferents estudis dins del camp de la viroteràpia del càncer amb adenovirus com una eina important per avaluar la toxicitat associada a la replicació del virus, ja que en el model de ratolí només s'observa la toxicitat associada a l'expressió d'E1A (Thomas *et al.*, 2006; Lichtenstein *et al.*, 2009; Ying *et al.*, 2009). En el nostre grup, vàrem determinar la dosi mínima necessària a administrar en hámsters perquè arribes una quantitat raonable de virus als tumors. Aquesta dosi va quedar establerta en 4×10^{11} partícules virals per hámster (resultats no publicats, tesi doctoral Juan Miguel Camacho). Partint d'aquesta dosi, doncs, vàrem injectar sistèmicament ICOVIR-15 a hámsters siris per determinar, a dia 5 post-administració, paràmetres com la reducció de pes, la concentració de transaminases en sang (AST i ALT) o la trombocitopènia. Com a grups control, vàrem incloure hámsters injectats amb PBS i hámsters injectats amb Adwt-RGD per determinar la toxicitat global d'aquesta dosi amb adenovirus de replicació no controlada. A més, vàrem incloure un grup injectat amb Adwt-RGD que havia estat inactivat amb Psolaren i llum ultraviolada per tal d'avaluar la toxicitat associada a la càpsida viral.

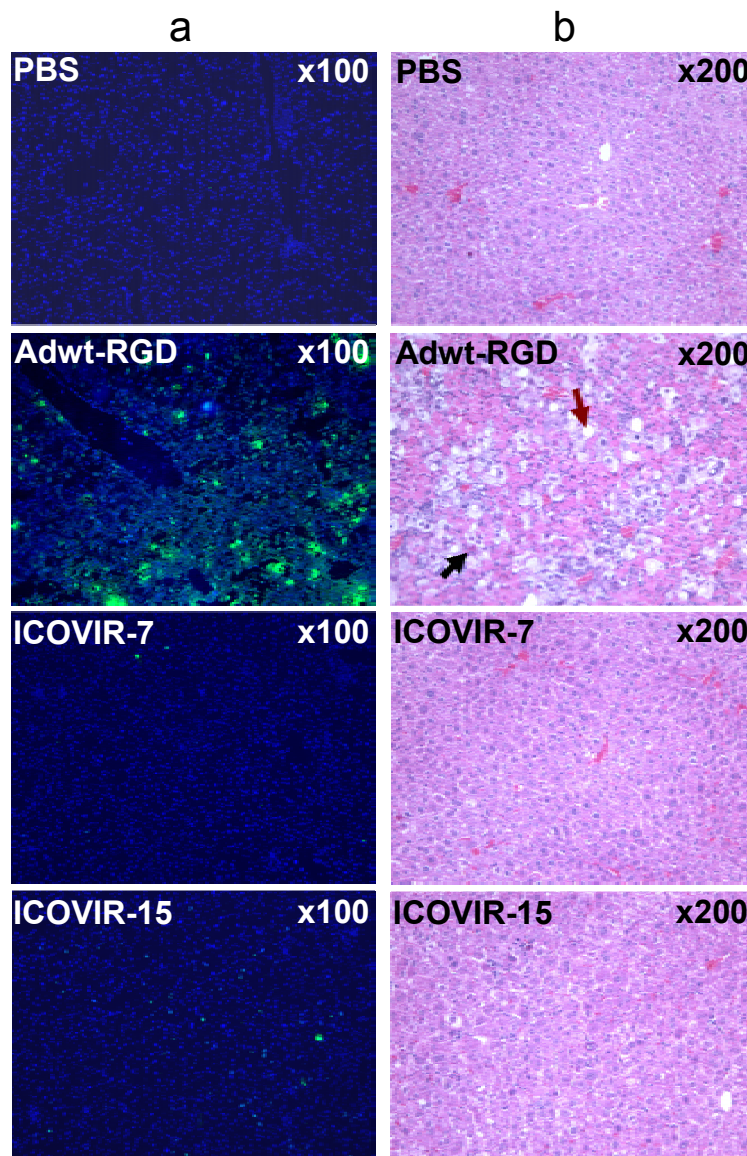


Figura 27. Histologia dels fetges de ratolins injectats amb ICOVIR-15. (a) Immunodetecció d'E1A sobre talls congelats de fetges inclosos en OCT a dia 4 post-administració de PBS o 5×10^{10} partícules virals per ratolí. (b) Tinció eosina-hematoxilina sobre talls parafinats de fetges obtinguts també a dia 4 post-injecció. Els fetges dels ratolins administrats amb Adwt-RGD presentaven una intensa expressió d'E1A que correlacionava amb símptomes de cirrosi degenerativa, com macrosteatosi (fletxa vermella) i grans zones necròtiques amb cossos de Councilman (fletxa negra).

A dia 3 després de l'administració sistèmica dels virus, el grup injectat amb Adwt-RGD es va sacrificar degut a que els animals mostraven símptomes evidents de toxicitat, amb una pèrdua mitja de pes del 9% (**Figura 28a**). Els hàrmsters administrats amb ICOVIR-15, tot i mostrar una pèrdua de pes de més del 5% de mitja a dia 3, no mostraven un aspecte general de malestar i es van sacrificar a dia 5, tal i com estava previst, mostrant una recuperació del pes fins un 3% de

pèrdua respecte el dia inicial d'injecció. La similitud de pèrdua de pes a dia 3 entre el grup ICOVIR-15 i el grup injectat amb adenovirus salvatge inactivat ens indicava que, segurament, la pèrdua de pes observada es devia a una toxicitat associada a la càpsida, i que no es podia evitar amb el control transcripcional d'E1A.

Després del sacrifici dels animals, vàrem determinar les transaminases en el sèrum i la concentració de plaquetes en sang. Tal i com s'observa a la **Figura 28b**, l'administració d'Adwt-RGD va causar una elevació molt important tan d'AST com d'ALT respecte el grup PBS, de 300 i 380 vegades, respectivament. Per la seva banda, l'administració d'ICOVIR-15 va provocar una elevació d'AST de 15 vegades i d'ALT de 20 vegades, molt allunyada de la toxicitat de l'Adwt-RGD, però molt semblant a la provocada pel mateix virus inactivat. A més, l'Adwt-RGD va provocar una trombocitopènia molt important, de 13 vegades respecte el PBS (**Figura 28c**). Les concentracions de plaquetes entre l'adenovirus salvatge actiu i inactivat eren molt semblants, suggerint que la depleció de plaquetes en el hámster està associada a la càpsida viral. Al grup ICOVIR-15, es va observar un increment significatiu de la concentració de plaquetes respecte l'Adwt-RGD, però, sent les dades a dia 5, ens podria estar indicant una recuperació en el temps independent de l'expressió d'E1A.

Per corroborar que ICOVIR-15 reprimeix la transcripció d'E1A als fetges dels hámsters, es va realitzar una immunodetecció sobre talls dels fetges congelats en OCT. Tal i com succeeix a ratolins, només es detecta alguna cèl·lula aïllada positiva als fetges dels hámsters injectats amb ICOVIR-15, a diferència dels fetges dels hámsters injectats amb Adwt-RGD, on es detecten moltes cèl·lules positives per E1A (**Figura 29**), indicant que la modificació del promotor endogen d'E1A present a ICOVIR-15 és capaç de reprimir eficientment la transcripció i, probablement, evitar la replicació del virus a cèl·lules normals.

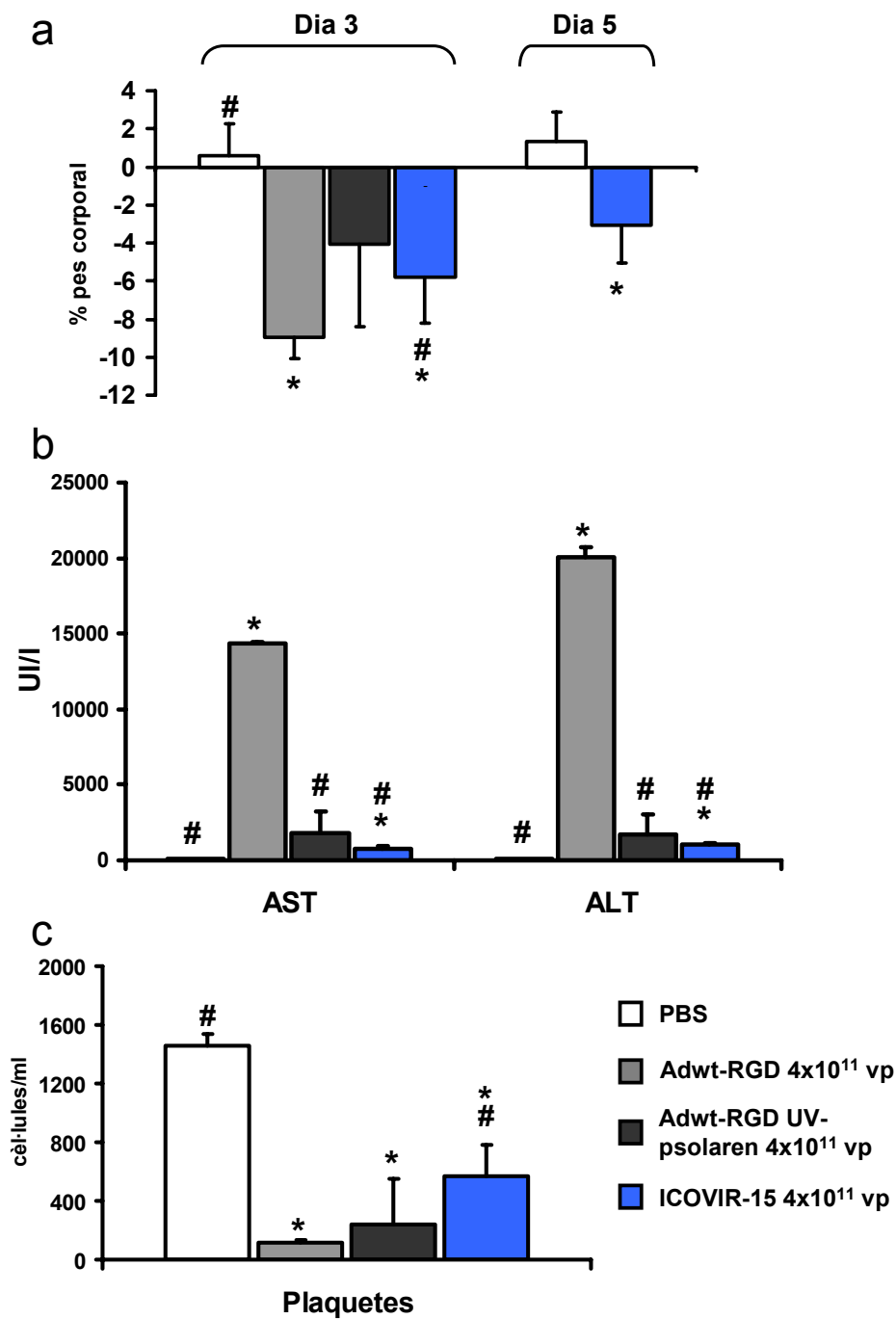


Figura 28. Perfil de toxicitat d'ICOVIR-15 a hámsters. La variació del pes (a), així com les concentracions de transaminases en sèrum (b) i plaquetes en sang (c) es van determinar a hámsters siris 5 dies després de la injecció sistèmica de PBS, Adwt-RGD, Adwt-RGD inactivat amb p-solaren i llum ultraviolada o ICOVIR-15. Les dades del grups injectats amb Adwt-RGD, actiu o inactivat, corresponen al dia 3 després de la injecció degut a una elevada toxicitat. n= 5 hámsters per grup. Les barres d'error +SD s'indiquen a la figura. #, significat ($p<0,05$) en un test t de Student de dues cues desaparellades, comparat amb el grup Adwt-RGD. *, significat ($p<0,05$) en un test t de Student de dues cues desaparellades, comparat amb el grup PBS.

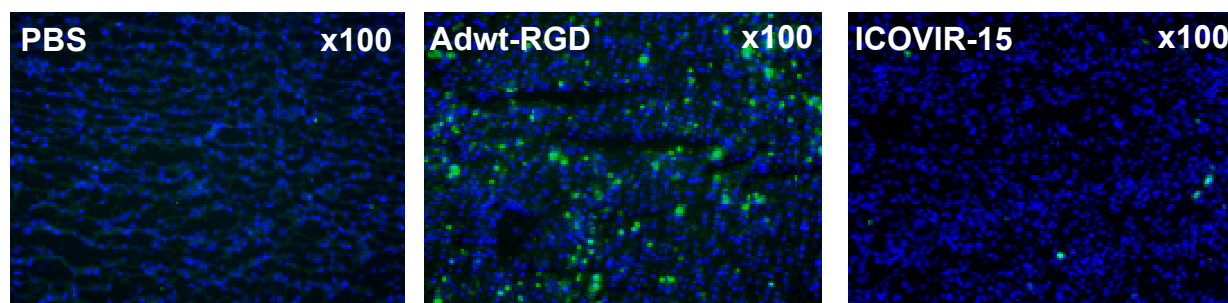


Figura 29. Immunodetecció d'E1A a fetges de hámsters injectats amb ICOVIR-15. Hámsters siris van ser injectats amb PBS o 4×10^{11} partícules virals per hámsters d'Adwt-RGD o ICOVIR-15. Els fetges del grup Adwt-RGD es van obtenir a dia 3 degut a una elevada toxicitat, mentre que els fetges dels grups PBS i ICOVIR-15 corresponen a dia 5 post-administració.

2.3. POTÈNCIA ONCOLÍTICA D'ICOVIR-15

Un cop comprovat que la inserció de llocs E2F al promotor endogen d'E1A confereix selectivitat, vàrem realitzar diferents assajos per determinar si aquesta mateixa modificació també repercuteix de forma positiva en la replicació i potència del virus a cèl·lules tumorals o si, pel contrari, la modificació del promotor trunca la seva funció i la transcripció d'E1A se'n veu afectada. Els assajos realitzats són molt semblants als realitzats amb el seu antecessor ICOVIR-7 i inclouen Western-blots d'E1A a cèl·lules tumorals, assajos de producció viral i de citotoxicitat, i una àmplia varietat de models tumorals en ratolins immunodeprimits, tant de creixement tumoral com de supervivència.

2.3.1. Expressió d'E1A i producció viral a cèl·lules tumorals

Per avaluar si els llocs d'unió d'E2F augmenten la quantitat d'E1A produïda, vàrem analitzar per Western-blot l'expressió d'aquesta proteïna viral 24 hores després d'una infecció normalitzada de cèl·lules tumorals. Com s'observa a la **Figura 30a**, els nivells d'E1A es veuen augmentats 1,8 i 4 vegades a cèl·lules A549 i Sk-mel28, respectivament, respecte l'adenovirus salvatge. Si comparem amb ICOVIR-7, a A549 les diferències no són molt notables (1,7 vegades), però a Sk-mel28 la millora d'expressió és molt important, de 20 vegades.

Si bé no esperàvem un increment de la replicació per sobre del nivell de l'Adwt-RGD, nivells més elevats d'E1A a cèl·lules tumorals podrien promoure un bucle d'autoactivació positiu

que podria culminar en una producció més elevada de virus. Després de la infecció d'un panell de línies tumorals, vàrem observar com ICOVIR-15 millorava significativament la quantitat de virus produïda per cada cèl·lula tumoral a les línies A549 i Sk-mel28, respecte l'Adwt-RGD, mentre que a les altres tres línies testades s'observava certa tendència a la millora (**Figura 30b**). Quan la comparació es fa amb ICOVIR-7, ICOVIR-15 era capaç de millorar la producció a totes les línies canceroses, maximitzant-se aquesta diferència a la línia de càncer de còlon HCT-116, sent la millora de 142 vegades.

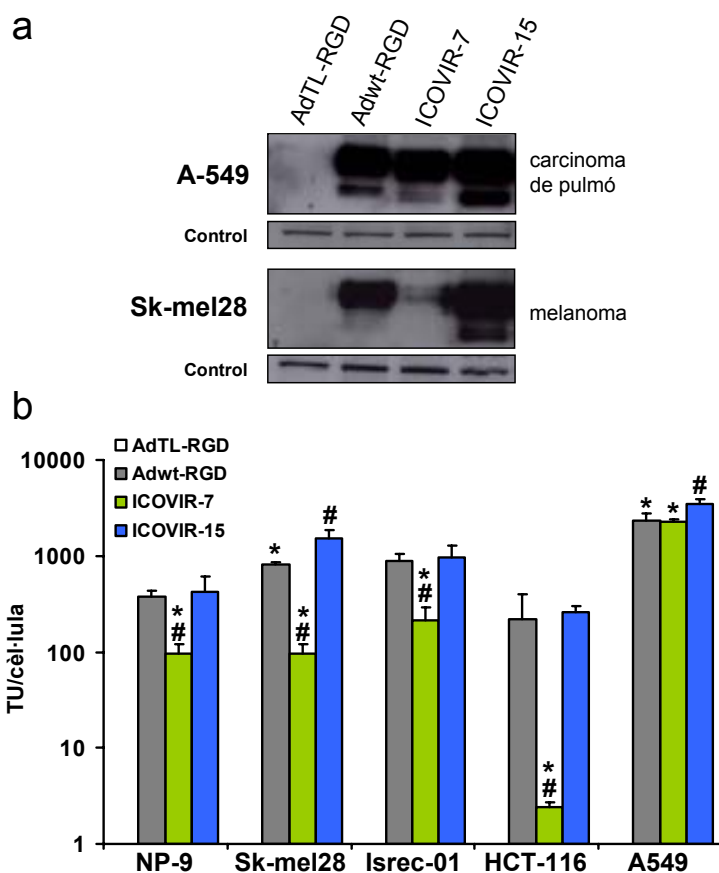


Figura 30. Expressió d'E1A i progènie viral produïda per cèl·lules tumorals infectades amb ICOVIR-15. Les cèl·lules tumorals es van infectar amb una MOI que permetés al menys una infecció del 80% (20 MOI per HCT116, Sk-mel28, NP-9 i Isrec-01, i de 10 per A549). 24 hores després de la infecció, es va obtenir un lisat proteic i se'n va detectar E1A per Western-blot (a). A dia 3 post-infecció, es va obtenir l'extracte cel·lular de les diferents línies i se'n va titular, pel mètode de tinció de la proteïna hexó, la quantitat de progènie viral produïda per cada virus. Les barres d'error +SD s'indiquen a la figura. #, significant (p<0,05) en un test t de Student de dues cues desaparellades, comparat amb el grup Adwt-RGD. *, significant (p<0,05) en un test t de Student de dues cues desaparellades, comparat amb el grup ICOVIR-15.

2.3.2. Citotoxicitat d'ICOVIR-15 *in vitro*

Quan vàrem analitzar la citotoxicitat sobre els cultius de cèl·lules tumorals, les diferències de producció es van fer més evidents degut a que en aquest tipus d'experiment té lloc més d'un cicle de replicació viral. ICOVIR-15 redueix la quantitat de cèl·lules tumorals viables que resten en un cultiu 5-8 dies després de la infecció, respecte Adwt-RGD i respecte ICOVIR-7 (**Figura 31a**). En calcular la IC_{50} de cada virus (**Figura 31b**), veiem com ICOVIR-15 millorava la capacitat citotòxica de l'Adwt-RGD en 1,5 vegades, 1,8 vegades, 3,8 vegades, 2,6 vegades i 2,5 vegades en les línies tumorals PC-3, NP-18, Sk-mel28, NP-9 i Saos-2, respectivament. Si comparàvem la IC_{50} d'ICOVIR-15 respecte la d'ICOVIR-7, la millora és molt més aparent, destacant la millora de 15,4 i 28,8 vegades a la línia de melanoma Sk-mel28 i a la de carcinoma de pròstata PC-3, respectivament.

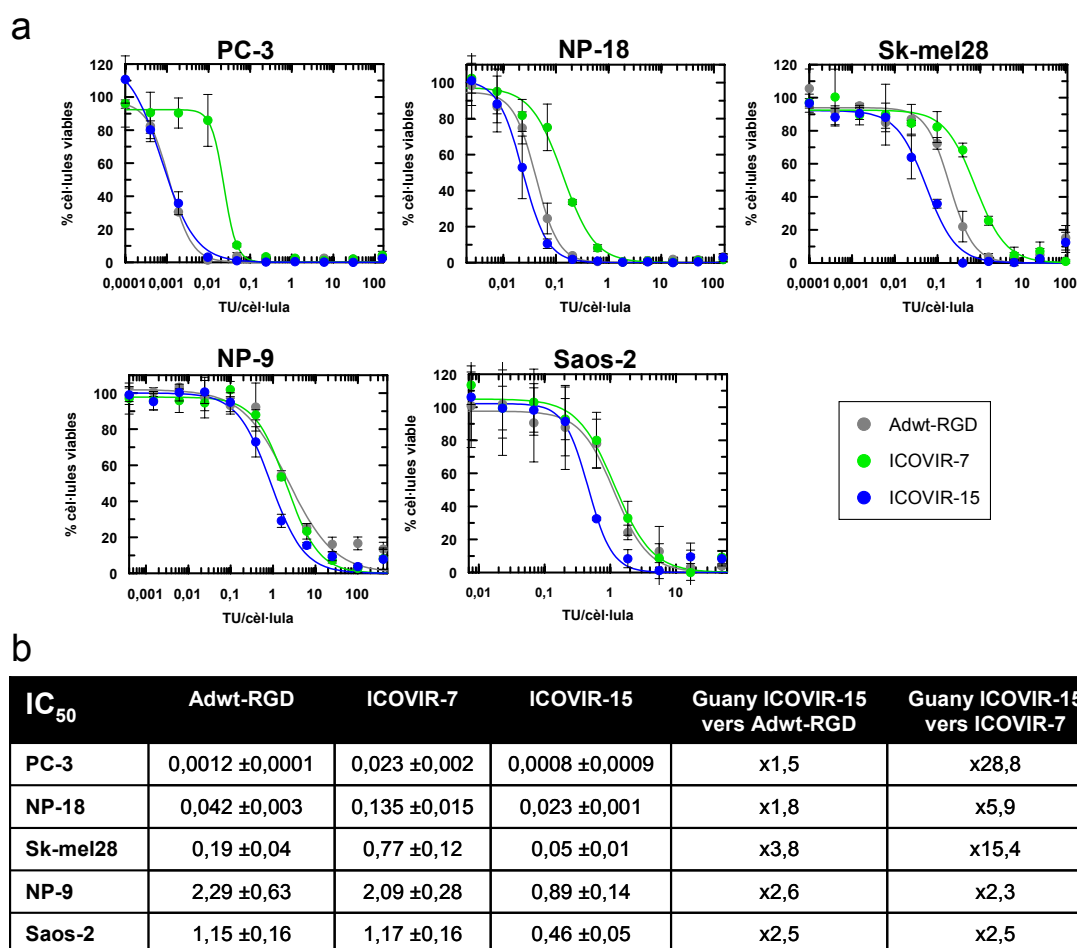


Figura 31. Citotoxicitat d'ICOVIR-15. Les línies tumorals NP-18, Saos-2, PC-3, Sk-mel28 i NP-9 van ser infectades amb un rang de dosis des de 500 MOI fins a 0,0001 MOI, depenent de la susceptibilitat de cada línia. Entre els dies 5 i 8 post-infecció, es va procedir a la determinació de la viabilitat cel·lular. (a) Corba dosi-resposta en les diferents línies tumorals. Les barres d'error $\pm SD$ s'indiquen a cada punt. (b) Taula amb els valors d' $IC_{50} \pm SD$ obtinguts, expressats com TU/cèl·lula necessàries per matar el 50% de les cèl·lules en cultiu. La ràtio entre les IC_{50} d'ICOVIR-15 i Adwt-RGD, i entre ICOVIR-15 i ICOVIR-7, es troben també indicades a la taula.

2.3.3. Replicació a seccions de metàstasis humanes

Per testar la replicació d'ICOVIR-15 a un model més semblant a les condicions reals d'un tumor, vàrem realitzar seccions de metàstasis hepàtiques de pacients amb càncer colorectal utilitzant un *Krumdiek Tissue Slicer*. Aquestes seccions o *slices* les vàrem infectar *in vitro* amb ICOVIR-15 o els seus controls i en vàrem determinar la quantitat de virus produïda després de 5 dies en cultiu. Tal i com s'observa a la **Figura 32**, la quantitat de progènie viral produïda pels *slices* després de la infecció amb ICOVIR-15 era molt semblant a la produïda amb Adwt-RGD, tot i que s'observava una certa tendència no significativa de millora. En canvi, la quantitat produïda per ICOVIR-7 es veia molt reduïda, sent de 8 vegades la diferència amb ICOVIR-15.

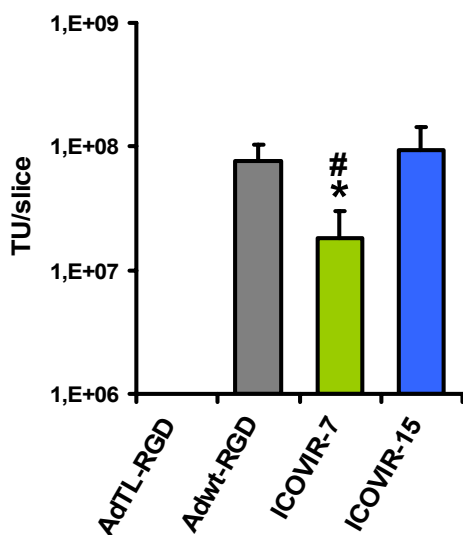


Figura 32. Producció viral d'ICOVIR-15 a seccions de metàstasis hepàtiques de pacients amb càncer colorectal. Les seccions es van infectar amb una MOI de 50 i l'extracte de les seccions es va recollir 5 dies després de la infecció. La quantitat de virus a cada extracte es va determinar pel mètode de la tinció de la proteïna hexó. Les barres d'error +SD s'indiquen a la figura. #, significant ($p < 0,05$) en un test t de Student de dues cues desaparellades, comparat amb el grup Adwt-RGD. *, significant ($p < 0,05$) en un test t de Student de dues cues desaparellades, comparat amb el grup ICOVIR-15.

2.3.4. Activitat antitumoral *in vivo*

Un cop demostrat l'increment de potència oncolítica *in vitro*, vàrem testar si aquest benefici es mantenia en un model murí de tumor xenògraft. Degut a que l'Adwt-RGD no es pot injectar a 5×10^{10} partícules virals per ratolí perquè causa la mort dels animals a dia 4, vàrem realitzar una primera aproximació comparativa injectant $2,5 \times 10^{10}$ partícules virals d'ICOVIR-15 i Adwt-RGD sistèmicament. Com es pot observar a la **Figura 33**, ICOVIR-15 va resultar més eficient controlant el creixement de tumors subcutanis de Sk-mel28 (melanoma) des de gairebé l'inici de l'experiment. A dia 37 post-injecció, quan els ratolins PBS van haver de ser sacrificats degut a un

creixement incontrolat, el tractament amb ICOVIR-15 reduïa significativament en 1,5 vegades la mida dels tumors dels ratolins tractats amb Adwt-RGD.

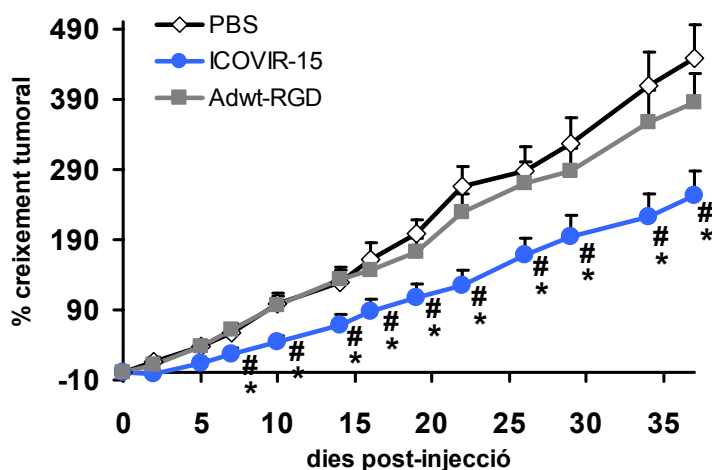


Figura 33. Eficàcia sistèmica d'ICOVIR-15 comparada amb l'Adwt-RGD. Ratolins *nude* amb tumors xenògrafs ($\sim 100 \text{ mm}^3$) de Sk-mel28 es van randomitzar i injectar amb una única dosi de PBS, Adwt-RGD o ICOVIR-15. $n=14$ tumors per grup. La dosi injectada és de $2,5 \times 10^{10}$ partícules virals per ratolí. A la gràfica es mostra el percentatge de creixement tumoral respecte el dia de tractament +SD. #, significant ($p < 0,05$) en un test t de Student de dues cues desaparellades, comparat amb el grup PBS. *, significant ($p < 0,05$) en un test t de Student de dues cues desaparellades, comparat amb el grup Adwt-RGD.

Després del sacrifici dels animals, els tumors es van extreure i es van incloure amb OCT per detectar la replicació viral dins dels tumors. En general, el número de *foci* de replicació viral detectats era molt baix, indicant que la dosi de $2,5 \times 10^{10}$ partícules virals per ratolí no és òptima per administracions sistèmiques. Quan comparàvem els tumors del grup Adwt-RGD amb els d'ICOVIR-15, s'intuïa una diferència en les mides dels *foci* de replicació, sent els d'ICOVIR-15 de mida més gran (**Figura 34**).

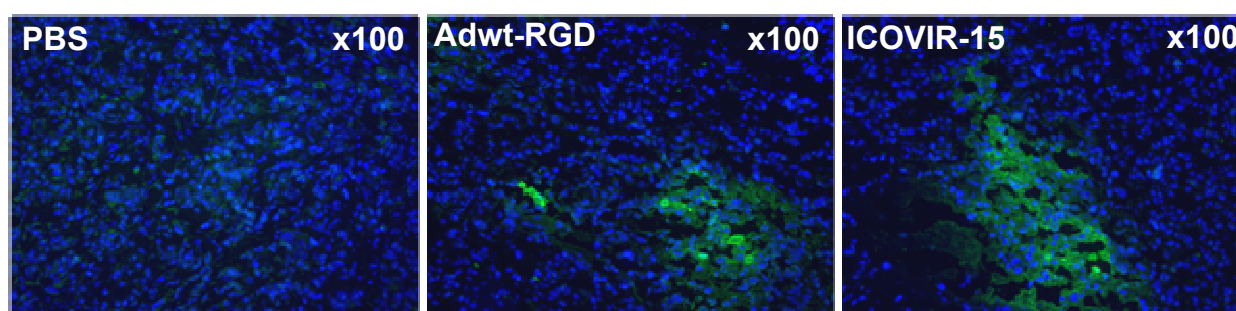


Figura 34. Detecció de foci de replicació dins dels tumors. Immunohistofluorescència contra les càpsides adenovirals sobre talls de tumors Sk-mel28 obtinguts a dia 36 després de l'administració de $2,5 \times 10^{10}$ partícules virals. Les tincions es van contratenyir amb 4',6-diamino-2-fenilindol per revelar els nuclis cel·lulars.

Degut a que la modificació del promotor d'E1A amb caixes E2F redueix molt la toxicitat causada per l'administració sistèmica d'Adwt-RGD, és possible testar l'activitat antitumoral sistèmica d'ICOVIR-15 a una dosi de 5×10^{10} partícules virals per ratolí. Primer, vàrem comparar l'eficàcia d'ICOVIR-15 i d'ICOVIR-7 controlant el creixement de tumors subcutanis a ratolins immunodeprimits. En els dos models testats (NP-9, **Figura 35a**, i A549, **Figura 35b**), els tumors dels ratolins tractats amb ICOVIR-15 van presentar un creixement reduït comparats amb els tumors dels grups ICOVIR-7, amb una diferència de 1,8 vegades a NP-9 i de 2,3 vegades a A549. La reducció respecte el grup PBS va ser de 2,5 vegades i de 4,6 vegades, respectivament. ICOVIR-15 es va testar, a més, a tres models addicionals de tumors xenògrafs (**Figura 35c-e**), mostrant en els tres casos un control eficient del creixement tumoral. Els tumors injectats amb ICOVIR-15 van veure reduït el seu creixement 2,3 vegades quan es tractava de tumors Sk-mel28, 3,7 vegades quan es tractava de NP-18 i 1,7 vegades quan eren tumors PC-3, mostrant-se així com un virus efectiu *in vivo* en tots els models tumorals testats.

2.3.5. Supervivència de ratolins amb tumors subcutanis

Com es pot veure a la **Figura 36**, ICOVIR-15 també va ser capaç d'augmentar significativament la supervivència de ratolins immunodeprimits amb tumors xenògrafs implantats subcutàniament respecte el grup injectat amb PBS. Si comparàvem la supervivència del grup ICOVIR-15 amb la dels ratolins injectats amb ICOVIR-7 (**Figura 36a-b**), observàvem també un guany en la supervivència dels animals, tot i que les diferències entre aquests dos grups no van resultar significatives.

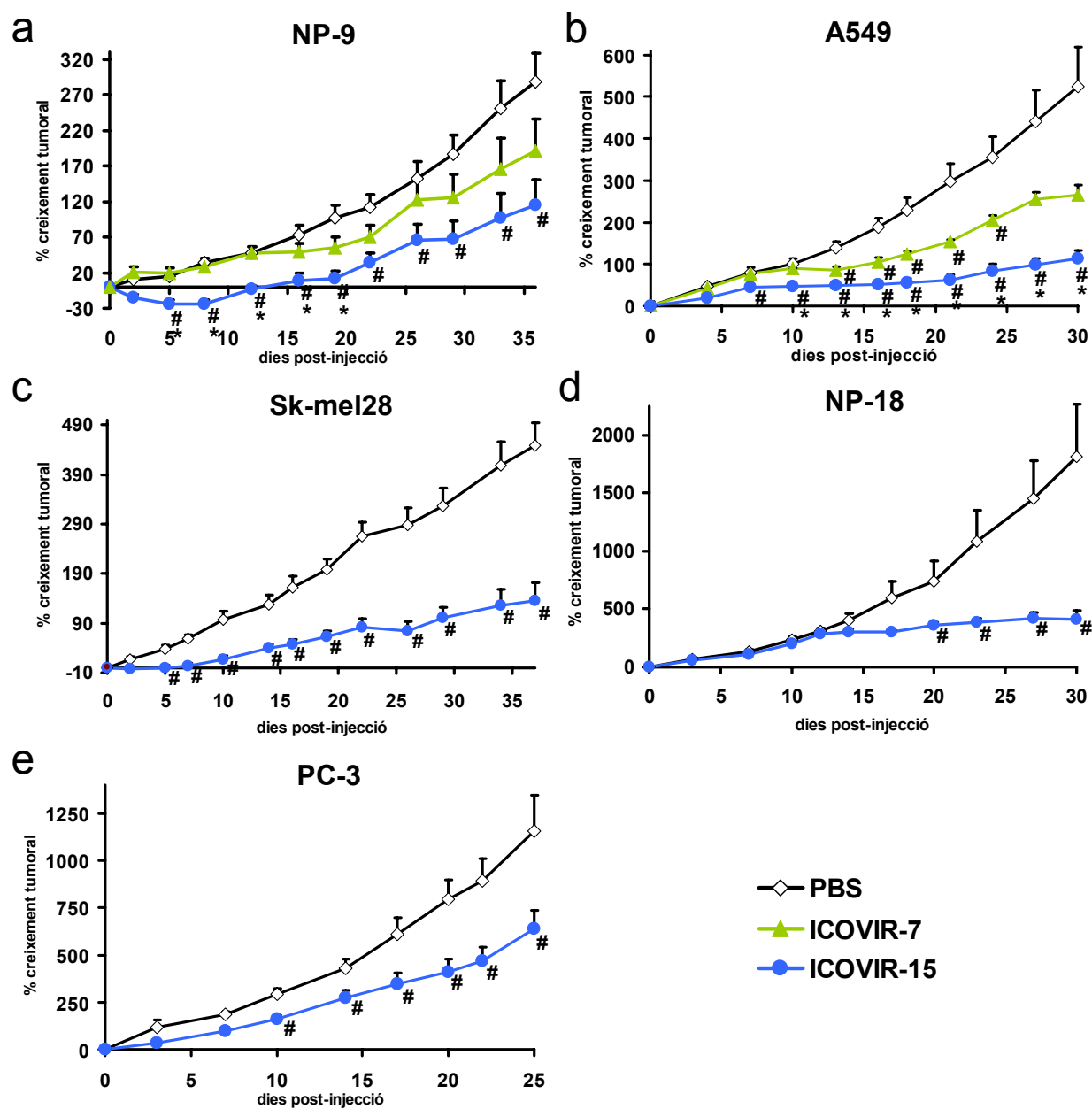


Figura 35. Eficàcia sistèmica antitumoral després d'administrar ICOVIR-15. Ratolins *nude* amb tumors xenògrafs ($\sim 100 \text{ mm}^3$) de NP-9 (a), A549 (b), Sk-mel28 (c) NP-18 (d) o PC-3 (e) es van randomitzar i injectar amb una única dosi de PBS o 5×10^{10} partícules virals d'ICOVIR-15 o ICOVIR-7. ICOVIR-7 només es va administrar en (a) i (b). $n=10-16$ tumors per grup. A les gràfiques es mostra el percentatge de creixement tumoral respecte el dia de tractament +SE. #, significat ($p < 0,05$) en un test t de Student de dues cues desaparellades, comparat amb el grup PBS. *, significat ($p < 0,05$) en un test t de Student de dues cues desaparellades, comparat amb el grup ICOVIR-7.

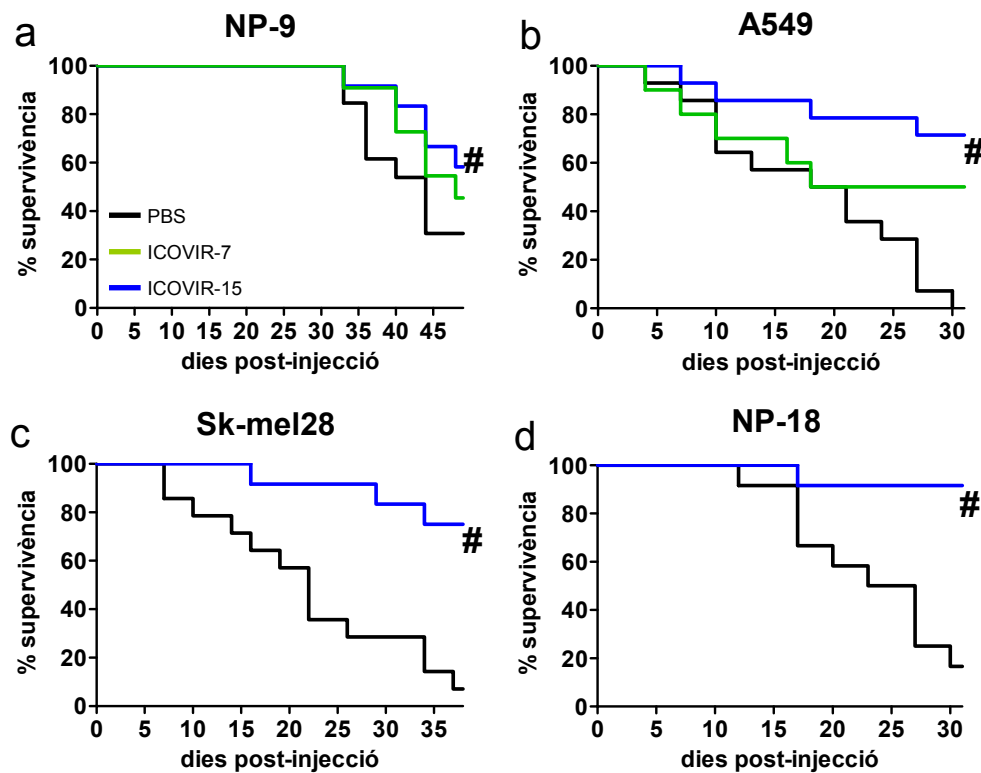


Figura 36. Supervivència de ratolins amb tumors subcutanis tractats amb ICOVIR-15. Corbes Kaplan-Meier de supervivència dels ratolins amb tumors NP-9 (a), A549 (b), Sk-mel28 (c) o NP-18 (d) injectats amb PBS o amb 5×10^{10} partícules virals d'ICOVIR-15 o ICOVIR-7. El criteri de punt final es va establir a un volum tumoral de 500 mm^3 . #, significant ($p < 0,05$) en un test log-rank comparat amb el grup tractat amb PBS.

Així doncs, els resultats obtinguts amb ICOVIR-15 ens indiquen que els nous llocs d'unió d'E2F introduïts al promotor d'E1A són capaços d'augmentar l'activitat antitumoral dels adenovirus salvatges a la vegada que en redueixen dràsticament la toxicitat causada després d'una administració sistèmica. A més, aquesta modificació suposa un augment molt petit de la mida del genoma, que hauria de permetre la incorporació de transgens sense afectar la replicació viral o l'encapsidació del virus. Per tal de comprovar-ho, vàrem incorporar la nitroreductasa NfsA al genoma d'ICOVIR-15 com a prova de concepte.

2.4. INCORPORACIÓ DEL TRANSGEN NFSA AL GENOMA D'ICOVIR-15

L'expressió de transgens que faciliten la dispersió del virus per dins del tumor pot incrementar l'habilitat dels adenovirus oncolítics d'eradicar els tumors (Alemany, 2007). L'expressió d'aquests transgens durant la fase tardana de la replicació viral pot evitar que la funció del transgen interfereixi en la replicació del virus i restringeix l'expressió d'aquest a les cèl·lules tumorals (si es tracta d'un adenovirus de replicació condicionada). Malgrat els avantatges que poden aportar els transgens, la capacitat de l'adenovirus d'incorporar ADN exogen es troba limitada per la mida màxima d'encapsidació, que és aproximadament de 38 kb (Bett *et al.*, 1993). Per determinar si el genoma d'ICOVIR-15 es compatible amb l'expressió de transgens durant la fase tardana de la replicació, vàrem clonar el gen de la nitroreductasa NfsA darrera de la fibra d'ICOVIR-15 (**Figura 37a**). El gen NfsA és la principal nitroreductasa d'*Escherichia coli* i s'utilitza com a un enzim convertidor de pro-drogues en teràpia gènica del càncer (Vass *et al.*, 2009). El gen clonat incloïa l'acceptor de tall i lligació (*splicing*) 3VDE (que dirigeix l'*splicing* de la proteïna IIIa de l'adenovirus) i una seqüència poliA per induir l'expressió de NfsA sota el control del promotor principal tardà.

Per comprovar si aquesta inserció alterava la replicació viral, vàrem comparar la producció de progènie viral i la quantitat de virus alliberat al medi d'ICOVIR-15 i d'ICOVIR-15-NfsA. Tal i com es pot observar a la **Figura 37b**, les cinètiques de producció i l'alliberament viral d'ambdós virus eren molt similars a tots els temps, indicant que el transgen no redueix la potència oncolítica d'ICOVIR-15. Complementàriament, vàrem realitzar un anàlisi d'expressió de NfsA per Western-blot per comprovar que l'expressió d'aquest es donava durant la fase tardana. Tal i com es mostra a la **Figura 37c**, NfsA no es detectava a les 24 hores post-infecció. A partir de les 48 hores, es començà a detectar petites quantitats i, a les 72 hores post-infecció, ICOVIR-15-NfsA és capaç d'expressar grans quantitats de transgen. A més, la quantitat de transgen produït per ICOVIR-15-NfsA era més gran que la produïda per Ad-CMV-NfsA, un vector adenoviral que expressa la NfsA sota el control del promotor CMV (Vass *et al.*, 2009).

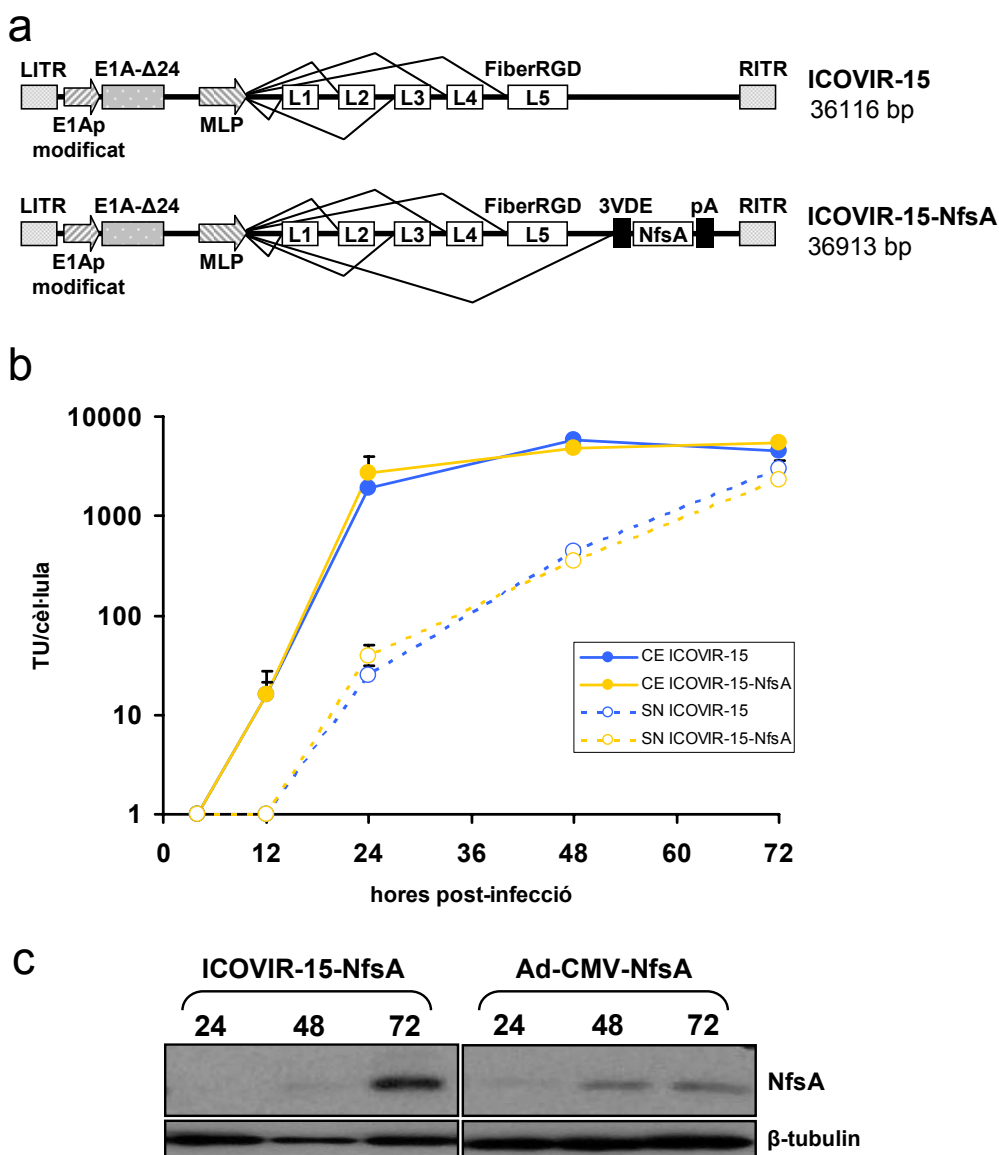


Figura 37. Incorporació del transgen NfsA al genoma d'ICOVIR-15. (a) Representació esquemàtica dels components genètics presents a ICOVIR-15 i ICOVIR-15-NfsA. Per dirigir l'expressió de NfsA sota el control del promotor principal tardà, es va inserir davant de NfsA l'acceptor de tall i lligació 3VDE, i darrere del gen una seqüència poliA (pA). Aquests tres elements es van clonar darrere del gen Fibrà-RGD d'ICOVIR-15. La mida d'ambdós genomes es detalla a la figura. (b) Replicació i alliberament viral després de la infecció amb ICOVIR-15 o ICOVIR-15-NfsA. Cèl·lules A549 confluents es van infectar a una MOI de 10. 4 hores després de la infecció, es va retirar la solució viral i es van rentar les cèl·lules tres cops amb PBS. Els extractes cel·lulars i els sobrenedants es van recollir a les 4, 12, 24, 48 i 72 hores després de la infecció i les quantitats de virus es van determinar pel mètode de la tinció de la proteïna de l'hexó. L'experiment es va realitzar per quadruplicat. Les barres d'error +SD s'indiquen a la figura. (c) Expressió de transgen. Western-blots anti-NfsA realitzats als temps indicats després de la infecció de cèl·lules PC-3 a una MOI de 20. La immunodetecció de β-tubulina es va utilitzar com a control de càrrega. L'expressió d'ICOVIR-15-NfsA es va comparar amb la de l'Ad-CMV-NfsA, un vector amb E1 deletionat que expressa NfsA sota el promotor CMV.

Així, el genoma d'ICOVIR-15 permetia la incorporació eficient de transgens i això, juntament amb l'ampli espectre d'aplicació d'aquest virus degut a la seva selectivitat i a la seva potència oncolítica en molts tipus tumorals, assenyala aquest virus com a un bon candidat per a ser testat a la clínica, a més de representar una bona base per testar el benefici que podrien aportar diferents transgens a la viroteràpia del càncer amb adenovirus.

Durant la realització d'aquesta tesi, al nostre grup es van identificar dues modificacions que poden representar una millora en les característiques dels adenovirus oncolítics. Aquestes modificacions havien estat testades en adenovirus de replicació no condicionada o en vectors no replicatius, i restava per avaluar si podien suposar una millora dins del context d'un adenovirus oncolíctic. Per tal de comprovar-ho, aquestes modificacions es van incorporar al genoma d'ICOVIR-15 i se'n va avaluar les noves aportacions en selectivitat o potència oncolítica i la seva idoneïtat per ser incorporades a un futur candidat a un assaig clínic.

3. INCORPORACIÓ DE LA MUTACIÓ T1 AL GENOMA D'ICOVIR-15

3.1. CONSTRUCCIÓ DE L'ADENOVIRUS RECOMBINANT ICOVIR-15-T1

La mutació T1 va ser seleccionada i descrita pel nostre grup després d'una bioselecció dels adenovirus que més persistien a la sang de ratolí i que provocaven un millor control del creixement tumoral (Gros *et al.*, 2008). La mutació consisteix en la inserció d'una adenina a la seqüència de retenció al reticle endoplasmàtic de la proteïna E3-19K. La inserció provoca un canvi en el marc de lectura i la introducció d'un codó *stop* i, com a conseqüència, l'expulsió d'E3-19K cap a la membrana plasmàtica. Els resultats obtinguts al nostre grup indiquen que la recol·locació d'E3-19K provoca una desregulació de l'homeòstasi intracel·lular del calci, produint un efecte similar a les viroporines, proteïnes que codifiquen molts altres virus per crear canals a la membrana cel·lular i facilitar la sortida del virus de la cèl·lula (Gonzalez and Carrasco, 2003). El fenotip de l'adenovirus que incorpora aquesta mutació és una sortida accelerada del virus de la cèl·lula, observant més quantitat de virus al medi a temps primerencs. Aquesta sortida més ràpida provoca una mida més gran de la calba sobre un cultiu de cèl·lules tumorals i una reducció de la mida dels tumors després d'administrar el virus sistèmicament. El virus que incorporava la mutació, però, era un adenovirus de replicació no condicionada, de tal manera que la dosi màxima que es va poder administrar era de $2,5 \times 10^{10}$ partícules virals per ratolí. A més, la no-retenció d'E3-19K al reticle provoca la pèrdua de la funció de bloqueig del MHC-I que té aquesta proteïna, i caldrà avaluar la potència d'aquests virus en un model immunocompetent per determinar si és o no avantatjós incorporar aquesta mutació. Per tal de poder avaluar si aquesta mutació T1 incrementa la potència oncolítica d'ICOVIR-15 i poder testar en quant augment es tradueix quan injectem una dosi de 5×10^{10} partícules virals per ratolí, vàrem incorporar la mutació T1 a la proteïna E3/19K del genoma d'ICOVIR-15 (**Figura 38**). Un cop vàrem tenir el virus construït, ben caracteritzat, amplificat i purificat, vàrem determinar si ICOVIR-15-T1 reproduïa el fenotip *in vitro* del mutant T1 i si aquesta mutació aportava a ICOVIR-15 algun avantatge en termes de potència oncolítica. Complementàriament, la incorporació d'aquesta mutació a un adenovirus oncolític ens permet avaluar si aquesta provoca algun augment de la toxicitat després d'administrar els virus sistèmicament a ratolins.

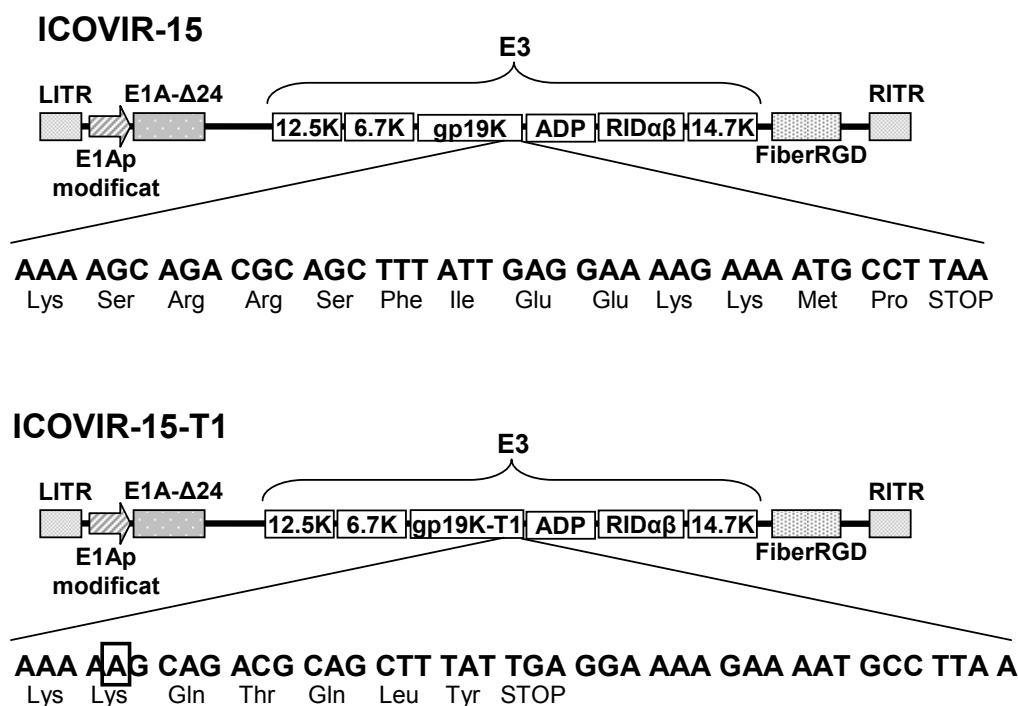


Figura 38. Representació esquemàtica dels components genètics d'ICOVIR-15-T1. A més de les modificacions genètiques d'ICOVIR-15 (modificació promotor E1A, deleció Δ24 i motiu RGD al HI-loop de la fibra), ICOVIR-15-T1 incorpora la mutació T1 a la proteïna E3-19K. A més, a la figura s'indica la seqüència d'ADN i aminoacídica de la senyal de retenció al reticle endoplasmàtic d'E3-19K salvatge i de la mutació T1.

3.2. TOXICITAT D'ICOVIR-15-T1

3.2.1. Perfil de toxicitat a ratolins

Es va administrar per la vena de la cua una dosi de 5×10^{10} partícules virals d'ICOVIR-15 o d'ICOVIR-15-T1 per ratolí a ratolins immunocompetents Balb/C per testar si la mutació T1 té algun efecte sobre la toxicitat dels adenovirus oncolítics. Diàriament, vàrem monitorar el pes dels animals i, a dia 4 post-injecció, es van sacrificar i se'n va determinar la concentració d'enzims hepàtics en sang (AST i ALT) i es van obtenir els fetges per realitzar un estudi histològic. A més, es va incloure un grup PBS i un grup injectat amb 5×10^{10} partícules virals d'Adwt-RGD com a control negatiu i positiu de toxicitat, respectivament. Tal i com es pot veure a la **Figura 39a**, sembla que la mutació T1 no tan sols no augmentava la toxicitat, sinó que la reduïa, tot i que la recuperació de pes del grup ICOVIR-15-T1 es trobava per sobre de la del grup PBS. Pel que refereix a les transaminases en sang, semblava que la mutació T1 també tenia un efecte positiu: les concentracions d'AST i d'ALT en sang dels ratolins injectats amb ICOVIR-15-T1 es veien reduïdes

en 1,9 vegades i 8,7 vegades, respectivament, respecte els ratolins injectats amb ICOVIR-15, encara que la diferència en AST no era significativa (**Figura 39b**). El pes i les concentracions de transaminases dels grups PBS i Adwt-RGD van resultar molt similars als observats en experiments anteriors.

Complementàriament, es va realitzar un estudi histològic i una immunodetecció d'E1A als fetges dels ratolins tractats amb adenovirus. Tal i com s'esperava, no es varen trobar diferències en la quantitat d'E1A que expressaven al fetge ICOVIR-15 i ICOVIR-15-T1, reduint ambdós virus la quantitat detectada als fetges dels ratolins tractats amb Adwt-RGD (**Figura 39c**). A l'anàlisi histològic del parènquima hepàtic tenyit amb eosina-hematoxilina, no es van detectar ni per ICOVIR-15 ni per ICOVIR-15-T1 els signes evidents de cirrosi degenerativa (macrosteatosi, presència de cossos de Councilman i grans zones de necrosi) que presentaven els fetges dels ratolins tractats amb Adwt-RGD, presentant un aspecte molt similar al dels fetges dels ratolins tractats amb PBS (**Figura 39d**).

3.3. POTÈNCIA ONCOLÍTICA D'ICOVIR-15-T1

A continuació, vàrem testar si ICOVIR-15-T1 reproduïa el fenotip observat anteriorment de la mutació T1 i si aquest fenotip permetia una millora de la potència oncolítica. Per determinar si la mutació representava un avantatge i presentava una activitat antitumoral incrementada, vàrem realitzar tant experiments *in vitro* com *in vivo*, incloent assajos de producció viral, citotoxicitats i models murins de tumors xenògrafs subcutanis.

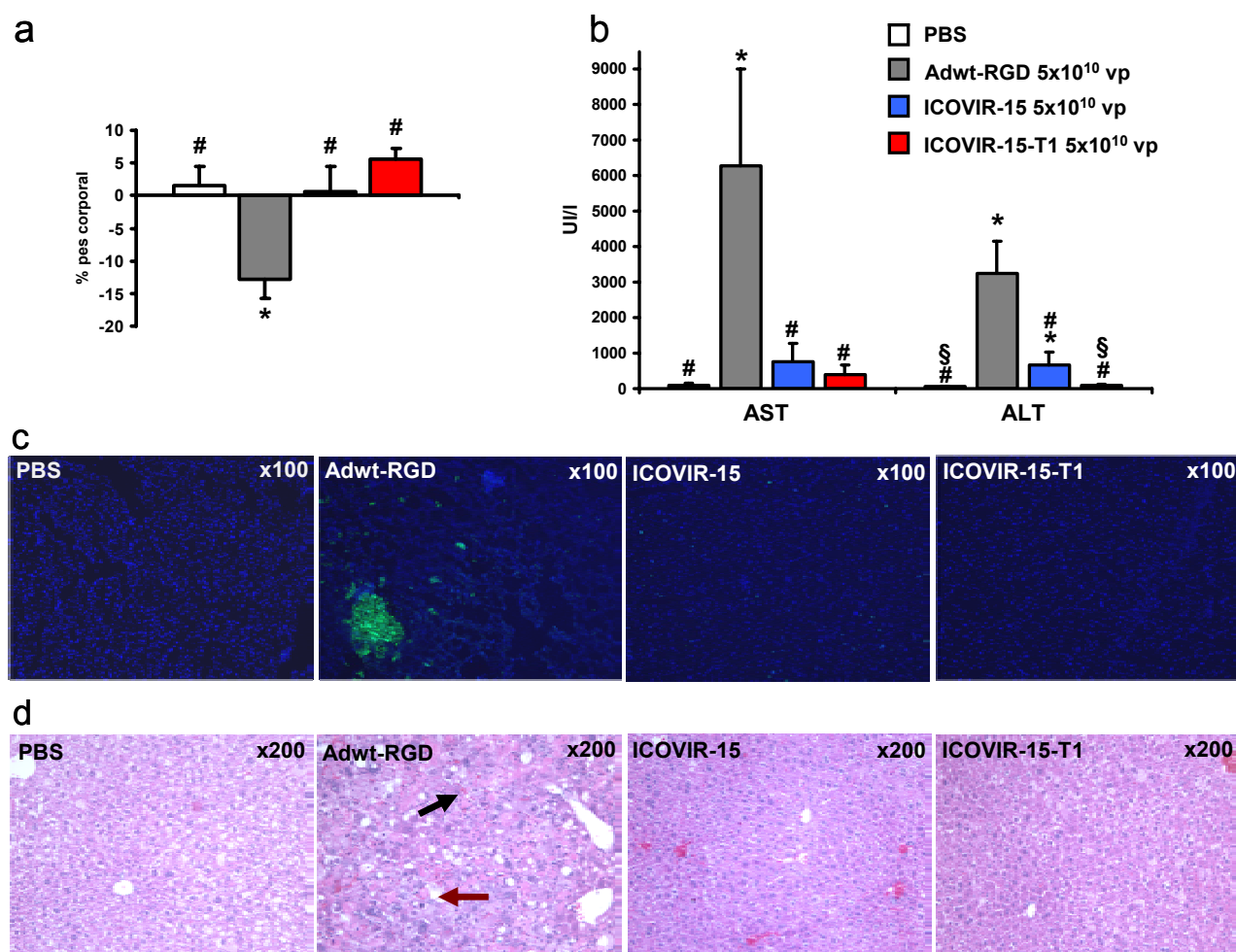


Figura 39. Toxicitat a ratolins injectats amb ICOVIR-15-T1. (a) Variació de pes a dia 4 després de la injecció sistèmica de PBS o adenovirus a ratolins immunocompetent Balb/C. Les barres d'error +SD s'indiquen a la figura. (b) Concentracions de transaminases del sèrum 4 dies després d'administrar de manera sistèmica PBS o adenovirus a ratolins Balb/C immunocompetents. Les barres d'error +SD s'indiquen a la figura. #, significant ($p < 0,05$) en un test t de Student de dues cues desaparellades, comparat amb el grup Adwt-RGD. *, significant ($p < 0,05$) en un test t de Student de dues cues desaparellades, comparat amb el grup PBS. §, significant ($p < 0,05$) en un test t de Student de dues cues desaparellades, comparat amb el grup ICOVIR-15. (c) Immunodetecció d'E1A sobre talls congelats de fetges inclosos en OCT a dia 4 post-administració de PBS o 5×10^{10} partícules virals per ratolí. (d) Tinció eosina-hematoxilina sobre talls parafinats de fetges obtinguts també a dia 4 post-injecció. La fletxa vermella assenyalava la macrosteatosi dels fetges dels ratolins injectats amb Adwt-RGD i la fletxa negra els cossos de Councilman dins de les zones de necrosi.

3.3.1. Assaig de formació de calbes

La característica principal del fenotip de la mutació T1 és una acceleració de la sortida del virus de la cèl·lula. Això provoca que les cèl·lules veïnes es puguin infectar abans i augmenta la mida de les calbes que es formen per la lisi de les cèl·lules tumorals (Gros *et al.*, 2008). Per

determinar si ICOVIR-15-T1 presentava també aquest fenotip, vàrem realitzar un assaig de formació de calbes, i sis dies després de la infecció vàrem tenyir les plaques amb MTT per a una millor visualització de la mida de les calbes. Tal i com s'observa a la **Figura 40**, ICOVIR-15-T1 presentava una mida de calba molt augmentada respecte ICOVIR-15, que ens indicava que la mutació T1 presenta el mateix fenotip dins del context d'un adenovirus oncolític.

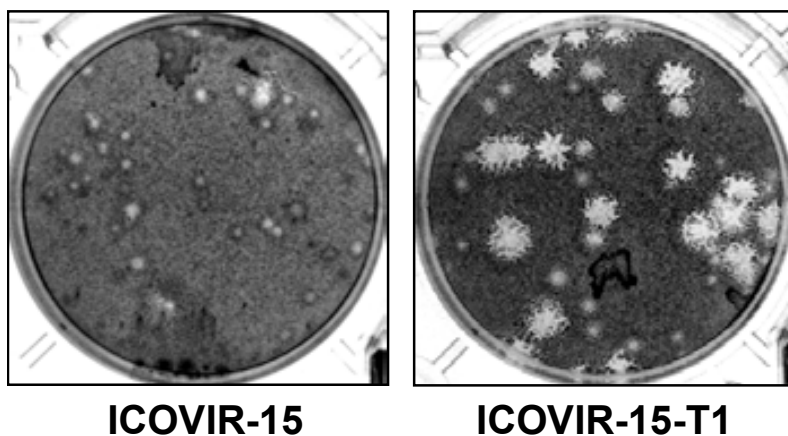


Figura 40. Assaig de formació de calbes amb ICOVIR-15-T1. Després d'infectar amb solucions seriades cèl·lules A549 en confluència, es van rentar les cèl·lules i es van cobrir amb una solució 1:1 de medi i agarosa, afegint a més un sobrenedant de medi. Passats 6 dies, es va retirar l'*overlayer* i es van tenyir les plaques amb MTT.

3.3.2. Expressió d'E1A i producció viral a cèl·lules tumorals

Per comprovar si la mutació tenia algun efecte sobre la funció del promotor d'E1A, vàrem realitzar una detecció per Western-blot de la quantitat d'E1A produïda 24 hores després de la infecció amb ICOVIR-15 o ICOVIR-15-T1. Tal i com es mostra a la **Figura 41a**, ICOVIR-15-T1 expressava la mateixa quantitat d'E1A que ICOVIR-15 en les dues línies tumorals a on es va testar. A continuació, vàrem determinar si aquesta mutació repercutia en la quantitat de progènie viral produïda en un sol cicle de replicació viral. Per realitzar-ho, vàrem infectar diferents línies tumorals i en vàrem determinar la producció viral a les 72 hores després de la infecció. Com s'observa a la **Figura 41b**, i a diferència dels resultats publicats anteriorment, la mutació T1 tenia un efecte negatiu sobre la quantitat de virus produïda per cada cèl·lula tumoral, ja que, respecte ICOVIR-15, es reduïa la producció viral en 2,12 vegades, 1,65 vegades i 1,5 vegades a A549, NP-9 i Sk-mel28, respectivament, tot i que la diferència a Sk-mel28 no era significativa.

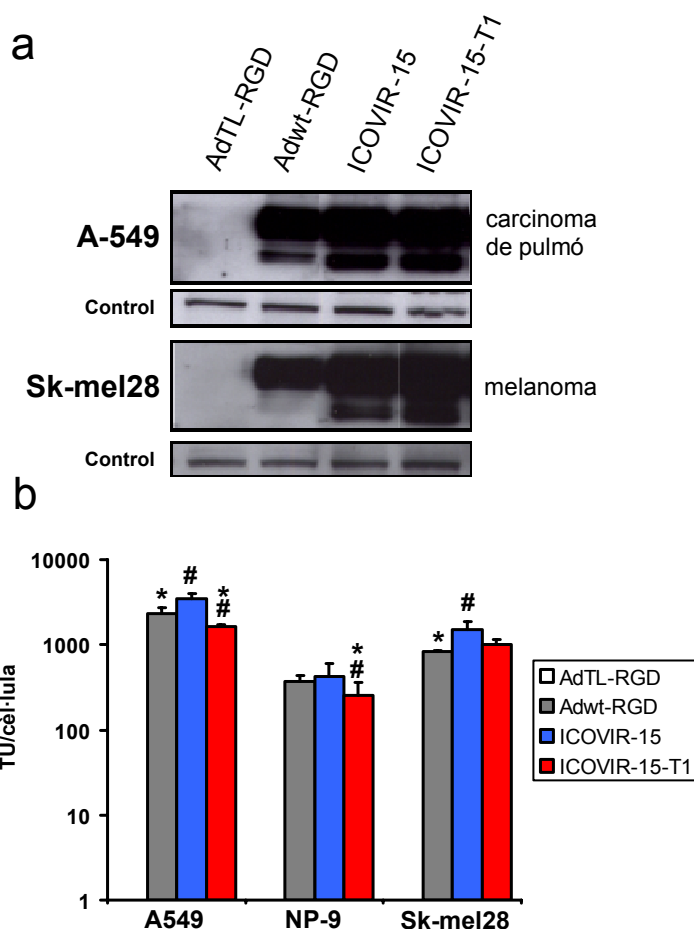


Figura 41. Expressió d'E1A i progènie viral a cèl·lules tumorals infectades amb ICOVIR-15-T1. (a) Western-blots anti-E1A realitzats 24 hores després d'infectar les cèl·lules a una MOI que permetés un 80% de transducció (MOI de 20 per Sk-mel28 i de 10 per A549). (b) Producció viral a cèl·lules tumorals a dia 3 post-infecció. Les cèl·lules es van infectar com s'indica a (a) o amb una MOI de 20 per a la línia NP-9. La producció es va mesurar per quadruplicat pel mètode de la tinció de la proteïna hexó. Les barres d'error +SD s'indiquen a la figura. #, significant ($p < 0,05$) en un test t de Student de dues cues desaparellades, comparat amb el grup Adwt-RGD. *, significant ($p < 0,05$) en un test t de Student de dues cues desaparellades, comparat amb el grup ICOVIR-15.

3.3.3. Assajos de citotoxicitat a cèl·lules tumorals

Dintre del fenotip descrit per a la mutació T1, una de les característiques més importants és l'augment de la citotoxicitat a cèl·lules tumorals (Gros *et al.*, 2008). Quan vàrem testar la citotoxicitat d'ICOVIR-15-T1, es va observar que aquest augment de potència es donava en 2 de les 3 línies testades (**Figura 42a**). Si calculàvem la IC_{50} d'ICOVIR-15 i d'ICOVIR-15-T1, observàvem un augment de 11,4 vegades i de 2,03 vegades a A549 i Sk-mel28, respectivament (**Figura 42b**), tot i que en aquestes línies s'havia observat una disminució de la producció viral. Aquest

augment, doncs, era degut a la sortida avançada del virus de la cèl·lula, que permetia arribar abans a les cèl·lules tumorals veïnes, augmentant el número de cèl·lules lisades en un mateix temps.

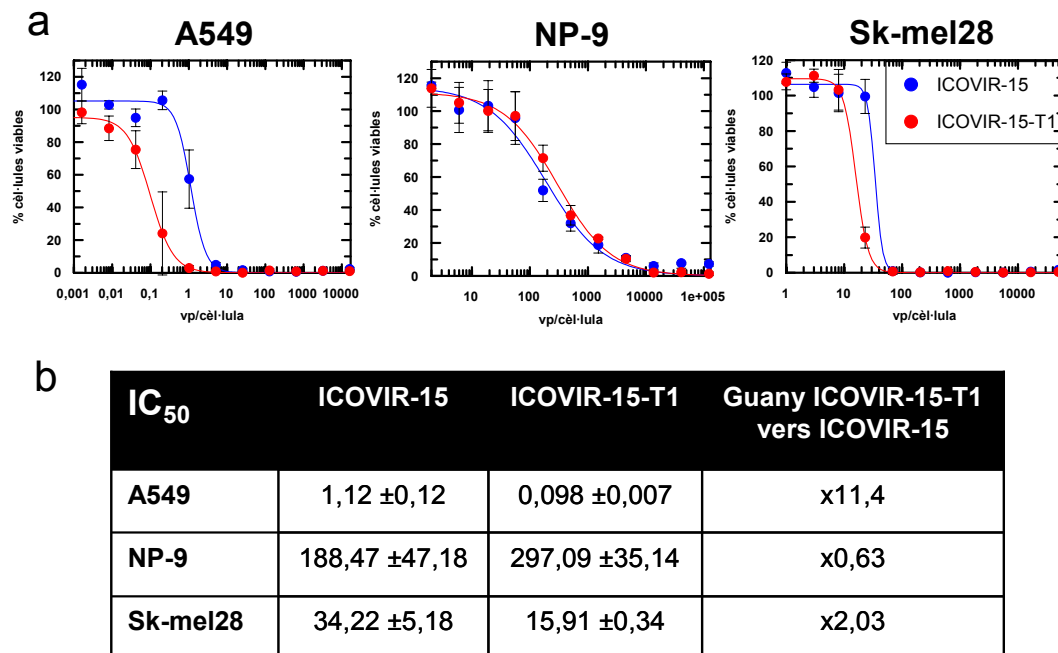


Figura 42. Capacitat citotòxica d'ICOVIR-15-T1 a cèl·lules tumorals humanes. Les línies tumorals A549, NP-9 i Sk-mel28 van ser infectades amb un rang de dosis des de 100000 MOI fins a 0,001 MOI (vp/cèl·lula), depenent de la susceptibilitat de cada línia. Entre els dies 5 i 8 post-infecció, es va procedir a la determinació de la viabilitat cel·lular. (a) Corba dosi-resposta en les diferents línies tumorals. Les barres d'error \pm SD s'indiquen a cada punt. (b) Taula amb els valors d'IC₅₀ \pm SD obtinguts, expressats com vp/cèl·lula necessàries per matar el 50% de les cèl·lules en cultiu. Les ràtios entre les IC₅₀ d'ICOVIR-15-T1 i ICOVIR-15 es troben també indicades a la taula.

Degut a que la mutació T1 canvia la funció d'un gen implicat en la inhibició de la resposta immune per part del virus, l'avaluació de les seves característiques en un model immunocompetent es fa imprescindible. Entre els models immunocompetents per avaluar l'efecte dels adenovirus oncolítics, el hámster daurat o siri (*Mesocricetus auratus*) ha guanyat molta rellevància en els últims anys degut a la seva semi-permissivitat a la replicació de l'adenovirus humà (Lichtenstein *et al.*, 2009). En previsió d'una futura avaluació en un model de hámster siri amb tumors subcutanis de hámster (anàlisi no inclòs en aquesta tesi), vàrem determinar si, a les dues línies tumorals de hámster de les que disposàvem, ICOVIR-15-T1 era capaç d'augmentar la citotoxicitat d'ICOVIR-15. Als experiments també hi vàrem incloure l'Adwt-RGD per determinar si ICOVIR-15 era capaç també de mantenir o d'augmentar la citotoxicitat

sobre cèl·lules tumorals de hámster. Tal i com es mostra a la **Figura 43a**, ICOVIR-15-T1 va ser capaç d'augmentar la citotoxicitat d'ICOVIR-15 a les dues línies tumorals de hámster, tot i que la millora és molt subtil. Si calculem la IC_{50} per a cada virus (**Figura 43b**), veiem que la millora era de 1,65 vegades i de 1,76 vegades a Amel-3 (melanoma) i HP-1 (pàncrees), respectivament. A més, s'observa que ICOVIR-15 augmentava lleugerament la citotoxicitat de l'Adwt-RGD, incrementant la IC_{50} 1,05 vegades a Amel-3 i 1,5 vegades a HP-1

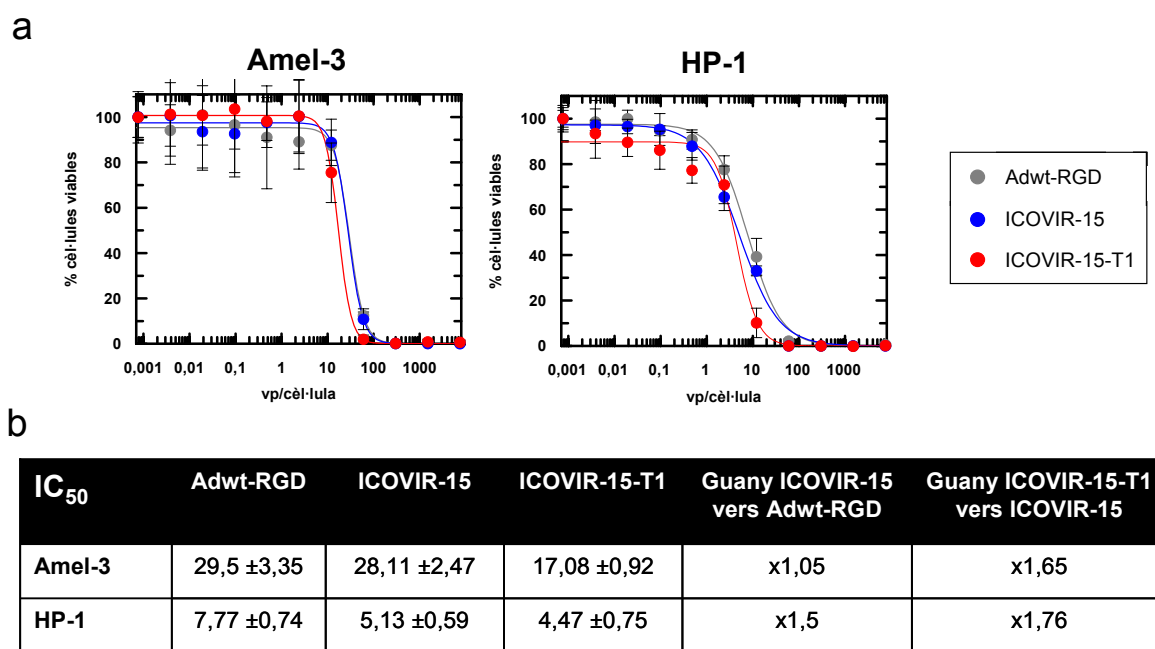


Figura 43. Capacitat citotòxica d'ICOVIR-15-T1 a cèl·lules tumorals de hámster. Les línies tumorals de hámster Amel-3 (melanoma) i HP-1 (pàncrees) van ser infectades amb un rang de dosis des de 10000 MOI fins a 0,001 MOI (vp/cèl·lula). A dia 7 post-infecció, es va procedir a la determinació de la viabilitat cel·lular. (a) Corba dosi-resposta. Les barres d'error $\pm SD$ s'inidquen a cada punt. (b) Taula amb els valors d' $IC_{50} \pm SD$ obtinguts, expressats com vp/cèl·lula necessàries per matar el 50% de les cèl·lules en cultiu. Les ràtios entre les IC_{50} d'ICOVIR-15-T1 i ICOVIR-15 i d'ICOVIR-15 i Adwt-RGD es troben també indicades a la taula.

3.3.4. Activitat antitumoral *in vivo* d'ICOVIR-15-T1

Per determinar si la mutació T1 suposava una millora de l'activitat oncolítica *in vivo*, vàrem implantar tumors A549 o NP-9 a ratolins immunodeprimits. Quan els tumors van arribar a un volum de 100 mm^3 , es van injectar 5×10^{10} partícules virals d'ICOVIR-15 o d'ICOVIR-15-T1 per la vena de la cua i es va monitorar la mida dels tumors. Tal i com es mostra a la **Figura 44**, el creixements dels tumors dels ratolins tractats amb ICOVIR-15-T1 va ser molt semblant als injectats amb ICOVIR-15, indicant que la mutació T1 no aporta un clar avantatge *in vivo* en el context d'ICOVIR-15.

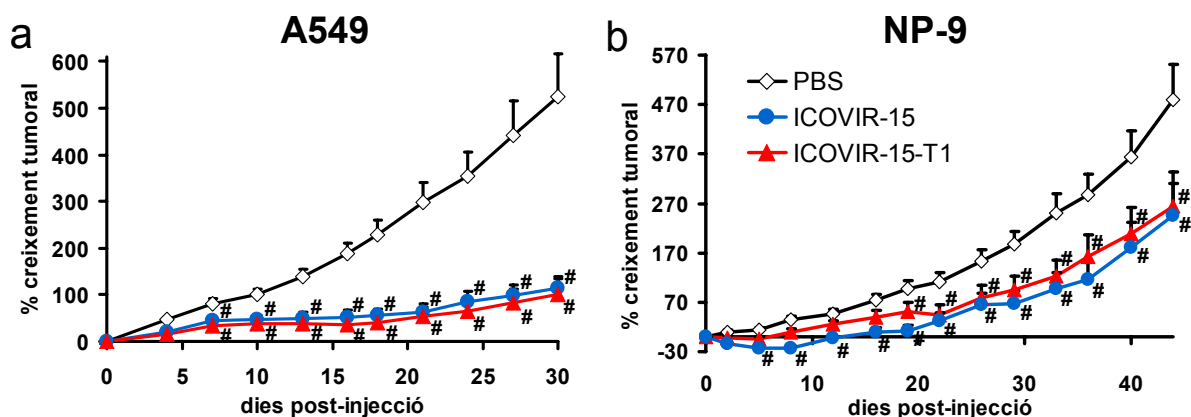


Figura 44. Eficàcia sistèmica antitumoral d'ICOVIR-15-T1. Ratolins *nude* amb tumors xenògrafs (~100 mm³) d'A549 (a) i NP-9 (b) es van randomitzar i injectar amb una única dosi de PBS o 5x10¹⁰ partícules virals d'ICOVIR-15 o ICOVIR-15-T1. n=10-16 tumors per grup. A les gràfiques es mostra el percentatge de creixement tumoral respecte el dia de tractament +SE. #, significat (p<0,05) en un test t de Student de dues cues desparellades, comparat amb el grup PBS.

3.3.5. Supervivència de ratolins amb tumors subcutanis

Després d'administrar sistèmicament ICOVIR-15-T1 a ratolins immunodeprimits amb tumors subcutanis d'A549 i NP-9, la supervivència va millorar respecte els ratolins injectats amb PBS, però es va mostrar molt similar a la dels ratolins injectats amb ICOVIR-15 (Figura 45), confirmant que la mutació T1 no presenta un clar benefici en activitat oncolítica d'ICOVIR-15 *in vivo*.

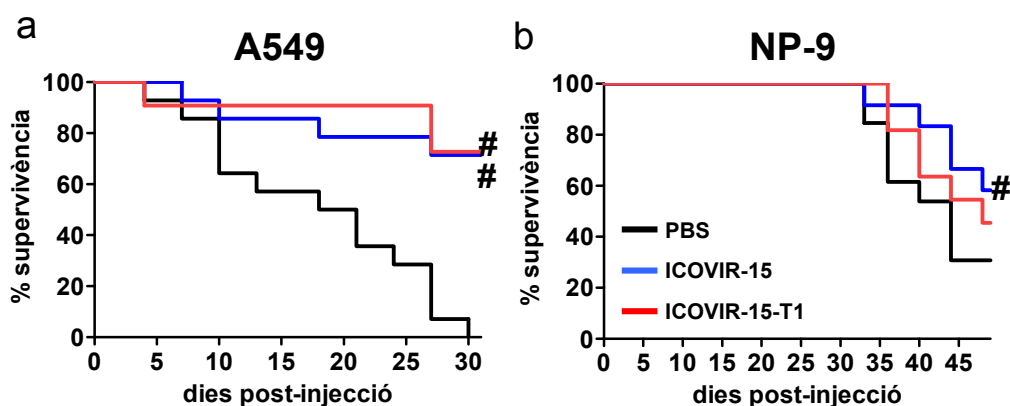


Figura 45. Supervivència de ratolins amb tumors subcutanis tractats amb ICOVIR-15-T1. Corbes Kaplan-Meier de supervivència dels ratolins amb tumors A549 (a) o NP-9 (b) injectats amb PBS o amb 5x10¹⁰ partícules virals d'ICOVIR-15-T1 o ICOVIR-15. El criteri de punt final es va establir a un volum tumoral de 500 mm³. #, significat (p<0,05) en un test log-rank comparat amb el grup tractat amb PBS.

4. INSERCIÓ DEL MOTIU RGD AL *SHAFT* DE LA FIBRA D'ICOVIR-15

4.1. CONSTRUCCIÓ DE L'ADENOVIRUS RECOMBINANT ICOVIR-15K

El domini ⁹¹KKTK⁹⁴ del cos (*shaft*) de la fibra dels adenovirus de tipus 2 i 5 s'ha postulat com el domini d'unió als HSG (Dechecchi *et al.*, 2001). A més, aquest domini té una funció important en el tropisme hepàtic ja que la mutació a dominis com GATK o GAGA en disminueix la transducció del fetge (Bayo-Puxan *et al.*, 2006). Aquestes mutacions, però, desestructuren la fibra i no permeten la funcionalitat del *knob* i, quan s'ha intentat combinar aquestes mutacions amb la inserció de pèptids com el motiu RGD al *HI loop*, no s'ha aconseguit rescatar la infectivitat (Bayo-Puxan *et al.*, 2006; Kritz *et al.*, 2007). Durant la realització d'aquesta tesi, el nostre grup va descriure que amb la recol·locació del motiu RGD al *shaft* de la fibra, substituint el motiu KKTK per RGDK, s'aconsegueix augmentar la infectivitat de cèl·lules tumorals *in vitro*, disminuir 6 cops la quantitat de virus que es transdueix al fetge de ratolins i augmentar 3 cops la quantitat de virus que infecta el tumor *in vivo* (Bayo-Puxan *et al.*, 2009). Aquests experiments s'havien realitzat amb un vector adenoviral no replicatiu i restava per determinar si, en el context d'un adenovirus oncolític, aquesta disminució de la transducció del fetge es traduïa en una reducció de la toxicitat, i si l'augment de la infectivitat del tumor es reflectia en una millor activitat antitumoral. Amb aquest objectiu, vàrem clonar el motiu RGD al *shaft* de la fibra d'ICOVIR-15 a la vegada que n'eliminàvem el motiu RGD del *HI-loop* del *knob* (**Figura 46**). Un cop vàrem tenir el virus construït, ben caracteritzat, amplificat i purificat, vàrem determinar si ICOVIR-15K reduïa la toxicitat associada a una administració sistèmica d'ICOVIR-15 i si, a la vegada, era capaç d'augmentar la potència oncolítica *in vitro* i en models murins.

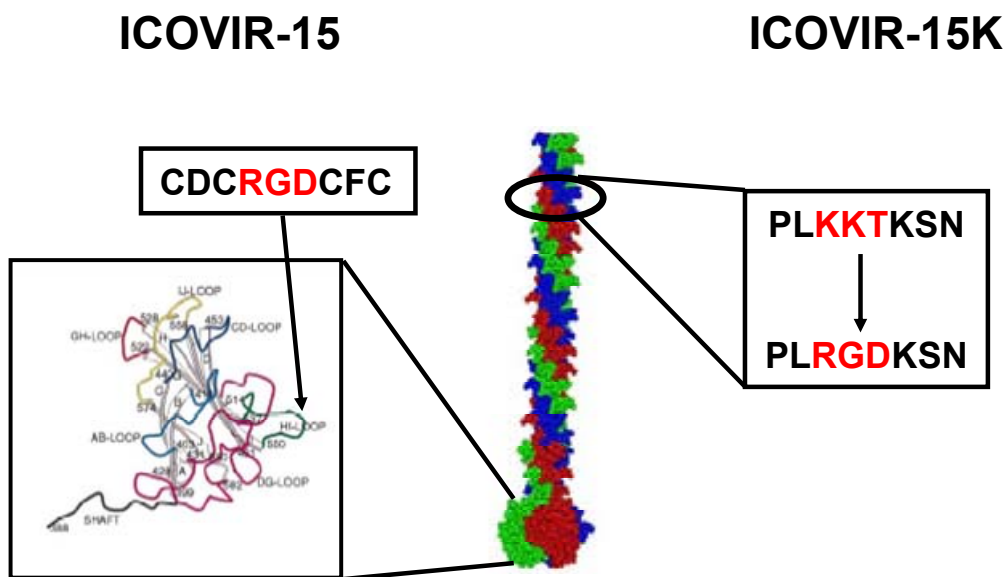


Figura 46. Representació esquemàtica de les mutacions a les fibres d'ICOVIR-15 i d'ICOVIR-15K. La fibra d'ICOVIR-15 incorpora el motiu CDCRGCFC (RGD-4C) al *HI-loop* del *knob*. A ICOVIR-15K aquesta inserció s'ha deletionat i el motiu RGD s'incorpora substituint el motiu KTKK d'unió HSG de la tercera posició del *shaft*.

4.2. TOXICITAT D'ICOVIR-15K

4.2.1. Perfil de toxicitat a ratolins

Després de l'administració sistèmica a ratolins d'un vector no replicatiu que incorpora el motiu RGDK al cos de la fibra, la quantitat de virus detectat al fetge es redueix 6 cops (Bayo-Puxan *et al.*, 2009). Per testar si això repercutia a la toxicitat hepàtica i global, vàrem injectar 5×10^{10} partícules virals d'ICOVIR-15K o d'ICOVIR-15 per la vena de la cua de ratolins Balb/C immunocompetents i en vàrem monitorar el pes i determinar les concentracions de transaminases i cèl·lules sanguínies a dia 5 i 12 després de l'administració. El grup injectat amb Adwt-RGD, inclòs com a control positiu de toxicitat, es va sacrificar a dia 3 degut a que els ratolins presentaven clars símptomes de malestar i toxicitat. Després d'administrar ICOVIR-15K o ICOVIR-15, els ratolins van presentar una evolució del pes molt similar, amb una pèrdua del voltant del 4% a dies 3 i 5, seguida d'una ràpida recuperació fins als nivells del PBS (**Figura 47a**). Les concentracions de transaminases d'ambdós grups també van ser molt semblants, tant a dia 5 com a dia 12 (**Figura 47b**), indicant que la transducció de menys virus al fetge no en redueix la

toxicitat a ratolins. La diferència més important entre els dos virus la trobem en les concentracions de plaquetes, ja que els ratolins injectats amb ICOVIR-15K presentaven una disminució més elevada de la concentració en sang (**Figura 47c**) i, quan vàrem analitzar la concentració a dia 12, es va poder observar que la trombocitopènia no s'havia recuperat totalment, a diferència del grup ICOVIR-15, indicant que la nova fibra modificada al cos produïa una interacció diferencial amb les plaquetes, reduint-ne el seu número.

Degut a aquesta interacció diferencial amb les plaquetes, vàrem realitzar un anàlisi complet de les concentracions de cèl·lules sanguínies circulants per si aquesta interacció diferencial es produïa també amb altres tipus de cèl·lules. Tal i com s'observa a la **Figura 48**, no es va observar diferències entre les concentracions de limfòcits, monòcits, neutròfils i eosinòfils circulants dels grups ICOVIR-15 i ICOVIR-15K. Per altra banda, aquests dos grups presentaven una elevació de neutròfils significativa respecte els ratolins PBS i, a més, presentaven una recuperació significativa de limfòcits i eosinòfils respecte el grup administrat amb Adwt-RGD.

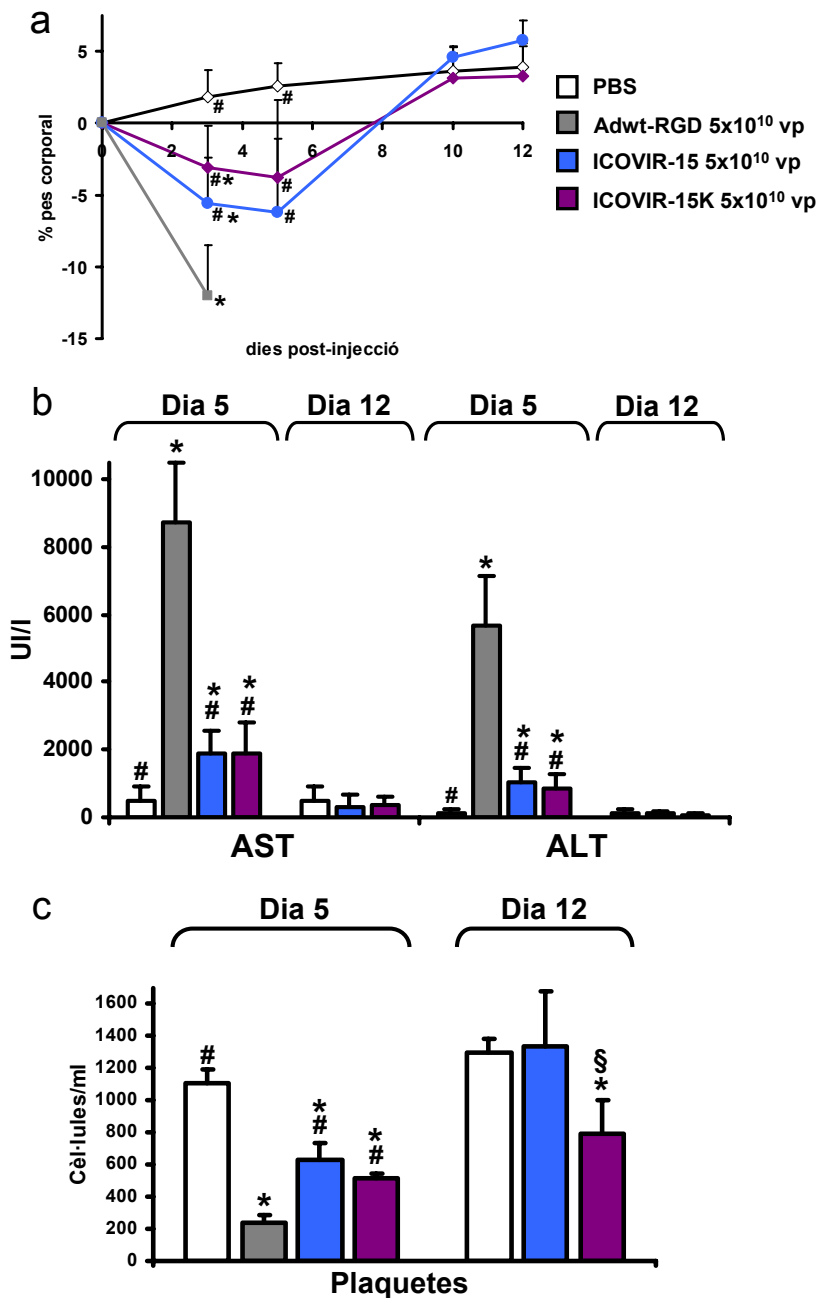


Figura 47. Perfil de toxicitat d'ICOVIR-15K a ratolins. La variació del pes (a), així com les concentracions de transaminases del sèrum (b) i plaquetes en sang (c) es van determinar a ratolins Balb/C immunocompetents a dia 5 i 12 després de la injecció sistèmica de PBS, Adwt-RGD, ICOVIR-15 o ICOVIR-15K. Les dades del grup injectat amb Adwt-RGD corresponen a dia 3 post-injecció degut a una elevada toxicitat. n= 5-10 ratolins per grup. Les barres d'error +SD s'indiquen a la figura. #, significat ($p < 0,05$) en un test t de Student de dues cues desaparellades, comparat amb el grup Adwt-RGD. *, significat ($p < 0,05$) en un test t de Student de dues cues desaparellades, comparat amb el grup PBS. §, significat ($p < 0,05$) en un test t de Student de dues cues desaparellades, comparat amb el grup ICOVIR-15.

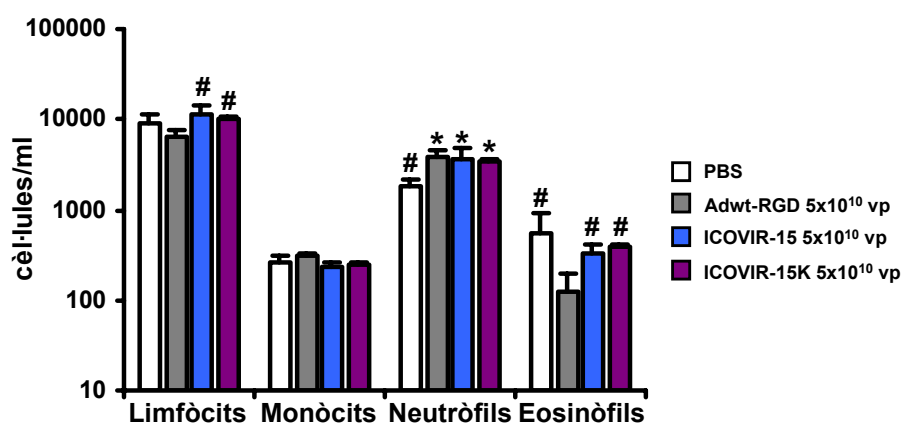


Figura 48. Hemograma dels ratolins injectats amb ICOVIR-15K. Concentració de limfòcits, monòcits, neutròfils i eosinòfils en sang de ratolins Balb/C immunocompetents a dia 5 després de la injecció sistèmica de PBS, Adwt-RGD, ICOVIR-15 o ICOVIR-15K. Les dades del grup injectat amb Adwt-RGD corresponen a dia 3 post-injecció degut a una elevada toxicitat. n= 5-10 ratolins per grup. Les barres d'error +SD s'indiquen a la figura. #, significat ($p < 0,05$) en un test t de Student de dues cues desaparellades, comparat amb el grup Adwt-RGD. *, significat ($p < 0,05$) en un test t de Student de dues cues desaparellades, comparat amb el grup PBS.

4.2.2. Perfil de toxicitat a hámsters

Per complementar la informació de toxicitat d'ICOVIR-15K, vàrem testar els efectes d'una administració sistèmica a hámsters, que a més ens permet determinar els efectes de la replicació viral. Es van injectar hámsters siris amb una dosi de 4×10^{11} partícules virals d'ICOVIR-15 o d'ICOVIR-15K per la vena cefàlica i es va determinar, a dia 5 post-administració, paràmetres com la reducció de pes, la concentració de transaminases en sang (AST i ALT) i els paràmetres hematològics. Com a grups control, vàrem incloure hámsters injectats amb PBS i hámsters injectats amb Adwt-RGD; aquest últim grup va ser sacrificat a dia 3 post-injecció degut a evidents símptomes de toxicitat i malestar.

Tal i com es mostra a la **Figura 49a**, la reducció de pes dels hámsters injectats amb ICOVIR-15K va resultar semblant a la del grup ICOVIR-15, tant a dia 3 com a dia 5. Pel que refereix a les concentracions de transaminases, ICOVIR-15K reduí de manera significativa 1,7 vegades l'elevació d'AST provocada per ICOVIR-15 (**Figura 49b**); l'elevació d'ALT provocada per ambdós virus va resultar molt similar. Per altra banda, l'administració d'ICOVIR-15K va provocar una trombocitopènia 2,5 vegades més elevada que ICOVIR-15 (**Figura 49c**), corroborant que la nova fibra d'ICOVIR-15K interacciona de forma diferent amb les plaquetes.

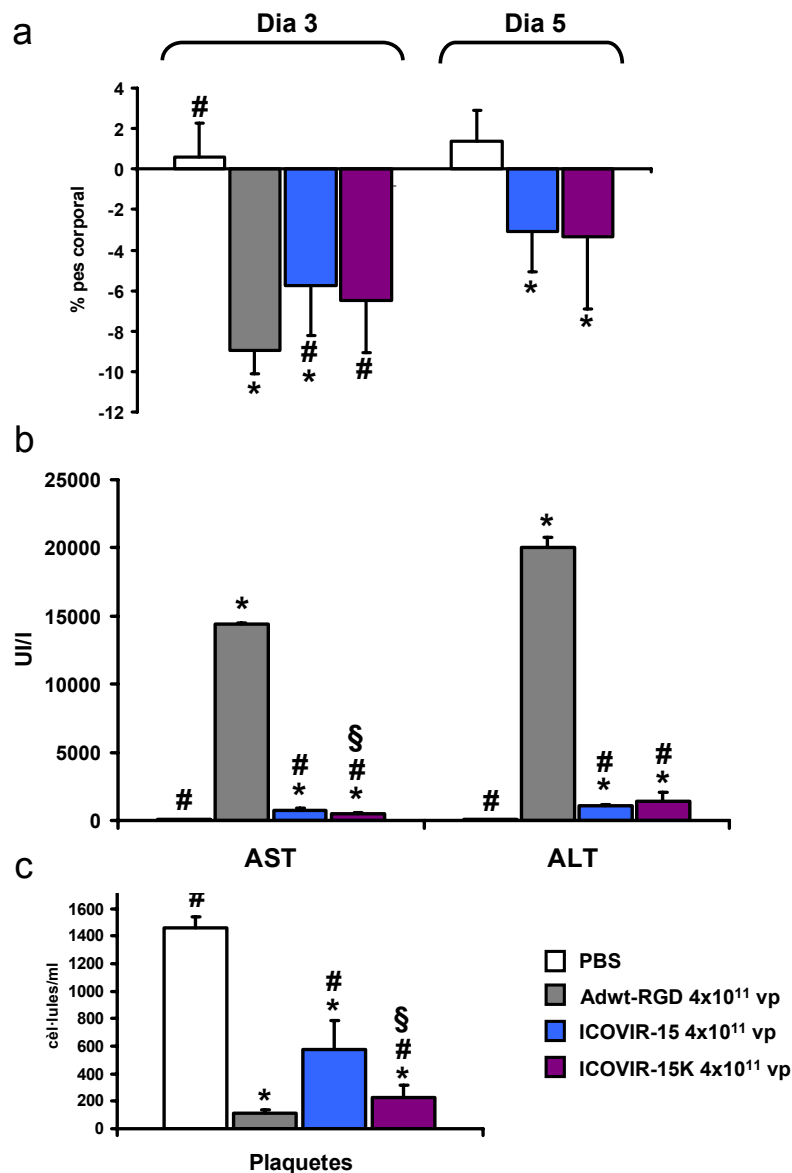


Figura 49. Perfil de toxicitat d'ICOVIR-15K a hámsters. La variació del pes (a) i les concentracions de transaminases en sèrum (b) i plaquetes en sang (c) es van determinar a hámsters siris 5 dies després de la injecció sistèmica de PBS, Adwt-RGD, ICOVIR-15 o ICOVIR-15K. Les dades del grups injectats amb Adwt-RGD corresponen al dia 3 després de la injecció degut a una elevada toxicitat. n= 5 hámsters per grup. Les barres d'error +SD s'indiquen a la figura. #, significat (p<0,05) en un test t de Student de dues cues desaparellades, comparat amb el grup Adwt-RGD. *, significat (p<0,05) en un test t de Student de dues cues desaparellades, comparat amb el grup PBS. §, significat (p<0,05) en un test t de Student de dues cues desaparellades, comparat amb el grup ICOVIR-15.

Adicionalment, en un hemograma comparatiu entre els hàsters injectats amb ICOVIR-15K i ICOVIR-15, es van observar diferències significatives en les concentracions de neutròfils i monòcits, reduint ICOVIR-15K en 3,5 vegades i 3 vegades, respectivament, l'elevació de les concentracions observada després de l'administració d'ICOVIR-15 (**Figura 50**). A més, ICOVIR-15K també reduí a la meitat l'elevació de basòfils, tot i que aquesta diferència no resultà significativa.

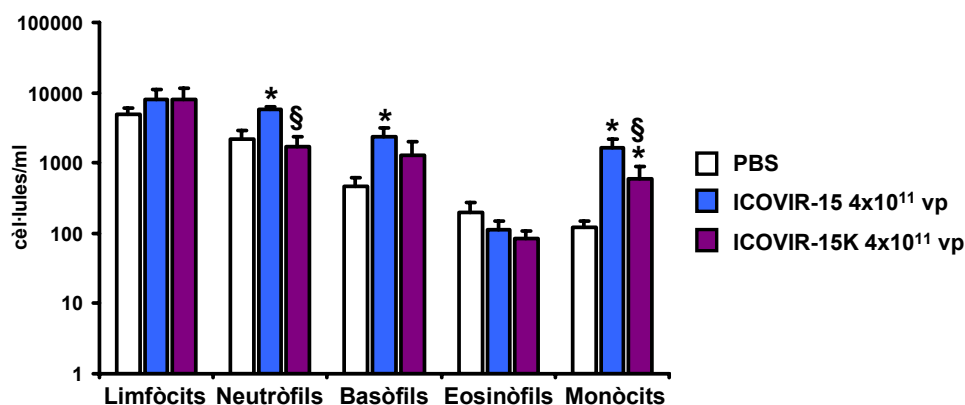


Figura 50. Hemograma dels hàsters injectats amb ICOVIR-15K. Concentració de limfòcits, neutròfils, basòfils, eosinòfils i monòcits en sang de hàsters siris a dia 5 després de la injecció sistèmica de PBS, ICOVIR-15 o ICOVIR-15K. n= 5 hàsters per grup. Les barres d'error +SD s'indiquen a la figura. *, significat ($p < 0,05$) en un test t de Student de dues cues desaparellades, comparat amb el grup PBS. §, significat ($p < 0,05$) en un test t de Student de dues cues desaparellades, comparat amb el grup ICOVIR-15K.

4.3. ACTIVITAT ANTITUMORAL D'ICOVIR-15K

4.3.1. Citotoxicitat d'ICOVIR-15K

Al treball anterior realitzat al nostre grup amb el vector no replicatiu que incorpora el motiu RGDK al cos de la fibra, es va descriure un augment de la infectivitat a cèl·lules tumorals (Bayo-Puxan *et al.*, 2009). Per determinar si aquest augment de la infectivitat es tradueix en un augment de la capacitat per lisar cèl·lules tumorals, es va testar la citotoxicitat d'ICOVIR-15K a diferents línies tumorals. Les cèl·lules es van infectar amb un ampli rang de MOI i a dia 5-8 després de la infecció es va determinar el tant per cent de supervivència cel·lular i es va calcular la IC₅₀ per cada virus i cada línia cel·lular. Com es pot observar a la **Figura 51**, ICOVIR-15K no va resultar millor en cap de les línies tumorals testades, sent fins i tot pitjor a la línia d'adenocarcinoma pancreàtic NP-9.

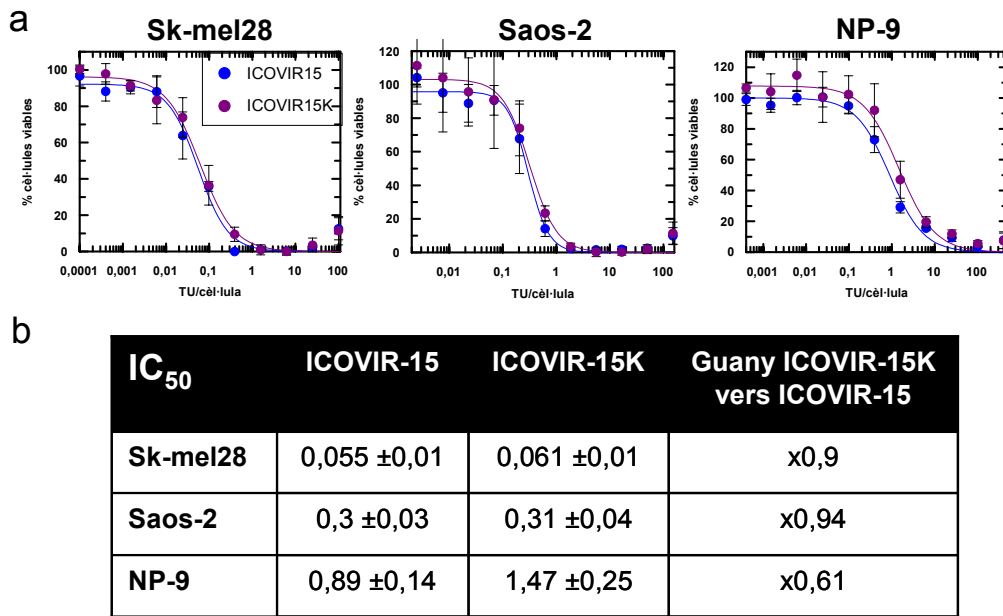


Figura 51. Capacitat citotòxica d'ICOVIR-15K a cèl·lules tumorals. Les línies tumorals Sk-mel28 (melanoma), Saos-2 (osteosarcoma) i NP-9 (pàncrees) van ser infectades amb un rang de dosis des de 500 MOI fins a 0,0001 MOI (TU/cèl·lula). A dia 5-8 post-infecció, es va procedir a la determinació de la viabilitat cel·lular. (a) Corba dosi-resposta. Les barres d'error \pm SD s'inidquen a cada punt. (b) Taula amb els valors de IC₅₀ obtinguts, expressats com TU/cèl·lula necessàries per matar el 50% de les cèl·lules en cultiu. Les ràtios entre les IC₅₀ d'ICOVIR-15K i ICOVIR-15 es troben també indicades a la taula.

4.3.2. Quantitat de virus en sang després de l'administració d'ICOVIR-15K

A més de l'augment de la infectivitat de cèl·lules tumorals, al treball anterior publicat al nostre grup també es va descriure un augment de la quantitat de virus que transduïa el tumor (Bayo-Puxan *et al.*, 2009). Aquest augment es pot deure a l'increment de la infectivitat descrit anteriorment, però també es pot deure a un augment de la quantitat de virus que arriba al tumor gràcies a la modificació de la fibra. Per determinar si després de l'administració d'ICOVIR-15K hi ha un increment de la virèmia en sang, vàrem injectar ratolins Balb/C immunocompetents amb 5×10^{10} partícules virals d'ICOVIR-15K o d'ICOVIR-15 i, passades 6 hores després de l'administració, es va treure sang per quantificar la càrrega viral circulant. Tal i com es mostra a la **Figura 52**, la quantitat d'ICOVIR-15K circulant en sang era 3,2 vegades superior a la quantitat circulant d'ICOVIR-15. Aquest augment de la virèmia en sang pot provocar un augment de la quantitat de virus que arriba al tumor, una millor distribució per la massa tumoral i traduir-se en una millor activitat antitumoral.

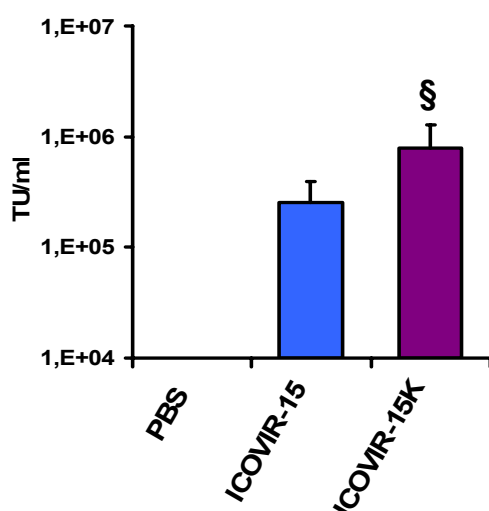


Figura 52. Virèmia en sang després de l'administració d'ICovIR-15K. Es van injectar ratolins Balb/C immunocompetents amb PBS o 5×10^{10} partícules virals d'ICovIR-15 o d'ICovIR-15K. A les 6 hores post-injecció, es va treure sang als ratolins a través d'un tall a la cua i es va titular la quantitat de virus al sèrum pel mètode de la tinció de la proteïna hexó. Els resultats s'expressen com TU (unitats de transducció) per ml de sèrum. $n = 5$ ratolins per grup. Les barres d'error $+SD$ s'indiquen a la figura. §, significativament ($p < 0,05$) en un test t de Student de dues cues desaparellades, comparat amb el grup ICovIR-15.

4.3.3. Activitat antitumoral *in vivo* d'ICovIR-15K

Per testar si aquest augment de la virèmia en sang tenia un efecte positiu sobre la potència antitumoral, es van realitzar experiments amb ratolins immunodeprimits als quals els hi vàrem implantar tumors subcutanis de línies tumorals humanes. Un cop els tumors van estar ben formats i varen arribar a una mida de $\sim 100 \text{ mm}^3$, els ratolins es van injectar amb PBS o 5×10^{10} partícules virals d'ICovIR-15K o d'ICovIR-15. Al primer model testat, la línia de melanoma Sk-mel28, el grup injectat amb PBS es va haver de sacrificar a dia 36 després de l'administració degut a un creixement incontrolat i a ulceracions dels tumors (**Figura 53a**). En canvi, els tumors dels ratolins injectats amb els dos virus van mantenir un creixement controlat fins a dia 60, quan els tumors del grup injectat amb ICovIR-15 van començar a créixer exponencialment. Al dia final de l'experiment (dia 79), el grup injectat amb ICovIR-15K presentava una reducció significativa de la mida dels tumors de 3 cops respecte el grup injectat amb ICovIR-15. Al segon model, la línia de carcinoma de pàncrees NP-18, de creixement molt més ràpid que el model anterior, el grup injectat amb PBS es va haver de sacrificar a dia 27 després de l'administració (**Figura 53b**). Els grups injectats amb ICovIR-15 i ICovIR-15K van comportar-se de manera similar a l'anterior model, però amb un creixement més accelerat en el temps. Els dos grups van créixer de manera similar fins a dia 21, quan el grup ICovIR-15 va patir un creixement exponencial, fins a dia 39 post-injecció, quan el grup ICovIR-15 havia crescut 5,1 vegades més que el grup ICovIR-15K. Per últim, al model de la línia de carcinoma de pàncrees NP-9, els ratolins injectats amb PBS es van sacrificar a dia 60 després de l'administració degut a una ulceració important de gran part dels tumors (**Figura 53c**). El tractament amb ICovIR-15K va reduir unes 15 vegades la mida dels

tumors del grup PBS, mentre que a dia 74 la reducció va ser de 3 vegades comparada amb el tractament amb ICOVIR-15, arribant fins i tot a desaparèixer 3 dels 10 tumors tractats amb ICOVIR-15K.

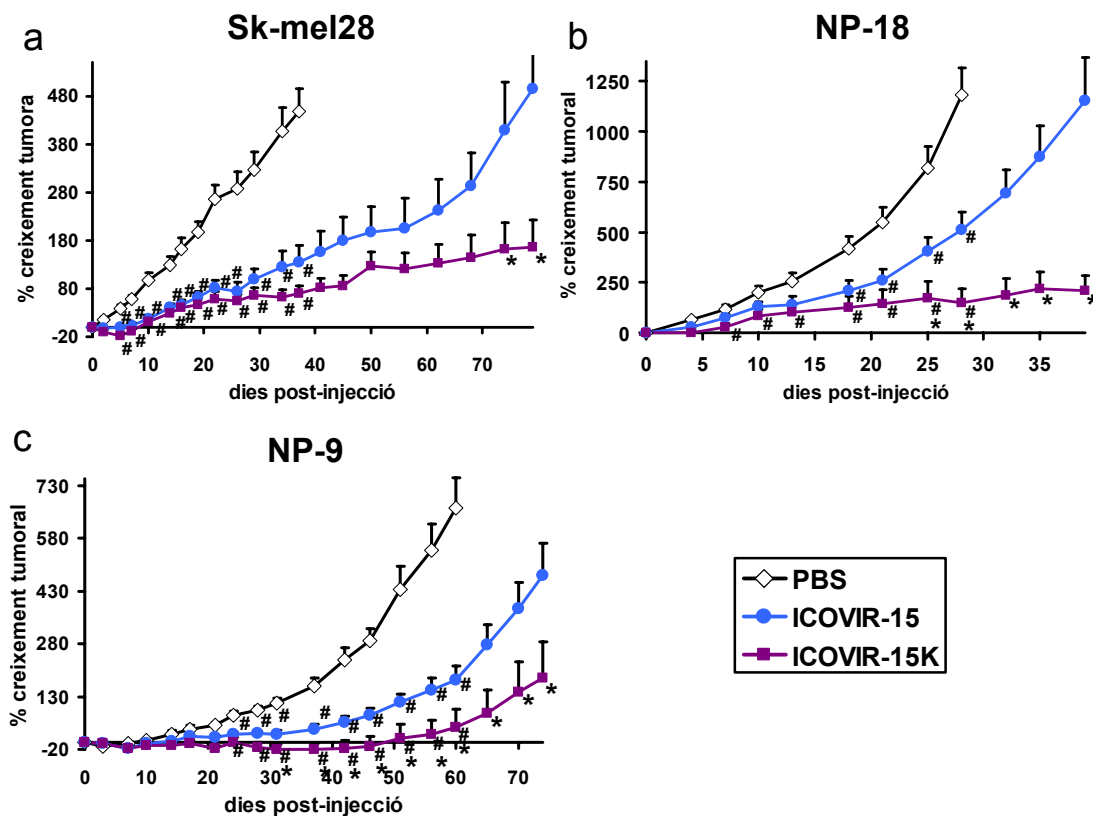


Figura 53. Eficàcia sistèmica antitumoral d'ICOVIR-15K. Ratolins *nude* amb tumors xenògrafs (~100 mm³) de Sk-mel28 (a), NP-18 (b) o NP-9 (c) es van randomitzar i injectar amb una única dosi de PBS o 5x10¹⁰ partícules virals d'ICOVIR-15 o ICOVIR-15K. n=10-16 tumors per grup. A les gràfiques es mostra el percentatge de creixement tumoral respecte el dia de tractament +SD. #, significant (p<0,05) en un test t de Student de dues cues desaparellades, comparat amb el grup PBS. *, significant (p<0,05) en un test t de Student de dues cues desaparellades, comparat amb el grup ICOVIR-15.

4.3.4. Supervivència de ratolins amb tumors subcutanis

A més de reduir significativament el creixement dels tumors respecte el grup ICOVIR-15, el tractament amb ICOVIR-15K també va ser capaç d'augmentar la supervivència de ratolins amb diferents models de tumors subcutanis. Tal i com es mostra a la **Figura 54a**, la vida mitja dels ratolins amb tumors Skmel-28 va ser de 22 dies. En canvi, després d'administrar sistèmicament ICOVIR-15, la vida mitjà es va triplicar, arribant fins als 68 dies; encara més, la vida mitja dels

ratolins tractats amb ICOVIR-15K va arribar fins als 84 dies, encara que aquesta diferència no resultà estadística respecte el grup ICOVIR-15. Al model NP-18 (**Figura 54b**), la vida mitja dels ratolins tractats amb PBS només fou de 10 dies, arribant fins als 23 quan els ratolins eren tractats amb ICOVIR-15. Quan ratolins amb aquest mateix tipus de tumors van ser tractats amb ICOVIR-15K, la vida mitja arribà fins als 39 dies, resultant estadísticament significativa la diferència amb el grup ICOVIR-15. Per últim, en el model NP-9, el tractament amb ICOVIR-15 incrementà la supervivència mitja dels ratolins tractats amb PBS de 51 a 70 dies. Amb el tractament amb ICOVIR-15K, la supervivència es va incrementar estadísticament respecte el grup PBS i el grup ICOVIR-15 fins als 105 dies, doblant la supervivència dels ratolins tractats amb PBS.

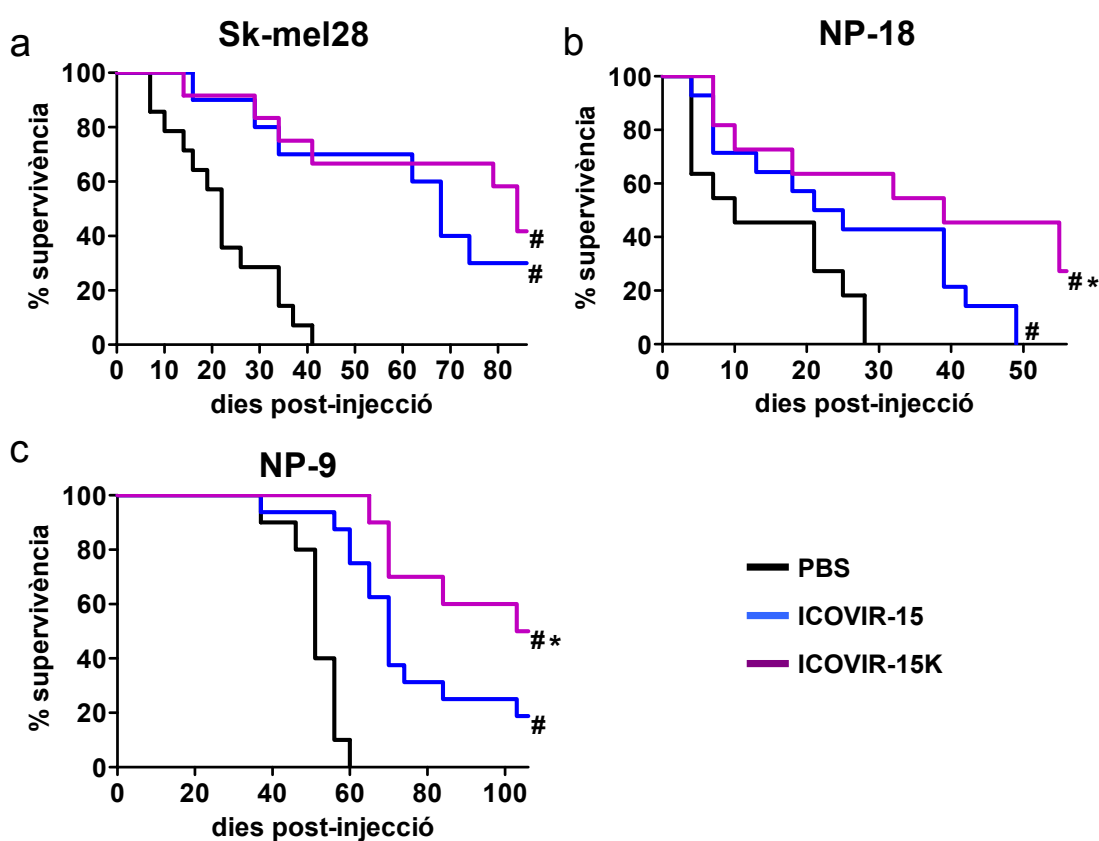


Figura 54. Supervivència de ratolins amb tumors subcutanis tractats amb ICOVIR-15K. Corbes Kaplan-Meier de supervivència dels ratolins amb tumors Sk-mel28 (a), NP-18 (b) o NP-9 (c) injectats amb PBS o amb 5×10^{10} partícules virals d'ICOVIR-15K o ICOVIR-15. El criteri de punt final es va establir a un volum tumoral de 500 mm^3 . #, significant ($p < 0,05$) en un test log-rank comparat amb el grup tractat amb PBS. *, significant ($p < 0,05$) en un test log-rank comparat amb el grup tractat amb ICOVIR-15.

