



# Estratègies de millora de la potència antitumoral dels adenovirus oncolítics basades en l'increment de l'alliberament viral i l'extravasació vascular

Cristina Puig Saus

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) i a través del Dipòsit Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) y a través del Repositorio Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) service and by the UB Digital Repository ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

**ESTRATÈGIES DE MILLORA DE LA POTÈNCIA  
ANTITUMORAL DELS ADENOVIRUS  
ONCOLÍTICS BASADES EN L'INCREMENT DE  
L'ALLIBERAMENT VIRAL I L'EXTRAVASACIÓ  
VASCULAR**

**Cristina Puig Saus**

**2013**



**ESTRATÈGIES DE MILLORA DE LA POTÈNCIA  
ANTITUMORAL DELS ADENOVIRUS ONCOLÍTICS  
BASEDES EN L'INCREMENT DE L'ALLIBERAMENT  
VIRAL I L'EXTRAVASACIÓ VASCULAR**

Memòria presentada per

**Cristina Puig Saus**

Beneficiària de la beca predoctoral per la formació en investigació en salut  
(PFIS). FI08/00163 i adscrita al Programa de doctorat en Biomedicina

Per optar al grau de

**Doctora per la Universitat de Barcelona**

Tesi realitzada sota la codirecció del Dr. Ramon Alemany Bonastre i el Dr. Manel  
Cascalló Piqueras del Laboratori de Recerca Translacional de l'Institut de Català  
d'Oncologia i Institut de d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (ICO-IDIBELL)

Els directors de la tesi      L'autora

Ramon Alemany Bonastre   Manel Cascalló Piqueras   Cristina Puig Saus



# INDEX

<b>Índex</b> .....	5
<b>Abreviatures</b> .....	7
<b>Introducció</b> .....	13
1. Càncer.....	15
2. Viroteràpia del càncer.....	16
3. Viroteràpia amb adenovirus.....	20
3.1 Experiència clínica amb adenovirus oncolítics.....	20
3.2 L'adenovirus. Característiques generals.....	23
3.2.1 Estructura del virió.....	25
3.2.2 Estructura del genoma.....	26
3.2.3 Cicle viral.....	27
3.2.3.1 Adsorció i entrada a la cèl·lula hoste.....	27
3.2.3.2 Expressió de gens primerencs.....	28
3.2.3.3 Interacció amb l'hoste: inhibició de la resposta immune antiviral.....	29
3.2.3.4 Replicació de l'ADN viral, expressió de gens tardans i lisi de la cèl·lula infectada.....	31
3.3 Disseny d'adenovirus selectius de tumor.....	32
3.3.1 Deleció de funcions virals complementades a la cèl·lula tumoral.....	33
3.3.2 <i>Targeting</i> transcripcional i traduccional.....	34
3.3.3 <i>Targeting</i> transduccional.....	35
3.4 ICOVIR-15 i ICOVIR-15K.....	36
3.5 Limitacions de la viroteràpia.....	38
3.5.1 Arribada del virus al tumor.....	38
3.5.2 Estratègies per millorar l'arribada del virus al tumor.....	40
3.5.2.1 Estratègies per disminuir la neutralització del virus per les proteïnes de la sang i la retenció al fetge (Detargeting).....	41
3.5.2.2 Estratègies per redireccionar el virus al tumor ( <i>Targeting</i> tumoral).....	42
3.5.2.3 Vasculatura tumoral com a diana per millorar l'arribada del virus al tumor.....	44
a) El pèptid RGD i les integrines.....	45
b) El pèptid iRGD i la Neuropilina-1.....	46
3.5.3 Disseminació intratumoral del virus.....	48

3.5.4 Estratègies per incrementar la disseminació intratumoral del virus.....	49
3.5.4.1 Ús d'enzims degradadors de la matriu i increment de la permissivitat dels CAFs.....	49
3.5.4.2 Augment de l'alliberament viral de la cèl·lula infectada.....	49
a) Sobreexpressió d'ADP.....	50
b) Inducció de l'apoptosi.....	50
c) Bioselecció de mutacions.....	50
3.5.5 Activació de la resposta immune.....	53
3.5.6 Altres estratègies per augmentar la potència adenoviral. Augment de la citotoxicitat.....	54
3.6 Model animal per la caracterització dels adenovirus oncolítics <i>in vivo</i> .....	55
<b>Objectius</b> .....	57
<b>Resultats</b> .....	61
Informe dels directors sobre el factor d'impacte dels articles publicats.....	63
Resum Article 1. Bioselecció de la truncació de l'i-leader de l'adenovirus en fibroblasts associats a tumor per superar les barreres de l'estroma tumoral.....	67
Article 1.....	69
Resum Article 2. La combinació de la truncació de l'i-leader amb gemcitabina millora l'eficàcia dels adenovirus oncolítics en un model immunocompetent.....	83
Article 2.....	85
Resum Article 3. El verapamil augmenta l'eficàcia antitumoral dels adenovirus oncolítics.....	117
Article 3.....	119
Resum Article 4. La inserció del pèptid de penetració tumoral iRGD en un adenovirus oncolíctic augmenta la transducció tumoral, la disseminació intratumoral i l'eficàcia antitumoral.....	131
Article 4.....	133
<b>Discussió</b> .....	161
<b>Conclusions</b> .....	189
<b>Bibliografia</b> .....	193
<b>Apèndix</b> .....	219

## ABREVIATURES

<b>5'-FU</b>	5'-fluorouracil
<b>Å</b>	Ångström
<b>aa</b>	Aminoàcid
<b>AAALAC</b>	De l'anglès, <i>Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care</i>
<b>Ab</b>	Anticòs
<b>Ad</b>	Adenovirus
<b>Ad5/Adwt</b>	Adenovirus salvatge del serotip 5
<b>AdGL</b>	Vector adenoviral amb la proteïna de fusió GFP-luciferasa
<b>ADN/DNA</b>	Àcid desoxiribonucleic
<b>ADP</b>	De l'anglès, <i>Adenovirus death protein</i>
<b>AdTL</b>	Vector adenoviral Track-Luc
<b>Adwt-RGD</b>	Adenovirus 5 amb la inserció del pèptid RGD al HI-loop
<b>ALT</b>	Alanino transaminasa
<b>ARM</b>	Material de referència de l'adenovirus
<b>ARN</b>	Àcid ribonucleic
<b>ARNm</b>	Àcid ribonucleic missatger
<b>AST</b>	Aspartat transaminasa
<b>ATCC</b>	De l'anglès, <i>American type culture collection</i>
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfat
<b>BCA</b>	Bicinchoninic acid
<b>Bcl-2</b>	De l'anglès, <i>B-cell lymphoma 2</i>
<b>bp</b>	Parell de bases
<b>BSA</b>	Albúmina bovina
<b>C4BP</b>	Proteïna de unió a la proteïna del complement 4
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Calci
<b>CAF</b>	Fibroblasts associats a tumor
<b>CAR</b>	Receptor del Coxsackie virus i l'Adenovirus
<b>CD4/CD8</b>	De l'anglès, <i>cluster of differentiation 4 i 8</i>
<b>CDI</b>	Índex de divisió cel·lular
<b>CE</b>	Extracte cel·lular
<b>CEA</b>	Antigen carcinoembriònic
<b>Cèl·lules NK</b>	De l'anglès, <i>cèl·lules Natural Killers</i>
<b>CendR</b>	C-end rule, regla del C-terminal
<b>CFSE</b>	Carboxyfluoresceïn succinimidyl ester
<b>CMV</b>	Citomegalovirus



<b>CO<sup>2</sup></b>	Diòxid de carboni
<b>ConA</b>	Concanavalina A
<b>CPE</b>	Efecte citopàtic
<b>cPLA2</b>	Fosfolipasa A2 citoplasmàtica
<b>CR1/2/3</b>	Regió conservada 1/2/3 de la proteïna E1A
<b>CR1/CR3</b>	Receptor del complement 1/3
<b>CRT</b>	Calreticulina
<b>CTL</b>	Limfòcit citotòxic
<b>CTLA-4</b>	De l'anglès, <i>cytotoxic T-lymphocyte antigen 4</i>
<b>DAB</b>	3'3-Diaminobenzidine
<b>DAMPs</b>	Patrons moleculars associats a perill
<b>DAPI</b>	4_,6-diamino-2-phenylindole
<b>DC</b>	Cèl·lula dendrítica
<b>DMEM</b>	De l'anglès, <i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
<b>DTH</b>	Hipersensibilitat retardada
<b>DTT</b>	Dithiothreitol
<b>E1, E2, E3, E4</b>	Unitats de transcripció temprana de l'adenovirus
<b>E2F</b>	Factor de transcripció E2
<b>EBM</b>	De l'anglès, <i>Eagle's basal medium</i>
<b>ECM</b>	Matriu extracel·lular
<b>efecte EPR</b>	De l'anglès, <i>enhanced permeabilization and retention effect</i>
<b>EGTA</b>	Àcid etilenglicol bis (B-aminoetilèter)-N,N,N,N-tetracètic
<b>eIF4E</b>	Factor eucariòtic d'inici de la traducció 4E
<b>ER</b>	Reticle endoplasmàtic
<b>FasL</b>	Lligand de Fragment estimulator d'apoptosis
<b>FasL</b>	Fragment estimulator d'apoptosi
<b>FBS</b>	Suero fetal boví
<b>FVII/FIX/FX</b>	Factors de coagulació sanguínia VII/XI/X
<b>GALV</b>	Virus de la leucèmia del gibó
<b>GFP</b>	De l'anglès, <i>green fluorescent protein</i>
<b>GMCSF</b>	Factor estimulator de la formació de colònies de granulòcits i macròfags
<b>h.p.i</b>	Hores post infecció
<b>hEGF</b>	De l'anglès, <i>human endothelial growth factor</i>
<b>HEK293</b>	De l'anglès, <i>human embryonic kidney 293 cells</i>
<b>HIV</b>	Virus de la immunodeficiència humana
<b>HLA-I</b>	Antigen leucocitari humà
<b>HMGB1</b>	De l'anglès, <i>High-mobility group box 1</i>

---

<b>HSP70</b>	Proteïna de shock termic-70
<b>HSPG</b>	Heparan sulfat proteoglicans
<b>HSV</b>	Virus de l'herpes simple
<b>hTERT</b>	Transcriptasa reversa de la telomerasa humana
<b>HUVEC</b>	De l'anglès, <i>Human umbilical vein endothelial cells</i>
<b>HVR-5</b>	Regió hipervariable-5 de l'hexó
<b>i.t</b>	Intratumoral
<b>i.v</b>	Endovenós
<b>IC<sub>50</sub></b>	Concentració inhibidora 50%
<b>ICD</b>	Mort cel·lular immunogènica
<b>ICOVIR-15i</b>	ICOVIR-15 amb la inserció de la mutació iLG397T
<b>IFN-<math>\alpha/\beta/\gamma</math></b>	Interferó- $\alpha/\beta/\gamma$
<b>IL</b>	Interleuquina
<b>iMC o MDSC</b>	Cèl·lules mieloides immadures o cèl·lules supressores derivades del llinatge hematopoiètic
<b>iRGD</b>	Pèptid RGD internalitzador
<b>ITR</b>	Seqüència terminal invertida
<b>IVIS</b>	De l'anglès, <i>in vivo imaging system</i>
<b>KDa</b>	KiloDalton
<b>Kg, g, mg, <math>\mu</math>g, ng</b>	Kilogram, Gram, mil·ligram, microgram i nanògram
<b>L, mL, <math>\mu</math>L, mm<sup>3</sup></b>	Litre, mil·lilitre, microlitre, mil·límetres cúbics
<b>LU</b>	Unitats de luciferasa
<b>M, mM, <math>\mu</math>M, nM</b>	Molar, mil·limolar, micromolar i nanomolar
<b>m.o.i</b>	Multiplicitat d'infecció
<b>MEM</b>	De l'anglès, <i>Minimum essential medium</i>
<b>MHC-I</b>	Complex major d'histocompatibilitat de classe I
<b>miARN</b>	Micro-ARN
<b>MICA/MICB</b>	De l'anglès, <i>MHC-I chain related proteins A i B</i>
<b>min</b>	Minut
<b>MLP</b>	Promotor major tardà
<b>mm, <math>\mu</math>m, nm</b>	Mil·límetres, micròmetres, nanòmetres
<b>MMP</b>	Metal·loproteïnasa
<b>MTT</b>	Thiazolyl blue tetrazolium bromide
<b>MV</b>	Virus de les galteres
<b>Nabs</b>	Anticossos neutralitzants
<b>NDV</b>	Virus de la malaltia de Newcastle
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	De l'anglès, <i>Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells</i>

<b>NKG2D</b>	Receptors activadors de les cèl·lules NK
<b>NLRP3</b>	De l'anglès, <i>NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3</i>
<b>nm, µm</b>	Nanòmetre, micròmetre
<b>NRP-1</b>	Neuropilina-1
<b>°C</b>	Graus centígrads
<b>OD</b>	Densitat òptica
<b>OMS</b>	Organització mundial de la Salut
<b>PAMPs</b>	Patrons moleculars associats a patogen
<b>PARP</b>	De l'anglès, <i>poly ADP (adenocine diphosphate)-Ribose Polymerase</i>
<b>PBMCs</b>	Cèl·lules mononuclears de sang perifèrica
<b>PBS</b>	tampó isotònic a base de fosfats
<b>PCR</b>	Reacció en cadena de la polimerasa
<b>PEG</b>	Polietilenglicol
<b>pfu</b>	Unitat formadora de calbes
<b>PHMA</b>	De l'anglès, <i>phenyl methacrylate</i>
<b>pRb</b>	Proteïna del retinoblastoma
<b>PRR</b>	Receptors de reconeixement de patró
<b>PS</b>	Penicil·lina-estreptomicina
<b>PSA</b>	Antigen específic de pròstata
<b>qPCR</b>	PCR quantitativa
<b>Radiance</b>	Unitat de llum (photons/segon/cm <sup>2</sup> /sr)
<b>Receptor Fc</b>	Receptors de la regió constant dels anticossos
<b>RID</b>	De l'anglès, <i>receptor internalization and degradation</i>
<b>RPMI 1640</b>	De l'anglès, <i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
<b>scFv</b>	Fragments variables dels anticossos de cadena senzilla
<b>SD</b>	Desviació estàndard
<b>SDS</b>	Dodecilsulfat sòdic
<b>SDS-PAGE</b>	Gel de poliacrilamida en condicions desnaturalitzants
<b>SEM o SE</b>	Error estàndard de la mitja
<b>Sema3A</b>	Semaforina-3A
<b>SN</b>	Sobrenadant
<b>Sp-1</b>	De l'anglès, <i>Specificity Protein 1</i>
<b>SR-A</b>	Receptor Scavenger-A
<b>SSP</b>	Staurosporina
<b>TAP</b>	Transportador associat a la presentació d'antígens
<b>Tat-PTD</b>	Domini de transducció proteic de la proteïna Tat del virus de

---

	la immunodeficiència humana
<b>Th1</b>	Resposta mediada per limfòcits T helper-1
<b>Th2</b>	Resposta mediada per limfòcits T helper-2
<b>TK</b>	Timidina quinasa
<b>TLR</b>	Receptor toll-like
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosi tumoral
<b>TP</b>	Proteïna terminal
<b>TRAIL</b>	De l'anglès <i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
<b>TRAIL-R1/R2</b>	Receptors de TRAIL
<b>TU</b>	Unitat de transducció
<b>uPAR</b>	De l'anglès, <i>urokinase type plasminogen activator receptor</i>
<b>UPR</b>	De l'anglès, <i>unfolded protein response</i>
<b>UTR</b>	Regió no traduïda
<b>UV</b>	Llum ultravioleta
<b>VEGF</b>	De l'anglès <i>Vascular endothelial growth factor</i>
<b>VEGFR</b>	Receptor del VEGF
<b>vp</b>	Partícula viral
<b>VSV</b>	Virus de l'estomatitis vesicular
<b>WNV</b>	Virus del Nil Occidental
<b><math>\alpha</math>-SMA</b>	De l'anglès, <i><math>\alpha</math>-smooth muscle actin</i>
<b><math>\Psi</math></b>	Seqüència d'empaquetament

**Aminoàcids**

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

**Nucleòtids**

**A** Adenina   **T** Timina   **C** Citosina   **G** Guanosina   **U** Uracil



## **Introducció**



## 1. CÀNCER

Segons l'observatori global de la salut de l'organització mundial de la salut (OMS) el càncer és la principal causa de mort a nivell mundial, amb 7.6 milions de morts que representen el 13% segons dades del 2008 i s'estima que la incidència augmentarà fins a 13.1 milions de morts el 2030 (Globocan 2008, IARC 2010). Tot i les millores en la prevenció i diagnòstic temprà, el càncer segueix sent un greu problema de salut pública.

El càncer compren un conjunt de malalties degudes al creixement cel·lular desmesurat d'un grup de cèl·lules que dona lloc a la formació d'un tumor primari maligne. Aquest envaeix el teixit i sovint origina metàstasis. La metàstasis és la disseminació per via limfàtica o sanguínia de les cèl·lules tumorals per l'organisme implantant-se i creixent en localitzacions distants al tumor primari.

La cèl·lula tumoral a través de varies mutacions adquireix un conjunt de propietats que li permeten el creixement desmesurat i l'establiment de tumors malignes i metastàtics. Clàssicament les propietats assignades a la cèl·lula tumoral són: i) l'activació sostinguda de les vies de proliferació cel·lular i la inactivació de les vies reguladores d'aquest creixement, ii) la immortalitat, iii) la resistència a l'apoptosi o senescència induïda per l'excessiva replicació, els danys a l'ADN i altres senyals d'estrès a les que està sotmesa la cèl·lula tumoral, iv) la pèrdua de la inhibició per contacte, v) l'activació de l'angiogènesi i vi) el guany de capacitat invasiva i de metàstasi. Aquestes propietats són adquirides per la cèl·lula tumoral gràcies bàsicament a la inestabilitat genètica i a l'estat inflamatori en el que es troba la lesió tumoral, que promouen la seva progressió. Més recentment però s'han establert dues noves característiques de les cèl·lula tumoral que són: i) l'alteració del metabolisme cel·lular per donar suport al creixement i proliferació cel·lular continuus i ii) l'evasió per diversos mecanismes del reconeixement i eliminació de les cèl·lules tumorals per part del sistema immune (Hanahan and Weinberg 2011).

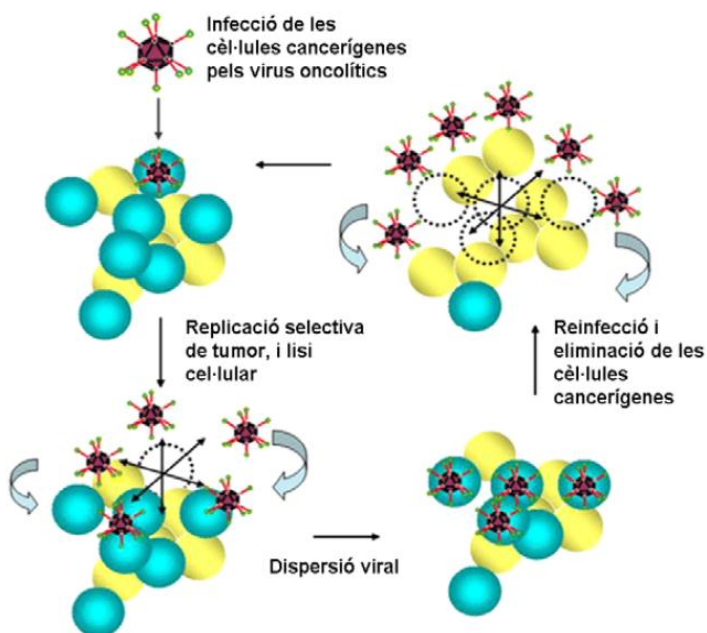
Les teràpies convencionals són la cirurgia, la radioteràpia i la quimioteràpia, que tenen èxit per tumors localitzats i en les fases inicials de la malaltia. Més recentment s'han aprovat teràpies dirigides específiques contra dianes de la cèl·lula tumoral que disminueixen la toxicitat pel teixits sans i els efectes secundaris. Dins d'aquests fàrmacs trobem els inhibidors dels receptors d'hormones, de tirosina quinases i els seus receptors, i d'altres vies de senyalització així com els inhibidors del proteasoma que bloquegen la proliferació i indueixen l'apoptosi de la cèl·lula tumoral. També les teràpies antiangiogèniques que bloquegen la formació de nous



vasos limitant l'arribada d'oxigen i nutrients a la cèl·lula tumoral i en conseqüència el creixement. També s'han aprovat drogues que activen el sistema immune per destruir les cèl·lules del tumor i anticossos monoclonals conjugats a molècules tòxiques pel tractament sobretot de leucèmies i limfomes. Tot i això aquestes teràpies dirigides tenen el potencial de crear resistències per això s'utilitzen en combinació amb teràpies estàndard. Per tal d'augmentar l'eficàcia del tractament en malalties disseminades i evitar la generació de resistències s'estan desenvolupant noves teràpies com la immunoteràpia, les vacunes antitumorals, la teràpia gènica i la viroteràpia.

## 2. VIROTERÀPIA DEL CÀNCER.

La viroteràpia del càncer és un tractament antitumoral que consisteix en la lisi selectiva de la cèl·lula tumoral per part d'un agent viral. Aquesta teràpia requereix que el virus arribi al tumor, infecti les cèl·lules tumorals i tingui lloc una ronda de replicació viral productiva. Com a conseqüència, la cèl·lula tumoral serà lisada i la progènie viral serà alliberada al medi extracel·lular on podrà infectar les cèl·lules tumorals veïnes. Així s'aniran produint varies rondes de replicació selectiva fins a eliminar la totalitat de la massa tumoral (**figura 1**).



**Figura 1. Viroteràpia del càncer.** El virus arriba i infecta algunes cèl·lules de la massa tumoral. En aquestes cèl·lules té lloc la replicació viral selectiva de tumor, la lisi cel·lular i l'alliberament del virus al medi extracel·lular. El virus alliberat es dispersa per la massa tumoral i infecta noves cèl·lules on té lloc el mateix procés. Així es donen múltiples rondes de replicació viral que eliminaran la totalitat de la massa tumoral. Modificat de Hedley *et al* 2006 (Hedley, Chen et al. 2006).

Els adenovirus oncolítics presenten principalment dos avantatges respecte les drogues químiques: i) poden actuar en absència d'una diana, per exemple en absència de supressors de tumor, mentre que les drogues químiques necessiten

---

una diana activa, ii) tenen la capacitat d'autoamplificar-se, així no és necessari administrar una dosi inicial que arribi a totes les cèl·lules del tumor (Alemany 2007).

La viroteràpia del càncer neix de l'observació de regressions tumorals de curta durada associades a infeccions virals espontànies en pacients, majoritàriament amb malalties hematològiques com leucèmia i limfoma. Dock al 1904 va descriure 65 casos de pacients amb leucèmia que presentaven regressions temporals després d'una infecció viral (Dock 1904). Al 1912 DePace va observar la regressió notable d'un tumor de coll d'úter en una pacient després de rebre la vacuna de la ràbia, i va ser el primer a atribuir-li aquest efecte a la oncòlisi causada pel virus (DePace 1912). Fruit d'aquestes observacions a principis del segle XX es va començar a explorar la possibilitat de l'ús dels virus com agents terapèutics. Així el primer assaig clínic amb viroteràpia va tenir lloc al 1949 per Hoster i col·laboradors en 22 pacients de limfoma de Hodgkin tractats amb sèrum o extractes tissulars de pacients infectats per hepatitis. Del total de pacients tractats 7 van mostrar una millora de la seva malaltia (Hoster 1949). Durant els 10 anys següents múltiples assajos clínics amb diferents virus com el virus de l'Epstein Barr, el virus del Nil Occidental (en anglès, *West Nile virus*, WNV), l'adenovirus o el virus de les galteres (en anglès, *measles virus*, MV) es van dur a terme en diferents tipus de càncers terminals. Tot i les respostes parcials observades, l'interès en la viroteràpia va decaure degut a la baixa eficàcia i als efectes secundaris observats (Kelly and Russell 2007).

Després dels efectes adversos observats en els primers assaigs clínics, la recerca en viroteràpia es va centrar en disminuir el potencial patogènic d'aquests agents. La primera aproximació va ser hipotetitzada per Moore i Southam quan van utilitzar l'evolució dirigida per obtenir virus més oncolítics o tumor-específics (Moore 1952). Finalment als 90s els avenços en les tècniques d'ADN recombinant i el coneixement sobre la biologia dels virus van fer possible la manipulació del genoma viral per aconseguir agents amb baixa patogenicitat pels teixits normals i alta capacitat oncolítica. Martuza i col·laboradors van ser pioners en aquest camp, delectant el gen de la timidina quinasa (TK) del genoma del virus de l'herpes simple (en anglès, *herpes simplex virus*, HSV). Aquesta delectió li conferia selectivitat tumoral al virus de manera que només podia replicar en cèl·lules en divisió. Aquest virus va ser proposat pel tractament del glioma (Martuza, Malick et al. 1991). Durant aquest període també va ressorgir l'interès pels virus que presentaven un oncotropisme natural. És el cas del reovirus, la replicació del qual depèn de l'activació de la via de Ras (Strong, Coffey et al. 1998) o el virus de

l'estomatitis vesicular (en anglès, *vesicular stomatitis virus*, VSV) (Stojdl, Lichty et al. 2000) i el virus de la malaltia de Newcastle (en anglès, *Newcastle disease virus*, NDV) (Reichard, Lorence et al. 1992) que repliquen selectivament en cèl·lules que presenten defectes en la via de l'interferó.

Els últims 20 anys de recerca tant a nivell pre-clínic com clínic han donat lloc al disseny de virus suficientment selectius per aconseguir que la toxicitat i els efectes secundaris ja no siguin una limitació de la viroteràpia. Tot i que l'eficàcia observada és limitada, augmenta al establir protocols combinats amb quimioteràpia i radioteràpia (Liu, Galanis et al. 2007; Alemany 2012). Els virus més emprats són el reovirus, el vaccinia virus, el virus de l'herpes simple (HSV) i l'adenovirus. A l'actualitat s'estan realitzant múltiples assaigs clínics amb virus oncolítics dels que destaquen un reovirus (el Reolysin de la companyia Oncolytic Biotech (Karapanagiotou, Roulstone et al. 2012)) i un herpes virus (Oncovex-GMCSF de la companyia Amgen) (Senzer, Kaufman et al. 2009), que es troben en fase clínica III i per tant són els més avançats en el desenvolupament clínic; i un vaccinia virus (el JX-594 de la companyia Jennerex Biotherapeutics (Breitbach, Burke et al. 2011)) **(Taula 1)**. Els millors resultats d'eficàcia clínica obtinguts fins avui són amb dos virus que expressen GM-CSF (factor estimulator de la formació de colònies de granulòcits i macròfags, de l'anglès, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor), una molècula immunoestimuladora amb l'objectiu d'augmentar la resposta immune contra el tumor. Amb l'Oncovex-GMCSF administrat intratumoralment en pacients amb melanoma maligne metastàtic s'ha obtingut la regressió completa de les lesions injectades i no injectades en 8 dels 50 pacients tractats (Senzer, Kaufman et al. 2009). També amb el JX-594 administrat intratumoralment en pacients amb carcinoma hepatocel·lular no resecable s'ha obtingut respostes objectives en 3 dels 10 pacients tractats (Park, Hwang et al. 2008). Per administració sistèmica amb el mateix virus s'ha detectat la presència de virus en biòpsies de tumor, però només a les dosis més altes tot i això, l'eficàcia clínica de l'assaig va ser limitada, amb 12 malalties estables i 1 resposta parcial dels 23 pacients tractats (Hedley, Chen et al. 2006; Breitbach, Burke et al. 2011).

Tractament, tipus tumoral (fase clínica)	Pauta d'administració i MTD	Efectes secundaris	N (pacients) % Resposta clínica	Activitat viral Marcadors	Ref
Reovirus + Carboplatin/ Paclitaxel Tumors de Cap i Coll Fase I/II	Iv. No s'arriba a MTD (>3E10 iu)	Neutropènia, Limfopènia, Febre	N=31 3.8%CR 23%PR 35% SD	Cap	(Karapanagiotou, Roulstone et al. 2012)
Newcastle Disease Virus (NDV) soca PV-701 Tumors sòlids Fase I	Iv. = 3E9iu It. = 4E12iu	Síntomes gripals, neutropènia i leucopènia	N=18 22%PR 83%SD	Arribada del virus al tumor demostrada	(Hotte, Lorence et al. 2007)
Measles Virus-CEA Carcinoma d'ovari Fase I	Ip. No s'arriba a la MTD Ip > 1E9 iu (iv >1E9 iu )	Febre	N=21 66%SD	Augment de CEA al sèrum com a marcador de la replicació viral	(Galanis, Hartmann et al. 2012)
Herpes Virus Simple-1 (HSV1) Oncovex-GMCSF Melanoma Fase II	It. No s'arriba a MTD It > 4E6 iu	Síntomes gripals	N=50 20%CR 8%PR 18%SD	Pseudo-progressió i infiltració limfocitària	(Senzer, Kaufman et al. 2009)
Vaccinia Virus JX-594 Varis tumors sòlids Fase I	Iv. No s'arriba a MTD Iv > 2E9 iu	Síntomes gripals, febre, calfreds i hipotensió	N=23 4.3%PR 52% SD	Presència de virus dosis-depenent a biòpsies tumorals	(Breitbach, Burke et al. 2011)
Adenovirus CG7870 Càncer de pròstata Fase I	iv. MTD= 6E12 vp (3E11 iu)	Síntomes gripals, febre, calfreds, transaminitis, limfopènia, trombocitopènia i augment de D-dímer i IL-6	N=23 No resposta	Pics secundaris de virèmia en el 70% dels pacients. Disminució parcial dels nivells de PSA en el 21% dels pacients.	(Small, Carducci et al. 2006)

**Taula 1. Assaigs clínics dels virus més avançats actualment en viroteràpia.** MTD, màxima dosi tolerada; iu, unitats infectives; ip, intraperitoneal; iv, intravenós, it intratumoral; PR, resposta parcial d'acord amb els criteris RECIST; CR, resposta completa; SD, malaltia estable. Adaptat de Alemany, 2012b (Alemany 2012).

### **3. VIROTERÀPIA AMB ADENOVIRUS.**

L'adenovirus va ser descobert per Rowe i col·laboradors el 1953 a partir d'amígdales i ganglis adenoides humans (Rowe, Huebner et al. 1953). Poc després del seu descobriment, es va dur a terme un assaig clínic en 30 pacients amb carcinoma de cèrvix tractades amb diferents serotips adenovirals. Els resultats, igual que amb els altres virus testats, van mostrar una regressió inicial seguida d'una progressió tumoral i una resposta inversament correlacionada amb la resposta immune antiviral (Huebner, Rowe et al. 1956).

El primer adenovirus modificat genèticament per adquirir selectivitat tumoral, el dl1520 (o ONYX-015), va ser descrit pel grup de McCormick dins l'empresa Onyx Pharmaceuticals (Richmond, CA). Aquest virus presenta una deleció de la proteïna E1B/55K, proteïna que s'uneix i inactiva p53 en les cèl·lules normals per iniciar la replicació viral. El virus resultant per tant només pot replicar en cèl·lules que han perdut la funció de p53, una alteració molt freqüent en cèl·lules tumorals, però no en les cèl·lules normals que tindran p53 funcional (Bischoff, Kirn et al. 1996).

#### **3.1 EXPERIÈNCIA CLÍNICA AMB ADENOVIRUS ONCOLÍTIQUES**

Diversos adenovirus oncolítics han estat testats en assaigs clínics, majoritàriament l'ONYX-015. Aquests estudis han demostrat la seguretat de la teràpia amb adenovirus oncolítics, obtenint uns efectes secundaris lleus com símptomes gripals, febre, nàusees, trombocitopènia, transaminitis i leucopènia moderades. No obstant, les respostes observades han estat ocasionals i transitòries. Els primers estudis es van realitzar per administració intratumoral en tumors de cap i coll sol (Ganly, Kirn et al. 2000) o en combinació amb quimioteràpia (Khuri, Nemunaitis et al. 2000; Nemunaitis, Khuri et al. 2001); també en tumors de pàncrees (Mulvihill, Warren et al. 2001; Hecht, Bedford et al. 2003) i sarcomes (Galanis, Okuno et al. 2005). Posteriorment es va provar l'administració intraperitoneal en carcinoma d'ovari (Vasey, Shulman et al. 2002), amb resultats similars a l'administració intratumoral (**Taula 2**)

Tractament Tipus de tumor Fase clínica	Pauta d'administració	Efectes secundaris	N (pacients) Resposta clínica	Ref.
Onyx015 SCCHN (refractari) Fase I	Dosi preparada en el 30% del volum tumoral i administrada en àrees de 1cm <sup>2</sup> . Fins a 1E11 pfu. Re-tractament a les 4 setmanes si no hi ha progressió, fins a 5 cicles.	Síntomes gripals	N = 22 Cap resposta	(Ganly, Kirn et al. 2000)
Onyx015 +Cx SCCHN (refractari) Fase II	1E10pfu/d x 5 en dies consecutius (un quadrant diferent cada dia) +Cisplatí +FU Re-tractament a les 3 setmanes si no hi progressió. Posteriorment 1E10pfu dos cops al dia x 5 dies consecutius + repetició després d'una setmana de descans		N = 30 8CR, 11PR	(Khuri, Nemunaitis et al. 2000)
Onyx015 +Cx SCCHN Fase II	Com l'anterior	No determinat	N = 37 21% PR: 2CR, 3PR.	(Nemunaitis, Khuri et al. 2001)
Onyx015 Tumor de pàncrees (en primera línia en molts pacients) Fase I	3 cohorts determinen que el màxim volum injectat tolerat és el 20% del volum tumoral. Després es fixa la dosi fins a 2x10x1e12vp (1E11pfu) distribuït mitjançant orientació per TC o laparoscòpia. Nombre d'injeccions ajustades en funció del diàmetre tumoral. Cicles de re-tractament cada 4 setmanes	Síntomes gripals (febres, nàusees) 1 Pancreatitis	N = 23 Cap resposta	(Mulvihill, Warren et al. 2001)
Onyx015+Cx Tumor de pàncrees (en primera línia en molts pacients) Fase I/II	Administrant el virus a través de la via gàstrica per ecografia endoscòpica per permetre administracions repetides. Posteriorment fins a 2x10x1e11vp/sesió (als dies 1, 5, 8, 15, 36, 43, 50 i 57) en un 10% del volum tumoral + Gemcitabina iv a dia 36, 43, 50 i 57.	Síntomes gripals 1 PTT, leucopènia	N = 21: 6 (I) i 15 (II) 2PR només amb gemcitabina	(Hecht, Bedford et al. 2003)
Onyx015+Cx Sarcomes Fase I-II	10e9 pfu 1 pacient, 3x10x1e9 a un altre pacient i 10e10 quatre pacients més. Fins a 6 cicles. + Mitomicina, doxorubicina, cisplatí.	Febre	N = 6 1PR	(Galanis, Okuno et al. 2005)
H101 + Cx Varis tumors: 15 SCCHN, 8 Esòfag Fase II	(5e11vp/d x 5 dies consecutius). Cicles de 3 setmanes + Cisplatí o Adriamicina +5FU	Febre (30%) i dolor en el lloc de l'administració (27%)	N = 45 30%RR (3CR, 11PR) N = 15 en HN (1CR i 3 PR).	(Lu, Zheng et al. 2004)

**Taula 2.** Assaigs clínics amb adenovirus oncolítics per administració intratumoral

Tractament Tipus de tumor Fase clínica	Pauta d'administració	Efectes secundaris	N (pacients) Resposta clínica	Ref.
Ad5yCD/mTKrepA +Rx Tumor de pròstata Fase I	10E12 a dia 1x 2, repetició a dia 22. Administració intraprostàtica+ GCV	Transaminitis	N = 9 Biòpsies negatives (78%) millor de l'esperat (60%)	(Freytag, Movsas et al. 2007)
H103 Varis tumors: 11 melanoma, 5 RCC, 5 de pulmó i altres Fase I	Ia: Administració única a dia 1 (fins a 1.5E12vp) Ib: 3x10xE12vp dividit en sis injeccions a dia 1, 3, 5, 8, 10 i 12. Dosi ajustada al 30% del volum tumoral	Febre Trombocitopènia MTD no assolida	N = 27 3PR 18SD DR en 2 pacients de melanoma	(Li, Liu et al. 2009)
KH901 (TelE1a/GMCSF en E3) SCCHN Fase I	Grup de dosis única (3E11vp /E12vp / 3E12 / E13) vs múltiples dosis (dos injeccions setmanals x 3 setmanes)(1E12 o 3x10x1E12 cada vegada)	Febre	N = 23 No OR. Necrosis en els tumors injectats.	(Chang, Zhao et al. 2009)
Telomelysin hTERT-E1aIRESE1b Varis tumors: 4 melanomes, 8 SCC 1 NSCLC Fase I	Fins a 10E12vp/tumor en una administració única però distribuït.	Febre	N = 16 1PR 7SD	(Nemunaitis, Tong et al. 2010)

**Taula 2 (continuació)** Assaigs clínics amb adenovirus oncolítics per administració intratumoral. Vp, partícules virals; pfu, unitats formadores de calva; Cx, quimioteràpia; Rx, radioteràpia; d, dies; w, setmana; iv, intravenós; FU, fluorouracil; PTT, retard en el temps de protrombina; MTD, dosi màxima tolerada; CRC, carcinoma colorectal; HCC, carcinoma hepatocel·lular; SCC, carcinoma de cèl·lules escamoses; NSCLC, carcinoma de pulmó de cèl·lules no petites; mel, melanoma; mets, metàstasis; HN, càncer de cap i coll; RCC, carcinoma renal; TC, tomografia computeritzada; RR, response rate; PR, resposta parcial; CR, Resposta completa; OR, resposta objectiva; SD, malaltia estable; DR, resposta distal. Adaptat d'Alemanya, 2012a (Alemany 2012).

Demostrada la manca de toxicitat per administració intratumoral es va procedir a l'administració sistèmica, tot i que fins avui només dos adenovirus oncolítics s'han administrat sistèmicament l'ONYX-015 i el CG7870. L'ONYX-015 s'ha provat en tumors colorectals, metàstasis pulmonars, carcinomes hepàtics i varis tumors sòlids sol o en combinació amb quimioteràpia. La màxima dosi acumulada administrada ha estat de  $4.2 \times 10^{13}$  vp (Nemunaitis, Cunningham et al. 2001), sense arribar a la dosi limitant. S'han observat efectes tòxics associats a la dosi viral, tot i això, l'activitat antitumoral s'ha limitat a respostes parcials i transitòries i a la disminució d'alguns marcadors tumorals com el CEA (antigen carcinoembriònic) (Habib, Sarraf et al. 2001; Nemunaitis, Cunningham et al. 2001; Reid, Galanis et al. 2001; Reid, Galanis et al. 2002; Hamid, Varterasian et al.

2003). L'adenovirus oncolític CG7870 va ser dissenyat específicament pel càncer de pròstata ja que controla la proteïna E1A viral sota el promotor de la probasina, i la proteïna E1B sota el promotor del PSA (antigen específic de pròstata). Els resultats tant de toxicitat com d'eficàcia són similars als obtinguts amb l'ONYX-015, donant tant sols una disminució del marcador tumoral PSA com a indicatiu de l'efecte antitumoral (Small, Carducci et al. 2006). Els resultats dels diferents assaigs clínics es recullen a la **taula 3**.

Tot i la limitada eficàcia antitumoral mostrada en els assaigs clínics, l'adenovirus oncolític H101 de la companyia Sunway Biotech, molt similar a l'ONYX015 però amb la regió E3 delecionada, ha estat aprovat i comercialitzat a Xina pel tractament de tumors de cap i coll.

### **3.2 L'ADENOVIRUS. CARACTERÍSTIQUES GENERALS**

L'adenovirus presenta varies propietats que el fan un vector interessant per la teràpia gènica i la viroteràpia. Destaquen: i) la baixa patogenicitat (causa refredat, conjuntivitis i gastroenteritis infantil en individus immunocompetents tot i que, en individus immunosuprimits pot provocar infeccions fatals), ii) la possibilitat d'obtenir títols alts durant la seva producció, iii) una relativament alta capacitat per introduir transgens, iv) la capacitat de transduir tant cèl·lules quiescents com en divisió, v) la no integració de l'ADN en el genoma de l'hoste, i vi) un elevat coneixement de la biologia del virus i de les interaccions amb l'hoste que facilita el disseny racional dels virus (McConnell and Imperiale 2004). Aquestes propietats han convertit l'adenovirus en el vector més utilitzat en assaigs clínics en teràpia gènica (Journal of Gene Medicine Website, <http://www.wiley.com//legacy/wileychi/genmed/clinical/>). Tot i això els resultats obtinguts en els assaigs clínics en pacients amb càncer amb vectors adenovirals expressant p53 o TK entre altres gens, mostren una baixa eficiència de transducció i per tant l'opció d'utilitzar vectors replicatius per aconseguir transduir cèl·lules més enllà del lloc de l'administració ha anat guanyant interès (Alemany 2012).

S'han identificat 53 serotips d'adenovirus humans que es classifiquen en 8 subgrups (de A a G, alhora que el subgrup B es divideix en B1 i B2) (Smith, Wiethoff et al.). L'adenovirus 5 del subgrup C és el més utilitzat.



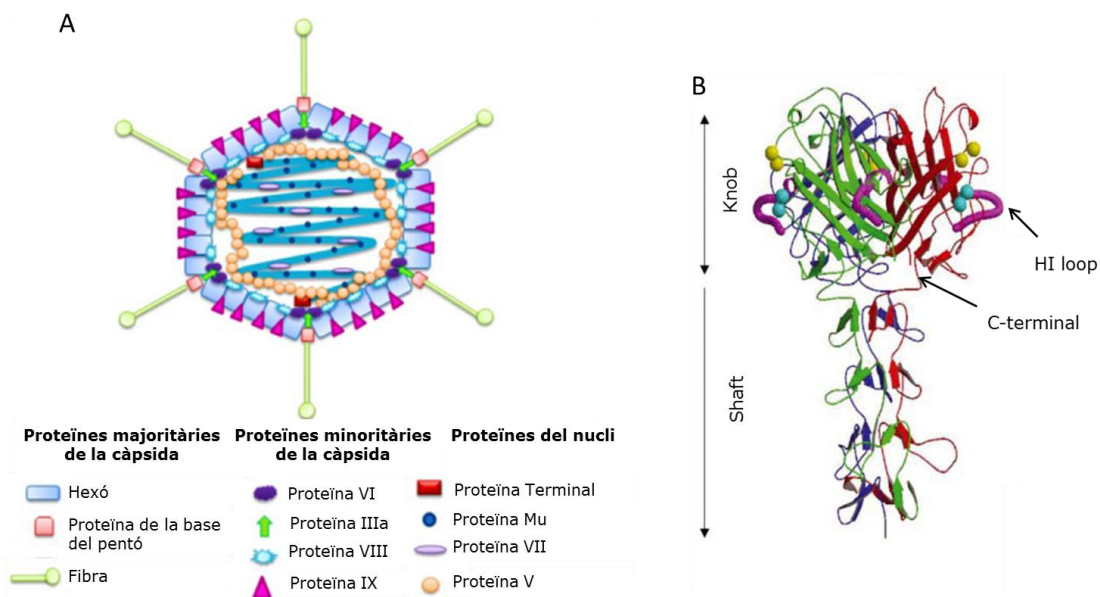
Tractament Tipus de tumor Fase clínica	Pauta d'administració	Efectes secundaris	N (pacients) Resposta clínica	Ref
Onyx015 CRC Fase I	2E12vp/d a dia 1 (cicle 1), 8 (cicle 2), 22 (cicle 3), 50 (cicle 4), 78 (cicle 5)+ Cx a partir de cicle 3 Artèria hepàtica	Síntomes gripals (febre, nàusees,...). No toxicitat hepàtica ni defectes en la coagulació	N= 11 1/11 PR a la dosis més alta.	(Reid, Galanis et al. 2001)
Onyx015 CRC Fase I	Com l'anterior	Síntomes gripals. Una resposta inflamatòria sistèmica	N = 27 3/27 PR	(Reid, Galanis et al. 2002)
Onyx015 Metàstasis pulmonars Fase I	2E13vp a dia 1 + 2E12 posteriorment 11 vegades (en cicles de 21 dies: a dia 1, 8 i 15). Dosis acumulada total 4.2E13) +Cx	Síntomes gripals. Transaminitis transitòria a 2E12 vp i elevació de IL1, IL6 , TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$	N = 10 1/10 PR	(Nemunaitis, Cunningham et al. 2001)
Onyx015 HCC Fase I/II	1E13 vp totals (en 5 dies consecutius) +Cx Artèria hepàtica	No toxicitat hepàtica ni defectes en la coagulació	N = 6 3/6 disminució CEA	(Habib, Sarraf et al. 2001)
Onyx015 CRC i metàstasis hepàtiques Fase II	Fins a 2E13vp (2E12vp a dia 1 i dia 15 en cicles de 28 dies)	Síntomes gripals. Presència de virus en melsa i fetge detectada en la biodistribució després de la mort.	N = 18 4/18 Disminució CEA Progressió en tots els pacients.	(Hamid, Varterasian et al. 2003)
Onyx-015 Metàstasis de CRC Fase I/II	Com Reid 2001.	Toxicitat molt baixa	N = 35 Algunes PR	(Au, Thorne et al. 2007)
CG7870 Tumors de pròstata Fase I	Fins a 6E12vp en una administració única.	Síntomes gripals. Transaminitis transitòria a >1E12 Augment de D-dímer a >1E12 Augment de IL6, IL10	N = 23 5/23 disminució PSA	(Small, Carducci et al. 2006)
Onyx015 +Enbrel Varis tumors sòlids: CRC, mama, ovari Fase I	(1E10, 1E11 o 1E12vp setmanalment x 3)=1 cicle. Fins a 3 cicles + enbrel al cicle 1	Cap	N = 9 4 SD	(Nemunaitis, Senzer et al. 2007)

**Taula 3.** Assaigs clínics amb adenovirus oncolítics per administració sistèmica. Vp, partícules virals; d, dia; Cx, quimioteràpia; CRC, colorectal carcinoma; HCC, carcinoma hepatocel·lular; PR, resposta parcial; SD, malaltia estable; CEA, antigen carcinoembrionari; PSA, antigen específic de pròstata. Adaptat d'Alemaný, 2012a (Alemany 2012).

### 3.2.1 Estructura del virió.

L'adenovirus és un virus sense envolta, amb càpsida icosaèdrica i d'una mida entre 70-90nm. El genoma es troba compactat al nucli de la càpsida i associat a les proteïnes del nucli o *core*, la proteïna pV, mu, pVII i 2 còpies de la proteïna Terminal (TP). La càpsida està formada majoritàriament per trímers d'hexó i entre ells es troben les proteïnes minoritàries pIIIa, pVI, pVIII i pIX. Als 12 vèrtex de la càpsida es troba la proteïna de la base del pentó (formada per 5 molècules de polipèptid III) des d'on es projecta la fibra trimeritzada, màxima responsable de la interacció amb els receptors de la cèl·lula hoste. A més els virions contenen unes 10 còpies de la proteasa adenoviral que s'encarrega de proteolitzar moltes de les pre-proteïnes estructurals a la seva forma madura en la fase final de l'acoblament de la càpsida viral (Knipe 2007; Chailertvanitkul and Pouton) (**figura 2A**).

L'estructura de la fibra es divideix en tres dominis: la cua N-terminal que s'uneix a la proteïna de la base del pentó, el domini central anomenat *shaft* i el domini globular C-terminal que rep el nom de *knob*. Dins el *knob* de la fibra cal destacar la posició de dos dominis importants pels resultats mostrats en aquest treball: *HI loop* i el C-terminal (**figura 2B**).

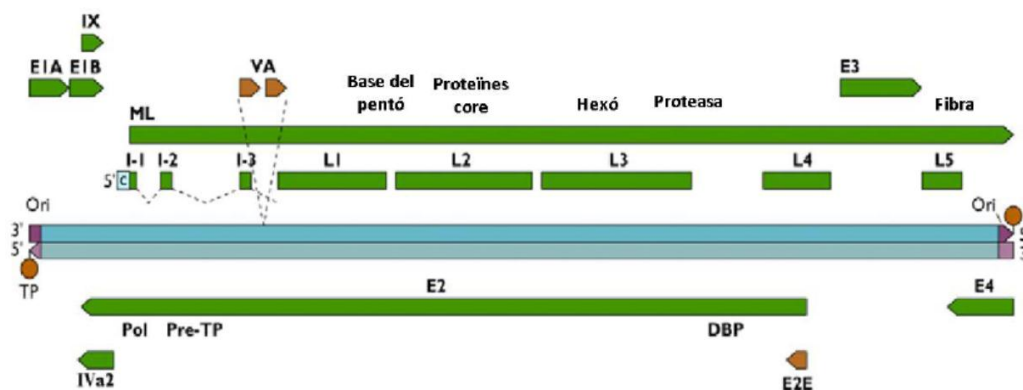


**Figura 2. A. Estructura proteica del virió de l'adenovirus humà 5.** Modificat de Chailertvanitkul, VA. *et al* 2010 (Chailertvanitkul and Pouton 2010) . **B. Estructura de la fibra de l'adenovirus humà 5.** Destaquen el domini C-terminal i el bucle HI-loop. Modificat de Baker A.H. 2004 (Baker 2004).

### 3.2.2 Estructura del genoma.

El genoma de l'adenovirus és un genoma d'ADN de doble cadena d'unes 36Kb. Protegint els extrems del genoma es troben les ITRs (de l'anglès, *Inverted Terminal Repeats*) que a més actuen com a origen de replicació de l'ADN viral. Entre l'ITR de l'esquerra i E1a (el primer gen transcrit), hi ha la seqüència d'empaquetament ( $\Psi$ ), que dirigeix l'encapsidació de l'ADN viral en la partícula infectiva.

El genoma de l'adenovirus codifica per 50 proteïnes diferents. Conté 5 unitats de transcripció primerenca (E1a, E1b, E2, E3 i E4), tres unitats de transcripció intermèdia (IX, IVa2 i E2 tardana) i una unitat de transcripció tardana sota el control del promotor tardà o *Major Late Promoter* (MLP). Totes aquestes unitats són transcrites per la ARN polimerasa II i generen múltiples ARNm mitjançant l'ús d'*splicing* i cues de poliadenilació alternatius. A més l'adenovirus conté els ARNs VA transcrits per la ARN polimerasa III i que no són traduïts (**figura 3**) (Knipe 2007).



**Figura 3. Estructura del genoma adenoviral.** L'ADN de doble cadena es representa com les dues línies de color blau, a l'extrem de les quals es representa en lila els ITRs i la proteïna terminal (en taronja). Les diferents unitats de transcripció es mostren en verd indicant la seva orientació i posició en el genoma

En general, les proteïnes que fan funcions relacionades s'expressen a la mateixa unitat de transcripció. Així les proteïnes de la E1 estableixen un ambient cel·lular permissiu per la replicació viral i inhibeixen l'apoptosi. Les proteïnes d'E2 permeten la replicació de l'ADN viral. Les proteïnes d'E3 tenen funcions immunomoduladores. Les proteïnes d'E4 tenen varies funcions implicades en la replicació de l'ADN viral, el control de la transcripció i el transport de ARNm. I les proteïnes expressades en la unitat de transcripció tardana permeten l'empaquetament del virió i l'encapsidació del genoma viral.

### 3.2.3 Cicle viral.

L'adenovirus és un virus de cicle lític que acaba amb la mort de la cèl·lula infectada i l'alliberament de la progènie viral.

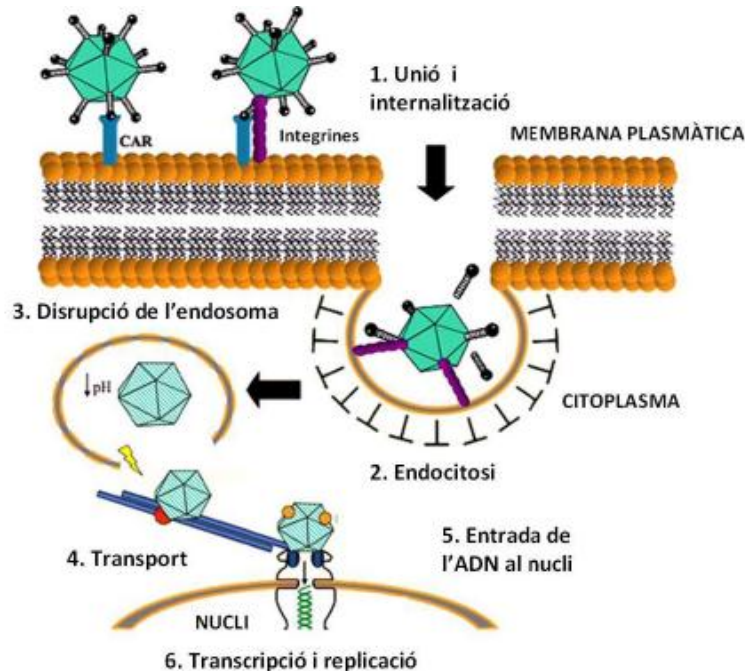
#### 3.2.3.1 Adsorció i entrada a la cèl·lula hoste

La infecció o entrada a la cèl·lula hoste és un procés en dos passos. Inicialment el *knob* de la fibra interacciona amb el receptor primari CAR (de l'anglès, *Coxsackie B virus-Adenovirus receptor*)(Bergelson, Cunningham et al. 1997), i seguidament es dona una unió secundària entre les proteïnes de la base del pentó i les integrines (principalment  $\alpha_v\beta_3$  i  $\alpha_v\beta_5$ ) de la superfície cel·lular que permet la internalització del virus. Aquesta interacció es dona a través del pèptid RGD (Arg-Gly-Asp) de cada una de les 5 molècules de polipèptid III que formen la proteïna de la base del pentó (Nemerow and Stewart 1999). També són importants per la infecció viral les interaccions de baixa afinitat que es donen entre els heparan sulfat proteoglicans (HSPGs) i el domini KKTK (Lys-Lys-Thr-Lys) del *shaft* de la fibra (Dechecchi, Melotti et al. 2001).

El receptor CAR és un component de les unions estretes (o *tight junctions*) de les cèl·lules epitelials. En humans, s'ha demostrat una alta expressió en cor, pàncrees i cervell, també a nivells més baixos en pròstata, testicle, pulmó, fetge i intestí. En ratolí, s'ha demostrat una alta expressió de CAR en fetge, ronyó, cor, pulmó, cervell i testicle (Bergelson, Krithivas et al. 1998) la qual cosa pot afectar a la biodistribució del virus i s'ha de tenir en compte al extrapolar les dades del model murí a l'humà. Les integrines són una ampla família de receptors implicats en fenòmens de reclutament de leucòcits durant la inflamació i també en fenòmens de disseminació i adhesió de les cèl·lules tumorals. També tenen un paper important en el desenvolupament embrionari i la coagulació (Cao, Huang et al. 1998). S'expressen a baixos nivells en la majoria de teixits, entre ells l'intestí, els vasos sanguinis i la musculatura llisa, i a alts nivells als ossos, la placenta, vasos i cèl·lules tumorals i en tots els teixits com a resposta a la inflamació.

La interacció amb les integrines activa la reorganització de filaments d'actina que promou la internalització del virus per un procés d'endocitosis a través de vesícules de clatrina. Les vesícules endocítiques maduren, el pH s'acidifica i la càpsida viral es desacobla. Posteriorment la partícula viral escapa de l'endosoma a

través de l'acció lítica de la proteïna VI i la nucleocàpsida és transportada fins als porus nuclears a través dels microtúbuls i la dineïna citoplasmàtica. Un cop als porus, la nucleocàpsida s'acaba de desacoblar totalment i el genoma viral entra al nucli (Knipe 2007; Coughlan, Alba et al. 2010) (**figura 4**).



**Figura 4. Mecanismes d'entrada a la cèl·lula de l'adenovirus 5.** 1. La unió primària del *knob* de la fibra amb el CAR i la unió secundària de la proteïna de la base del pentó amb les integrines de la superfície cel·lular promouen la internalització del virus. 2. El virus entra a la cèl·lula per endocitosi a través de vesícules de clatrina i la càpsida es comença a desacoblar. 3. L'acidificació de l'endosoma promou el desacoblament de la càpsida viral i la disrupció de l'endosoma. 4. La nucleocàpsida arriba al nucli a través dels microtúbuls. 5. La càpsida viral es desacobla completament i l'ADN viral entra al nucli a través dels porus nuclears. Modificat de Coughlan *et al* 2010 (Coughlan, Alba et al. 2010)

### 3.2.3.2 Expressió de gens primerencs

L'expressió dels gens primerencs (*o early*) té 3 funcions: induir l'entrada a la fase S de la cèl·lula hoste, protegir la cèl·lula infectada de les respostes antivirals de l'organisme i sintetitzar les proteïnes virals necessàries per la replicació de l'ADN.

El primer gen que és transcriu és E1a activat pel potenciador o *enhancer* de la transcripció constitutivament activat. Es generen dos ARNm que donen lloc a les variants 12S i 13S de la proteïna E1A. La proteïna 12S té la funció principal d'activar el cycle cel·lular i el promotor d'E2. El factor de transcripció E2F està regulat a la cèl·lula per la família de proteïnes del retinoblastoma (pRb, p107 i

p300). Aquestes proteïnes reprimeixen l'activació d'E2F a través de la unió amb el complex histona deacetilasa i histona metil-transferasa que modifiquen la cromatina i reprimeixen la funció dels iniciadors de la transcripció. Les proteïnes E1A s'uneixen a la família de proteïnes del retinoblastoma i desplacen E2F. L'E2F lliure promou l'expressió dels gens necessaris perquè la cèl·lula entri a la fase S i activa el promotor d'E2 de l'adenovirus. A més l'E2F lliure pot unir-se al dímer E4orf6/7 augmentant la seva afinitat pels llocs d'unió a E2F, i per tant la transcripció. La proteïna 13S és la principal responsable de l'activació de la resta de promotors virals primerencs a través de la unió a varis factors de transcripció cel·lulars i proteïnes reguladores (Knipe 2007).

La desregulació del cicle cel·lular causada per E1A dóna lloc a l'activació de l'apoptosi p53 dependent i independent. Per bloquejar-la l'adenovirus expressa les proteïnes E1B-55K i E1B-19K. E1B-55K s'uneix a p53 bloquejant estèricament la interacció amb els seus co-activadors i conferint-li un domini repressor que converteix p53 d'un activador a un repressor dels seus gens diana. A més forma un complex amb E4orf6 i altres proteïnes cel·lulars que indueix la poliubiquitinació de p53 i la consecutiva degradació pel proteasoma (Berk 2005). E1A també promou l'apoptosi sensibilitzant les cèl·lules a la mort induïda per TNF- $\alpha$  i TRAIL. E1B-19K (homòleg de Bcl-2) interacciona amb les proteïnes proapoptòtiques de la família BCL-2 com BAK i BAX, evitant la formació de porus a la membrana mitocondrial externa que acabarien donant lloc a l'apoptosi de la cèl·lula infectada (Berk 2005).

Els gens d'E2 codifiquen per les proteïnes necessàries per la replicació de l'ADN viral: la polimerasa d'ADN, la proteïna pre-terminal i la proteïna d'unió a ADN de cadena senzilla. Un cop expressats s'inicia la replicació de l'ADN viral.

### **3.2.3.3 Interacció amb l'hoste: inhibició de la resposta immune antiviral.**

L'adenovirus presenta varis mecanismes de bloqueig de la resposta immune antiviral. Per una banda les proteïnes E1A i els ARNs VA inhibeixen la resposta cel·lular a l'interferó (tipus I, IFN- $\alpha$  i  $-\beta$ ; i tipus II, IFN- $\gamma$ ), i per altre banda les proteïnes d'E3 protegeixen la cèl·lula infectada de la mort induïda pels limfòcits T citotòxics (CTLs) i les citoquines secretades per les cèl·lules del sistema immune.

La regió E3 codifica per les proteïnes E3-12.5K, E3-6.7K, E3-19K, ADP (de l'anglès, *Adenovirus death protein*), E3-10.4K, E3-14.5K i E3-14.7K. El promotor

d'E3 conté llocs d'unió a NF- $\kappa$ B, que fan que l'expressió d'aquestes proteïnes augmenti davant d'un estímul inflamatori.

La E3/19K és una proteïna transmembrana que es troba retinguda al reticle endoplasmàtic (ER) a través d'un domini de retenció a ER i un motiu di-lisina de retorn a ER. La seva regió luminal s'uneix al domini d'unió al pèptid de l'MHC-I (complex major d'histocompatibilitat classe I) evitant que sigui exportat a la superfície cel·lular on tindria lloc la presentació de l'antigen. A més la E3/19K també s'uneix a TAP i evita que els pèptids processats al citosol siguin carregats a les molècules presentadores d'antigen, MHC-I. Amb aquests dos mecanismes es protegeix la cèl·lula de la lisi induïda pels limfòcits citotòxics (Lichtenstein, Toth et al. 2004; Knipe 2007). La E3/19K, també reté al ER els lligands de les cèl·lules *natural killers* (NKG2D), les proteïnes MICA i MICB (de l'anglès, *MHC-I chain related proteins A i B*), així també inhibeix la resposta antiviral mediada per aquestes cèl·lules (McSharry, Burgert et al. 2008).

Els CTLs expressen el lligand de Fas a la seva superfície, quan aquest interacciona amb el seu receptor a la superfície de la cèl·lula reconeguda indueix l'apoptosi. TNF- $\alpha$  (factor de necrosis tumoral- $\alpha$ ) i TRAIL (de l'anglès, *TNF-related apoptosis-inducing ligand*) són citoquines expressades pels macròfags i limfòcits que també indueixen l'apoptosi de la cèl·lula infectada. Per bloquejar aquest mecanisme, l'adenovirus expressa el complex RID format per les proteïnes E3-10.4K (RID $\alpha$ ) i E3-14.5K (RID $\beta$ ) que es localitza majoritàriament a la membrana cel·lular i provoca l'endocitosi i la degradació lisosomal dels receptors de Fas i TRAIL (TRAIL-R1 i TRAIL-R2). A més inhibeix l'apoptosi induïda per TNF- $\alpha$  bloquejant la translocació de cPLA2 (fosfolipasa A2 citoplasmàtica) que és imprescindible per la mort cel·lular induïda per TNF. Les proteïnes E3-6.7K i E3-14.7K també participen en el bloqueig de l'apoptosi induïda per TNF, Fas i TRAIL (Lichtenstein, Toth et al. 2004).

La regió E3 és prescindible per la replicació viral, i per això s'ha deletat en molts dels vectors de teràpia gènica i adenovirus oncolítics per tal de guanyar espai al genoma viral per poder introduir transgens. Tot i això la importància d'aquesta regió per la replicació dels virus *in vivo* ha estat demostrada ja que prolonga l'expressió de l'ADN viral (Poller, Schneider-Rasp et al. 1996; Ilan, Droguett et al. 1997), la replicació viral en models animals (Yu, Chen et al. 1999) i disminueix la resposta immune (Wang, Hallden et al. 2003).

### 3.2.3.4 Replicació de l'ADN viral, expressió de gens tardans i lisi de la cèl·lula infectada.

L'inici de la replicació de l'ADN viral marca l'inici de l'expressió dels gens tardans. La unitat de transcripció tardana està regulada pel MLP i codifica bàsicament per les proteïnes estructurals de la càpsida i les necessàries per l'acoblament de la partícula viral. Es generen fins a 5 famílies d'ARNm anomenats de L1 a L5 en funció de l'ús de llocs de poliadenilació comuns; i es generen un mínim de 20 ARNm diferents per mecanismes de *splicing* alternatius. Tots els ARNm d'aquesta unitat contenen a l'extrem 5' el *tripartite leader* generat a partir de l'*splicing* de 3 petits exons i que no és traduït. Quan la replicació de l'ADN viral comença i tots els ARNm tardans estan sintetitzats es bloqueja l'acumulació al citoplasma dels ARNm cel·lulars i hi ha un exportació preferent d'ARNm viral mediat per les proteïnes E1B-55K, E4-34K i E4orf6. A més d'un transport facilitat al citoplasma, els ARNm viral són traduïts preferentment, gràcies a la presència d'aquest *tripartite leader* (Knipe 2007).

Alguns ARNm tardans contenen en el seu *tripartite leader* un exó addicional de 440 nucleòtids entre l'exó 2 i 3 que s'anomena *i-leader* i que sí que és traduït (Virtanen, Alestrom et al. 1982; Lewis and Anderson 1983). Tot i trobar-se en molts ARNm tardans s'associa principalment als ARNm de la família L1 que codifiquen per L1-52/55K. L'*i-leader* a més codifica per una proteïna de 16 KDa de funció desconeguda (Virtanen, Alestrom et al. 1982). En *cis*, la traducció de l'*i-leader* desestabilitza els ARNm que contenen aquesta seqüència i això redueix a la meitat els nivells de proteïna L1-52/55K (Soloway and Shenk 1990). Les úniques dues proteïnes de la unitat de transcripció tardana que s'expressen abans de la replicació dels genoma viral són l'*i-leader* i la L1-52/55K (Lucher, Symington et al. 1986; Symington, Lucher et al. 1986). Per aquesta raó s'ha hipotetitzat que la proteïna *i-leader* pot tenir un paper en la iniciació de la síntesis de l'ADN viral o en el canvi d'expressió dels gens primerencs als tardans (Symington, Lucher et al. 1986). L'*i-leader* té un paper molt destacat en aquest treball i presenta d'altres funcions que es comentaran més endavant.

Un cop totes les proteïnes són traduïdes, es transporten al nucli on es van acoblant els virions. La formació de la partícula viral acaba amb l'empaquetament de l'ADN viral juntament amb les proteïnes del nucli dins la pro-càpsida mediat per la seqüència d'encapsidació ( $\Psi$ ) i ajudat per les proteïnes IVa2, L1-52/55K i L4-22K (Knipe 2007).



Finalment la cèl·lula lisa i la progènie viral és alliberada. La sortida del virus de la cèl·lula infectada és un procés poc conegut que implica com a mínim 3 mecanismes. Per una banda la proteasa viral L3 talla la citoqueratina K18 provocant que s'acumuli al citoplasma i evitant la polimerització dels filaments intermedis. Aquesta inestabilitat dels filaments intermedis fa que la cèl·lula sigui molt més susceptible a la lisis. Per altra banda les cèl·lules infectades alliberen trímers de fibra que interfereixen amb l'oligomerització de CAR a les unions estretes de les cèl·lules epitelials, i això promou l'alliberament de les partícules virals. Finalment la proteïna E3-11.6K o ADP (de l'anglès, *Adenovirus death protein*) juga un paper important en la mort cel·lular i l'alliberament viral (Knipe 2007).

L'ADP és la única proteïna de la regió E3 que s'expressa a nivells baixos durant la fase inicial del cicle, però a nivells molt més alts durant la fase tardana des d'un nou ARNm que conté el *tripartite leader* com tots els ARNm tardans (Tollefson, Scaria et al. 1992). L'ADP és una glicoproteïna integral de membrana que es troba a la membrana nuclear, al reticle endoplasmàtic i a l'aparell de Golgi; la seva funció és promoure la lisi cel·lular. Els mutants que no expressen ADP repliquen igual que el virus parental, però les cèl·lules es lisen més poc a poc, l'alliberament del virus al sobrenedant es retarda i el virus genera calbes més petites i que triguen més a aparèixer (Tollefson, Ryerse et al. 1996; Tollefson, Scaria et al. 1996).

El mecanisme pel qual l'ADP promou la lisi cel·lular és desconegut. Wold i col·laboradors han hipotetitzat que l'acumulació d'ADP a les membranes nuclears poden augmentar la permeabilitat directament (Doronin, Toth et al. 2003) o interaccionant amb proteïnes involucrades en mantenir la integritat de la membrana nuclear (Tollefson, Scaria et al. 2003) permetent l'alliberament viral. També han hipotetitzat que l'acumulació d'ADP podria comportar un alliberament de calci dels magatzems intracel·lulars (ER principalment) i una conseqüent activació dels enzims degradadors dependents de calci (Doronin, Toth et al. 2003).

### **3.3 DISSENY D'ADENOVIRUS SELECTIUS DE TUMOR**

Un condició imprescindible dels virus oncolítics és la selectivitat de replicació en la cèl·lula tumoral. Alguns virus com el reovirus o el virus de la malaltia de *Newcastle* (NVD) presenten un tropisme innat per la cèl·lula tumoral; mentre que altres com l'adenovirus han de ser genèticament modificats per aconseguir aquesta propietat. Diferents estratègies s'han descrit per redirreccionar els adenovirus cap a

la cèl·lula tumoral: la deleció de funcions virals complementades en la cèl·lula tumoral, la inserció de promotors o seqüències exògenes d'ADN que regulin l'expressió d'una o varies proteïnes virals (estratègia que es coneix com a *targeting transcripcional o traduccional*) i la modificació del seu tropisme mitjançant l'ablació de les seves interaccions natives combinada amb la inserció de lligands d'alta afinitat per la cèl·lula tumoral (estratègia que es coneix com a *targeting transduccional*). Aquestes modificacions però sovint van acompanyades d'una pèrdua de la potència replicativa dels virus. És important mantenir un equilibri entre la potència del virus i la selectivitat per evitar la toxicitat associada a la replicació en el teixit normal, però no perdre l'eficàcia antitumoral.

### **3.3.1 Deleció de funcions viral complementades a la cèl·lula tumoral.**

La desregulació del cicle cel·lular i la resistència a l'apoptosi són propietats característiques de la cèl·lula tumoral; mutacions en la via del retinoblastoma i p53 són molt prevalents (Sherr 2001) (White 1994), i s'aprofiten per aconseguir una replicació viral tumor-selectiva.

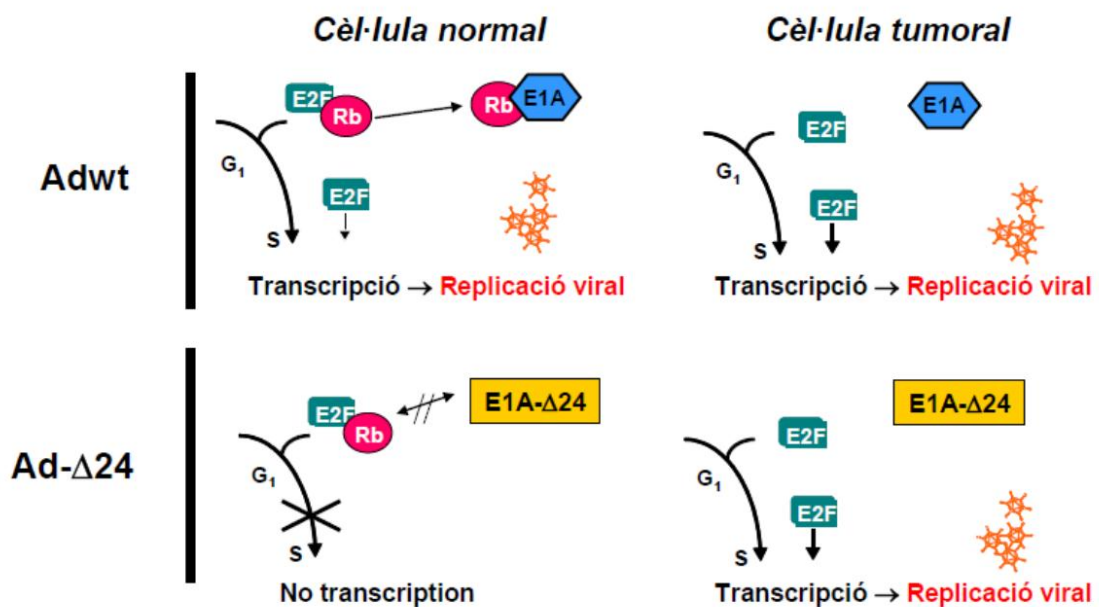
La primera modificació descrita va ser la deleció d'E1b/55K (en l'ONYX-015) que limita la replicació viral a cèl·lules deficientes per p53 (Bischoff, Kirn et al. 1996). Tot i això la selectivitat depenent de p53 és controvertida (Goodrum and Ornelles 1998; Rothmann, Hengstermann et al. 1998), i més recentment s'ha demostrat que la selectivitat d'aquest virus ve donada per una propietat exclusiva de les cèl·lules tumorals d'exportar els ARNm virals en absència d'E1B/55K (O'Shea, Johnson et al. 2004).

També és d'interès la deleció del lloc d'unió a pRb de la proteïna E1A, coneguda com a deleció  $\Delta 24$ . En una cèl·lula quiescent, la proteïna E1A- $\Delta 24$  no podrà unir-se a pRb desplaçant el factor de transcripció E2F. En una cèl·lula tumoral amb la via de Rb desregulada, pRb no és funcional i E2F està lliure per tant la deleció  $\Delta 24$  està complementada (Fueyo, Gomez-Manzano et al. 2000). Aquest mutant però no és completament selectiu ja que manté la regió conservada 1 (CR1) d'E1A que pot induir la fase S a través de la unió a p300 i la proteïna E4-orf6/7 que també s'uneix a pRb (Alemany 2007) (**figure 5**).

La deleció de la proteïna E1B/19K també s'utilitza per limitar la replicació en cèl·lules tumorals resistents a l'apoptosi. Aquests mutants són molt deficientes en línies cel·lulars no complementades, però en les línies complementades el virus es

replica al mateix nivell que el virus salvatge (Pilder, Logan et al. 1984; Sauthoff, Heitner et al. 2000). Com a conseqüència d'aquesta deleció, la cèl·lula infectada pateix una apoptosi avançada que afavoreix alliberament viral i la disseminació cèl·lula-cèl·lula, donant un fenotip de calba gran (Sauthoff, Heitner et al. 2000).

Per últim, moltes cèl·lules tumorals també presenten defectes en la via de l'interferó (Grander and Einhorn 1998); això pot ser aprofitat com a mecanisme per assolir selectivitat tumoral delecionant els ARNs VA I i II del virus que permeten la seva replicació en presència d'interferó (Cascallo, Capella et al. 2003; Cascallo, Gros et al. 2006).



**Figura 5. Mecanismes de selectivitat de l'ICOVIR-15. Deleccions de funcions virals complementades en la cèl·lula tumoral: deleció Δ24.** En una cèl·lula normal la proteïna E1A de l'adenovirus sequestra pRb, dissociant el complex E2F-Rb i deixant E2F lliure, així s'indueix l'entrada a la fase S del cicle cel·lular i la replicació viral. En una cèl·lula tumoral aquest mecanisme no és necessari perquè la via de Rb està desregulada i l'E2F lliure. La deleció Δ24 a la proteïna E1A fa que E1A-Δ24 no pugui dissociar el complex E2F-Rb i per tant no es pot activar la replicació viral en una cèl·lula normal; en canvi en la cèl·lula tumoral la replicació viral s'activarà igualment.

### 3.3.2 Targeting transcripcional i traduccional

La inserció de promotors específics de tumor o teixit i seqüències exògenes d'ADN regulant l'expressió d'una o varies proteïnes virals (E1a, E1b, E2, E4) és una aproximació interessant per l'administració sistèmica de l'adenovirus ja que limita l'expressió d'E1A al tumor, a diferència de la deleció de funcions complementades a

la cèl·lula tumoral descrites en l'apartat anterior, i per tant evita la toxicitat associada a l'expressió d'aquesta proteïna en cèl·lules normals.

Alguns promotors utilitzats com E2F-1 (Jakubczak, Ryan et al. 2003) activat en cèl·lules tumorals amb defectes en la via de Rb, o el promotor hTERT (promotor de la transcriptasa reversa de la telomerasa humana) activat en cèl·lules que mantenen l'activitat telomerasa (Hernandez-Alcoceba, Pihalja et al. 2002) presenten un ampli tropisme per la cèl·lula tumoral, ja que són alteracions prevalents en la majoria de tumors (Harle-Bachor and Boukamp 1996; Sherr 2001). Altres promotors utilitzats com el de PSA,  $\alpha$ -fetoproteïna o uPAR (receptor de l'activador de plasminogen tipus uroquinasa, de l'anglès *urokinase type plasminogen activator receptor*) són promotors específics de teixit i estan dissenyats específicament per tractar tumors de pròstata (Yu, Chen et al. 1999), hepàtics (Hallenbeck, Chang et al. 1999) i pancreàtics (Huch, Gros et al. 2009), respectivament. Aquests promotors han de ser el més curts possible i activar la transcripció al màxim sense perdre l'especificitat; per això en alguns casos és necessari l'ús de seqüències aïllants (o *insulators*) o senyals de poliadenilació per bloquejar la transcripció iniciada des dels potenciadors de la transcripció o *enhancers* de la senyal d'empaquetament (Majem, Cascallo et al. 2006).

També hi ha mecanismes per regular l'expressió d'E1a a nivell traduccional. El factor del complex d'inici de la traducció eIF4E es troba sobreexpressat en tumor, aquest factor reconeix el cap dels ARNm i té funció helicasa. Per això s'ha postulat l'ús de 5'UTR llargs i amb molta estructura secundària controlant E1a com a estratègia per conferir selectivitat tumoral (Stoff-Khalili, Rivera et al. 2008). Els miARNs regulen negativament la traducció d'alguns ARNm a través de la unió a 3'UTRs. Així, s'ha introduït seqüències complementaries a miARNs específics del fetge al 3'UTR d'E1a per bloquejar la seva expressió (Ylosmaki, Hakkarainen et al. 2008).

### **3.3.3 Targeting transduccional**

Per tumors localitzats com carcinomes d'ovari, cap i coll o tumors cerebrals el virus pot ser administrat intratumoralment; però per tractar càncers metastàtics és imprescindible l'administració sistèmica del virus. L'adenovirus administrat sistèmicament és ràpidament neutralitzat per la interacció amb factors sanguinis i cèl·lules de la sang, a més presenta un elevat hepatotropisme. La biodistribució de l'adenovirus provoca toxicitat hepàtica i sanguínia i limita molt la quantitat de virus

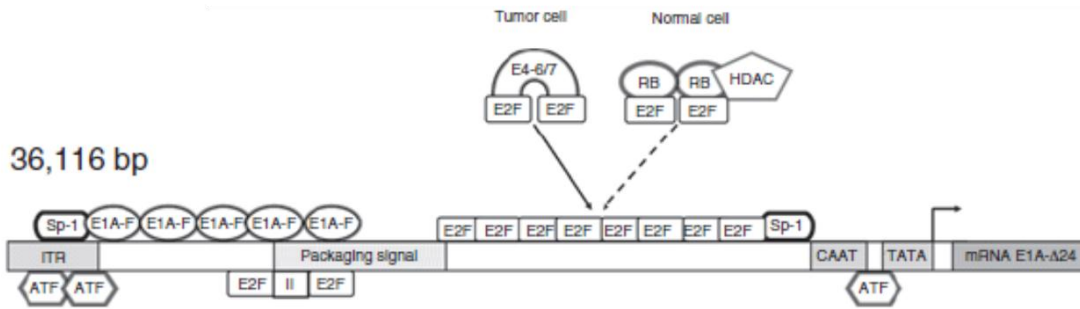
que arriba al tumor. A més el receptor CAR està poc expressat en la majoria de línies tumorals (Bauerschmitz, Lam et al. 2002). Les estratègies de *targeting* transduccional impliquen eliminar la interacció del virus amb els seus receptors naturals i els factors sanguinis per disminuir bàsicament la transducció del fetge i la melsa, estratègia que es coneix com a *detargeting*, i redirigir-lo cap al tumor mitjançant d'addició de lligands d'alta afinitat tumoral que permetin la infecció de la cèl·lula tumoral a través de receptors alternatius, estratègia que es coneix com a *retargeting* tumoral (veure apartat 3.5.2.1 i 3.5.2.2).

### **3.4 ICOVIR-15 i ICOVIR-15K.**

En el nostre grup, l'ICOVIR-15 i l'ICOVIR-15K són els actuals virus de partida sobre el qual es realitzen les successives modificacions.

L'ICOVIR-15 controla la transcripció d'E1a mitjançant la inserció de 4 palíndroms de resposta a E2F i un lloc d'unió a Sp-1 després de la senyal d'empaquetament, a més té la deleció  $\Delta 24$  (veure apartat 3.3.1 i figura 5). En una cèl·lula tumoral, l'E2F lliure s'unirà a aquests palíndroms per activar la transcripció d'E1a- $\Delta 24$ , i en conseqüència la de la resta de gens virals primerencs, entre ells E4-orf6/7. E4-orf6/7 forma un complex amb E2F lliure que incrementa l'afinitat d'E2F pels palíndroms augmentant encara més l'expressió de E1a. En la cèl·lula quiescent, la unió dels complexos E2F-pRb a les caixes del promotor, reprimiran l'expressió d'E1a reclutant les histona deacetilases al promotor d'E1a. Si es donés una fuga del promotor, generant una expressió residual d'E1A, al tenir la deleció  $\Delta 24$ , aquesta no podria alliberar E2F i això evitaria que es donés un bucle d'autoactivació (**figura 6**). A més l'ICOVIR-15 té la inserció del pèptid RGD a l'HI loop de la fibra que permet el redireccionament del virus cap a les cèl·lules tumorals mitjançant la transducció CAR-independent, a través de la unió a integrines (Rojas, Guedan et al.).

ICOVIR-15K substitueix el domini KKTK d'unió a heparan sulfat proteoglicans del *shaft* de la fibra per un motiu RGDK. Amb aquesta estratègia s'aconsegueix millorar el *targeting* tumoral incrementant 20 vegades la relació virus al tumor/virus al fetge respecte un virus amb la càpsida no modificada (Bayo-Puxan, Gimenez-Alejandre et al. 2009) i l'activitat antitumoral comparat amb l'ICOVIR15 disminuint els tumors 4 vegades en un model tumoral de pàncrees NP-9, i 2 vegades en els models de melanoma SKmel-28 i de pàncrees NP-9 (Rojas, Gimenez-Alejandre et al.).



**Figura 6. Control transcripcional d'ICOVIR-15.** En la cèl·lula tumoral l'E2F lliure i els factor de transcripció Sp-1 s'uneixen als 4 palíndroms de caixes E2F i a la caixa Sp-1 respectivament per activar l'expressió d'E1A-Δ24. Així s'activa la transcripció de les proteïnes virals, entre elles E4-orf6/7 que formarà un complex amb l'E2F unit als palíndroms del promotor augmentat la seva afinitat i la transcripció d'E1A-Δ24. En cèl·lules quiescents la unió dels complexos E2F-Rb als palíndroms del promotor atraurà les histona-deacetilases (HDAC) al promotor d'E1A reprimint-lo. La deleció Δ24 evita que s'alliberi E2F del complex E2F-Rb evitant el bucle d'autoactivació que generaria una petita fuga d'expressió d'E1A. Adaptat de Rojas *et al* 2010 (Rojas, Guedan *et al.*).

Els adenovirus armats venen a ser una combinació de teràpia gènica amb viroteràpia, aprofiten la replicació de l'adenovirus per amplificar l'expressió del transgen i portar-la més enllà del lloc d'administració i és una estratègia interessant per augmentar la potència dels adenovirus oncolítics. Al introduir transgens al genoma, cal tenir en compte per una banda que el transgen no pot afectar a la replicació del virus i per l'altre no es pot superar el 105% del tamany del genoma viral (i per tant només permet introduir unes 1.8Kb) per evitar problemes d'inestabilitat genètica i d'encapsidació del virus. L'ICOVIR-15 i l'ICOVIR-15K presenten una interessant relació selectivitat/potència incrementant en només 151 parells de bases el genoma de l'adenovirus salvatge. Això és una propietat molt interessant ja que permet seguir modificant el virus, afegint-li transgens sense sobrepassar el límit. De totes maneres cal optimitzar el disseny dels adenovirus armats intentant aprofitar promotors, regions de poliadenilació i seqüències d'*splicing* pròpies del virus per modular l'expressió del transgen (Cody and Douglas 2009). Armar el virus amb transgens que s'expressin durant la fase tardana del cicle viral evita que aquests interfereixin amb la replicació del virus. En el nostre grup clonem els transgens darrera de la fibra afegint-los l'acceptor d'*splicing* de la proteïna IIIa del propi virus i una seqüència de poliadenilació per regular la seva expressió des del MLP (Rojas, Guedan *et al.* 2010).

### **3.5 LIMITACIONS DE LA VIROTERÀPIA.**

Nombrosos estudis preclínic i assaigs clínics per administració intratumoral i sistèmica de diferents adenovirus oncolítics han posat de manifest les principals limitacions de la teràpia amb adenovirus oncolítics, que són: la baixa arribada de virus al tumor després de l'administració sistèmica, la limitada dispersió intratumoral i la generació d'una potent resposta immune antiviral.

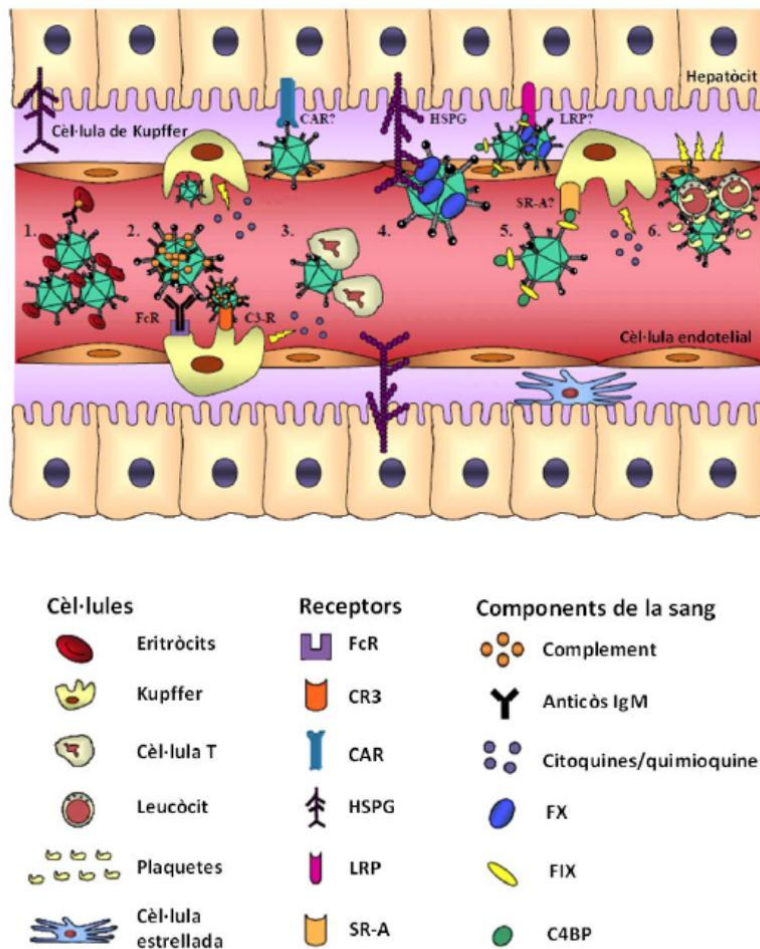
#### **3.5.1 ARRIBADA DEL VIRUS AL TUMOR.**

L'adenovirus no és un virus adaptat a la circulació pel sistema sanguini, administrat sistèmicament és ràpidament neutralitzat. El temps de vida mitja en sang és de 2 minuts en ratolí (Alemany, Suzuki et al. 2000) i de 10 minuts en l'humà (Reid, Warren et al. 2002). L'adenovirus al torrent circulatori interacciona amb:

- Factors de coagulació dependents de la vitamina K com el factor de coagulació VII (FVII), IX (FIX), la proteïna C i principalment el factor de coagulació X (FX); també amb la proteïna d'unió al complement-4 (C4BP).
- Eritròcits humans a través de CAR i amb plaquetes a través d'integrines de manera que acabaran formant agregats.
- Anticossos que de manera indirecta uneixen el virus a eritròcits a través del CR1 (receptor del complement-1), i a neutròfils i monòcits a través del receptor de Fc. El virus també és bloquejat per anticossos neutralitzants que s'uneixen a la fibra o la proteïna de la base del pentó.

A més l'adenovirus queda retingut al fetge i la melsa per una extravasació passiva a través de les fenestracions dels vasos que són més gran que en la resta d'òrgans. Un cop al fetge, part del virus és fagocitat per les cèl·lules de Kupffer (macròfags residents del fetge) a través de la interacció directe amb els receptors scavenger-A (SR-A) o a través de la interacció del virus opsonitzat per C4BP o anticossos amb el CR3 (receptor del complement-3) o els receptors Fc respectivament. A més els agregats de virus amb plaquetes i eritròcits són eliminats pel sistema reticuloendotelial (cèl·lules de Kupffer i cèl·lules endotelials). També part del virus administrat queda retingut a l'espai de Disse que és l'espai entre les cèl·lules endotelials i els hepatòcits. Finalment el virus que passa aquesta barrera pot transduir l'hepatòcit a través de la interacció dels heparan sulfat proteoglicans (HSPG) amb el FX unit al virus (Alemany 2009) (Coughlan, Alba et al. 2010; Alemany) **(Figura 7)**.

L'activació de les cèl·lules de Kupffer i l'expressió de proteïnes virals en l'hepatòcit genera una resposta inflamatòria que contribueix a la toxicitat hepàtica i a resposta immune antiviral (Lieber, He et al. 1997).

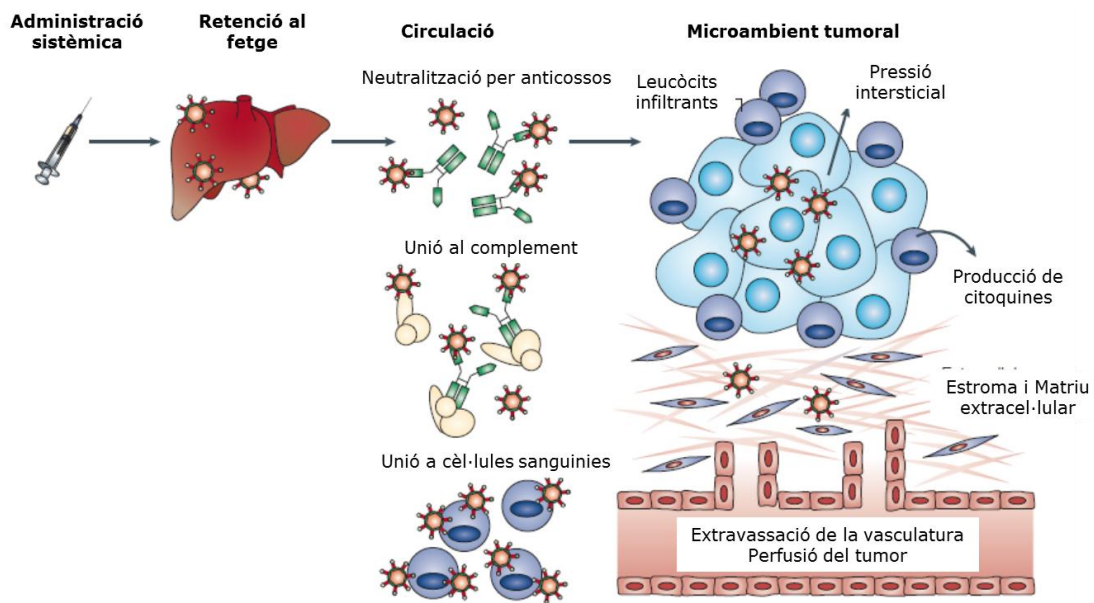


**Figura 7. Interaccions de l'adenovirus amb els components de la sang *in vivo*.** 1. L'adenovirus interacciona amb els eritròcits a través de CAR i a través de CR-1 en presència d'anticòs i el complement. 2. L'adenovirus opsonitzat per anticòs i per proteïnes del complement és fagocitat per les KC a través de CR-3 i FcR. 3. Interaccions amb limfòcits T. 4. Transducció dels hepatòcits per la interacció de l'hexò amb els HSPG a través de FX. 5. La unió de FIX i C4BP al knob de la fibra promou l'entrada a l'hepatòcit a través de HSPG i LRP (proteïna relacionada amb el receptor de la lipoproteïna de baixa densitat) i la captació per les KC. 6. La unió de l'adenovirus a les plaquetes promou la captació per les KC. Modificat de Coughlan L, *et al* 2010 (Coughlan, Alba et al. 2010).

Un cop el virus arriba al tumor, ha d'extravasat la vasculatura i viatjar a través de l'espai intersticial fins a arribar a la cèl·lula diana. L'adenovirus de 90nm de diàmetre es pot beneficiar de l'efecte EPR (de l'anglès, *enhanced permeability and retention effect* o efecte de permeabilitat i retenció incrementades), en tumors sòlids. Les partícules de 10 a 500nm escapen del filtre renal degut al seu tamany i a més no poden travessar les unions estretes de les cèl·lules endotelials en els



teixits normals. Aquestes partícules s'acumulen als òrgans que presenten vasos fenestrats com el fetge i la melsa. La vasculatura tumoral és caòtica i presenta una permeabilitat incrementada degut a la presència de fenestracions de 50-80nm i discontinuïtats intercel·lulars entre les cèl·lules endotelials (Hobbs, Monsky et al. 1998; Maeda, Wu et al. 2000; Maeda, Fang et al. 2003; Strauss and Lieber 2009), aquestes permeten l'extravasació de macromolècules, virus i nanopartícules. Tot i això el baix drenatge limfàtic i el dens teixit estromal augmenten la pressió intersticial dels tumors dificultant l'extravasació i difusió intratumoral dels virus (Russell, Peng et al. 2012) (**figura 8**).



**Figura 8. Barreres que limiten l'arribada del virus al tumor i la dispersió intratumoral.** Després de l'administració sistèmica del virus, la major part és retingut al fetge i a la melsa a més el virus circulat és neutralitzat per anticossos neutralitzants, el complement o per la interacció amb proteïnes i cèl·lules sanguínies. El virus biodisponible que arriba a tumor ha d'extraversar els vasos tumorals en contra del gradient de pressió intersticial per poder transduir la massa tumoral. A més un cop dins del tumor troba diferents barreres que limiten la seva dispersió com l'estroma i la matriu extracel·lular, el gradient de pressió intersticial i les cèl·lules del sistema immune que el bloquegen directament o per la secreció d'interferons i altres citocines. Adaptat de Parato, K. A. *et al* 2005 (Parato, Senger et al. 2005).

### 3.5.2 ESTRATÈGIES PER MILLORAR L'ARRIBADA DEL VIRUS AL TUMOR

Per millorar l'arribada del virus al tumor cal evadir la neutralització pels factors sanguinis, minimitzar la retenció al fetge i a la melsa, redirreccionar els virus

---

cap a les cèl·lules tumorals i cap a les cèl·lules endotelials que formen els vasos i augmentar la permeabilitat dels vasos (Russell, Peng et al. 2012).

### **3.5.2.1 Estratègies per disminuir la neutralització del virus per les proteïnes de la sang i la retenció del virus al fetge (*detargeting*).**

La transducció dels hepatòcits es dona principalment a través de la unió de factors de coagulació dependents de la vitamina K, principalment el factor de coagulació X (FX), (Parker, Waddington et al. 2006) que fa de pont entre els HSPG de l'hepatòcit i l'hexò (Waddington, McVey et al. 2008), per això les estratègies de *detargeting* hepàtic és basen en l'eliminació o modificació de les regions de la càpsida adenoviral implicades en aquesta unió. La interacció de la càpsida del virus amb el FX també és un mecanisme de l'organisme per detectar el virus i activar la resposta innata (Doronin, Flatt et al.). El bloqueig d'aquestes interaccions aconsegueix disminuir el tropisme (Kalyuzhniy, Di Paolo et al. 2008) (Alba, Bradshaw et al.) i la toxicitat hepàtica, però no augmenta (Shashkova, May et al. 2009) o inclús disminueix la quantitat de virus que arriba al tumor (Gimenez-Alejandre, Cascallo et al. 2008). La interacció dels factors de coagulació dependents de la vitamina K amb els HSPG és també necessària per la transducció de les cèl·lules tumorals, a més resultats del nostre grup demostren inhibir la unió al FX també limita la replicació intratumoral del virus (Gimenez-Alejandre dades no publicades).

Les interaccions natives de l'adenovirus (CAR i integrines), juguen un paper poc important en la transducció hepàtica *in vivo* (Martin, Brie et al. 2003) però tenen un paper important en l'activació de la resposta pro-inflamatòria (Schoggins, Nociari et al. 2005; Di Paolo, Miao et al. 2009) i per això també és interessant eliminar-les. Algunes estratègies es basen en deleccionar el *knob* de la fibra (adenovirus *knobless*) per inhibir les interaccions naturals i substituir-lo per lligands d'alta afinitat tumoral. La regió KKTK del shaft de la fibra també juga un paper important en la transducció *in vivo* de l'hepatòcit. A més la substitució del domini KKTK per un motiu RGDK presenta un efecte de *detargeting* hepàtic i *targeting* tumoral disminuint 6.5 vegades la transducció de l'hepatòcit i augmentant 3 vegades la transducció al tumor comparat amb un virus amb la càpsida no modificada (Bayo-Puxan, Gimenez-Alejandre et al. 2009) a més disminueix la toxicitat hepàtica i hematològica d'un adenovirus salvatge i la persistència en sang de l'adenovirus oncolític ICOVIR15K comparat amb l'ICOVIR15 (Rojas, Gimenez-Alejandre et al. 2012).

Una altra estratègia per millorar l'arribada del virus al tumor és l'emascament de la càpsida addicionant polímers com el PEG (polietilenglicol) o el PHMA (de l'anglès, phenyl methacrylate). Amb aquesta estratègia a més de bloquejar la interacció a través de CAR, integrines i factors sanguinis, també es neutralitza la càrrega dels adenovirus reduint la unió amb els receptors scavenger de les cèl·lules de Kupffer, s'evita la unió dels anticossos i s'augmenta el tamany de la partícula reduint l'extravasació al fetge i la melsa. El resultat és un augment de la persistència en sang i el *detargeting* hepàtic. Aquests polímers però dificulten la infecció de la cèl·lula tumoral. Per evitar-ho es modifiquen específicament les regions de la càpsida implicades en la interacció amb les cèl·lules de Kupffer, CAR, integrines, factors sanguinis, etc. (Coughlan, Alba et al. 2010; Alemany).

També s'ha utilitzat el bloqueig de les cèl·lules de Kupffer amb drogues com el clorur de gadolini, les  $\gamma$ -globulines, l'àcid poliinosínic o els *clodronate-liposomes* en ratolins per augmentar la persistència de l'adenovirus en sang, l'arribada al tumor i l'activitat antitumoral (Shashkova, Doronin et al. 2008; Koski, Rajecki et al. 2009; Haisma and Bellu).

Finalment una altra aproximació interessant és el *delivery* no viral. Cèl·lules tumorals (Alcayaga-Miranda, Cascallo et al.) i mesenquimals (Komarova, Kawakami et al. 2006) (Garcia-Castro, Alemany et al. 2010) infectades s'han fet servir per portar el virus fins al tumor aprofitant les seves propietats de tropisme o *homing* per la cèl·lula tumoral; també adenovirus encapsulats en liposomes (Yang, Wang et al.). Finalment l'administració del genoma viral com a ADN nu o a través de liposomes o altres tipus de polímers també és una estratègia interessant (Kwon, Kang et al.).

### **3.5.2.2 Estratègies per redireccionar el virus al tumor (*targeting tumoral*)**

Una de les estratègies més utilitzades per incrementar el *targeting* tumoral és la modificació genètica de la càpsida incorporant lligands d'alta afinitat. Les modificacions genètiques són d'interès perquè la progènie viral també serà modificada i per tant no només milloren l'arribada del virus al tumor sinó també la infectivitat en les successives rondes de replicació. L'èxit d'aquesta aproximació però depèn de la integritat estructural de la proteïna modificada. Sovint aquestes modificacions no permeten la correcta oligomerització. A més els lligands han de retenir la seva capacitat funcional sense necessitat de ser modificats post-

---

transduccionalment, ja que aquestes modificacions no són possibles per la naturalesa de la traducció i el plegament de les proteïnes adenovirals. També cal tenir en compte que el lligand pot alterar el transport intracel·lular de l'adenovirus causant la seva degradació i/o evitant que arribi al nucli. Els lligands utilitzats són:

- Pèptids amb afinitat per la cèl·lula tumoral (integrines, heparan sulfat proteoglicans, aminopeptidasa N, etc) o per la cèl·lula endotelial inserits a l'extrem C-terminal o a l'HI *loop* de la fibra, a les regions hipervariables de l'hexó, a la proteïna de la base del pentó o a la proteïna IX. El problema d'aquests lligands és que no són específics de cèl·lula tumoral, sinó que també s'expressen en altres teixits i això pot provocar certa toxicitat.
- Lligands d'alta afinitat com els *affibodies* o els scFv (de l'anglès *single chain variable fragments*) al *knob* de la fibra. Sovint aquestes estratègies requereixen l'eliminació del *knob* de la fibra (*fibres knobless*). Tot i el potencial de *targeting* tumoral d'aquesta estratègia, els virus modificats presenten rendiments més baixos i també un nombre de còpies de la fibra més baix.

Una altra estratègia interessant és l'intercanvi de la fibra adenoviral per fibres d'altres serotips amb tropisme diferent mediat per la interacció amb altres receptors. Per aconseguir *targeting* tumoral s'ha utilitzat l'Ad5/35 i l'Ad5/3 que infectaran utilitzant com a receptors primaris el CD46 i la desmogleïna 2 respectivament, que estan sobreexpressats en molts càncers. Així aquests adenovirus quimèrics han demostrat un major *targeting* tumoral i eficàcia antitumoral en tumors CD46 i/o desmogleïna 2 positius comparat amb l'Ad5 (Kawakami, Li et al. 2003; Guse, Ranki et al. 2007; Hoffmann, Meyer et al. 2007; Wang, Liu et al. 2008; Nandi, Ulasov et al. 2009).

Una altra estratègia és l'ús de complexos adaptador-lligand amb afinitat tumoral units de forma covalent o no covalent a l'adenovirus, aquesta molècula establirà un pont entre el virus i la cèl·lula tumoral. S'han utilitzat anticossos conjugats al virus, anticossos bi-específics o *diabodies* anti-adenovirus i proteïnes de fusió adaptadores. Els problema d'aquesta tècnica és que sovint els virus modificats donen un rendiment disminuït i presenten una població heterogènia. A més al no tractar-se d'una modificació genètica, aquesta aproximació millorarà l'arribada del virus al tumor però no la disseminació intratumoral (Coughlan, Alba et al. 2010).

### **3.5.2.3 Vasculatura tumoral com a diana per millorar l'arribada del virus al tumor**

Els vasos sanguinis tumorals a més de ser estructuralment diferents, també són antigènicament diferents dels vasos normals degut al seu fenotip angiogènic i inflamatori. Aquests vasos sobreexpressen integrines sobretot  $\alpha_v\beta_{3/5}$ , receptors i coreceptors de VEGF (de l'anglès, vascular endothelial growth factor), antigen de membrana pròstata-específic, fosfatidil serina, E-selectina, P-selectina, endogлина entre altres (Neri and Bicknell 2005; Ruoslahti, Bhatia et al. 2010). Aquests receptors expressats en la regió luminal del vas són molt més accessibles als compostos en circulació que els antigens sobreexpressats en la cèl·lula tumoral; per això varis virus han estat modificats per ser direccionats a la vasculatura tumoral a través de lligands d'alta afinitat (Liu and Deisseroth 2006). A més els antigens associats a l'endoteli tumoral i que el diferencien de la vasculatura normal es mantenen independentment del tipus de tumor, i per tant els virus redirigits cap a la vasculatura tumoral es poden utilitzar per un gran nombre de tumors (Pasqualini, Koivunen et al. 1997; Bachtarzi, Stevenson et al. 2011). Per exemple Bachtarzi i col·laboradors proposen un adenovirus recobert per un polímer i dirigit cap a les cèl·lules endotelials mitjançant un anticòs monoclonal per reconèixer la P-selectina; així aconseguen una major persistència en sang i una augment de l'entrada al tumor (Bachtarzi, Stevenson et al.). En aquesta direcció també s'ha demostrat que el canvi de la fibra de l'adenovirus 5 per la fibra de l'adenovirus 35 generant el virus quimèric Ad5/35 també presenta un major tropisme per les cèl·lules endotelials (Shinozaki, Suominen et al. 2006).

A més la vasculatura tumoral suposa una barrera per l'arribada del virus a la massa tumoral, per això cal dissenyar estratègies per augmentar l'extravasació dels virus cap al parènquima tumoral i la permeabilitat vascular.

Amb aquest objectiu, Chen i col·laboradors van armar un vector adenoviral amb la glicoproteïna fusogènica de membrana del virus de la leucèmia del gibó (GALV) sota el control d'un promotor específic de cèl·lula endotelial. Així es generaven fusions de cèl·lules endotelial i epitelials que creaven una nova via d'entrada pel virus de la sang al parènquima tumoral i augmentava la replicació viral als tumors (Chen, Cawood et al. 2011). El pretractament amb interleuquina-2 (IL-2), factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), histamina o bradiquinina augmenta la permeabilitat vascular (Russell, Peng et al. 2012). Així s'ha demostrat que el pretractament amb TNF $\alpha$  abans de l'administració de l'adenovirus augmenta la permeabilitat dels vasos, i en conseqüència l'arribada i transducció del virus al tumor. Tot i que aquest tractament també augmenta l'arribada del virus al fetge,

---

no dona lloc a una augment de l'expressió de gens virals en aquest òrgan (Seki, Carroll et al. 2011). També els tractaments amb quimioteràpia maten les cèl·lules i redueixen la pressió intersticial millorant l'extravasació de les macromolècules.

### **a) El pèptid RGD i les integrines**

Moltes integrines, en concret les  $\alpha_v$  integrines, reconeixen la seqüència Arg-Gly-Asp (RGD) en els seus lligands, per això aquest pèptid és molt emprat per redirigir molècules a la vasculatura tumoral i a les cèl·lules tumorals que sobreexpressen aquestes integrines (Ruoslahti 1996). El redireccionament de drogues i virus cap a antígens expressats tant a la vasculatura tumoral com a les cèl·lules del tumor donen un avantatge addicional (Ruoslahti, Bhatia et al. 2010). Pasqualini i col·laboradors van demostrar per primera vegada que el pèptid RGD-4C (pèptid RGD amb una conformació cíclica) expressat a la superfície d'un fag presentava tropisme tumoral al ser administrat sistèmicament, a més demostraven que el fag s'acumulava a les cèl·lules endotelials dels vasos tumorals gràcies a la seva capacitat d'unir selectivament integrines (Pasqualini, Koivunen et al. 1997). Tot i això també van mostrar que quan el fag només es deixava circular durant uns minuts (situació similar a l'administració sistèmica de l'adenovirus), aquest no podia extravasat ni penetrar a la massa tumoral (Pasqualini, Koivunen et al. 1997).

Aquest pèptid ha estat emprat per diferents grups per augmentar la transducció tumoral. S'ha inserit a: i) l'extrem C-terminal de la fibra augmentant la transducció de cèl·lules endotelials i de musculatura llisa (Wickham, Tzeng et al. 1997), ii) l'HI *loop* augmentant la unió i transducció de cèl·lules endotelials i tumorals (Dmitriev, Krasnykh et al. 1998) i la potència antitumoral *in vitro* i *in vivo* (Suzuki, Fueyo et al. 2001), iii) al *shaft* de la fibra substituint el domini KKTK d'unió a heparan sulfat proteoglicans augmentant la transducció de les cèl·lules tumorals, millorant la relació virus al tumor / virus al fetge (Bayo-Puxan, Gimenez-Alejandre et al. 2009) i la seva eficàcia antitumoral *in vivo* (Rojas, Gimenez-Alejandre et al.), iv) la regió hipervariable-5 (HVR5) (Vigne, Mahfouz et al. 1999; Kurachi, Koizumi et al. 2007), i a v) la proteïna IX augmentant la transducció de cèl·lules d'endotelioma (Vellinga, Rabelink et al. 2004).

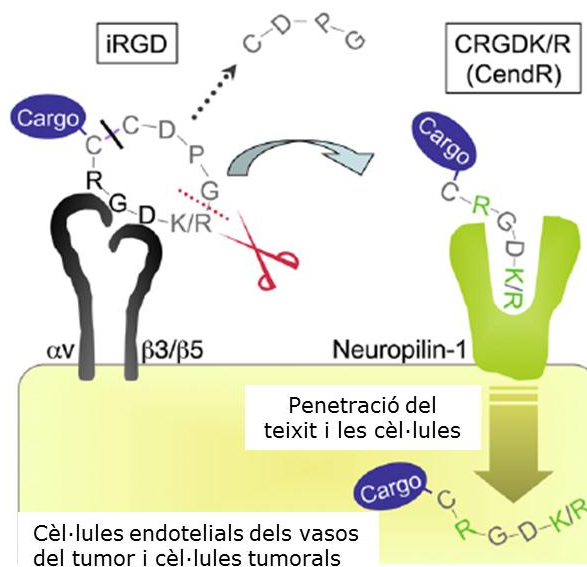
## **b) El pèptid iRGD i la Neuropilina-1**

Un dels principals problemes de les drogues redirigides cap als tumors és que, en general, no penetren més enllà de les 3-5 capes de cèl·lules al voltant dels vasos (Hambley and Hait 2009). Teesalu i col·laboradors a partir d'una llibreria de fags expressant pèptids de 8 aminoàcids a l'atzar van realitzar un procés de *screening* per seleccionar pèptids que presentessin major afinitat per cèl·lules de tumor de pròstata. Així van identificar que els pèptids de major afinitat presentaven sempre una arginina a l'extrem C-terminal i tenien una seqüència consens R/KXXR/K. Van demostrar que els fags que presentaven aquests pèptids s'unien i s'internalitzaven millor en les cèl·lules tumorals i que la posició C-terminal d'aquests pèptids era imprescindible per la seva funció, per això els van anomenar *CendR peptides* (de l'anglès *C-end rule*, regla del C-terminal), sent el RPARPAR el pèptid prototip. Van demostrar que aquests pèptids interaccionaven amb la neuropilina-1 (NRP-1) a les cèl·lules diana, i això els permetia penetrar dins la cèl·lula, augmentar la permeabilitat vascular i la penetració tissular. Així la partícula unida al pèptid era capaç de travessar els vasos i disseminar-se pel teixits. A més van demostrar que el domini CendR pot ser exposat a l'extrem C-terminal gràcies a la proteòlisi del pèptid (Teesalu, Sugahara et al. 2009).

El mateix grup, va realitzar un procés de selecció *in vivo* de pèptids expressats a la superfície de fags per d'identificar aquells que tinguessin afinitat per la vasculatura tumoral. Així es va identificar el pèptid iRGD amb seqüència CRGDK/RGPD/EC. L'iRGD té un domini RGD que interacciona amb les integrines de la superfície cel·lular, un cop unit, és proteolitzat per una proteasa cel·lular desconeguda exposant un domini CendR que li permet la interacció amb la neuropilina-1 penetrant a les cèl·lules tumorals i als teixits. Aquest procés en dos passos afegeix selectivitat tumoral ja que tant les integrines com la neuropilina-1 (Pellet-Many, Frankel et al. 2008) estan sobreexpressades en tumor. Segons els autors, el mateix pot passar amb la proteasa desconeguda que processa l'iRGD. Aquest pèptid, a més d'augmentar la unió i internalització cel·lular dels fags, augmenta el *targeting* i la penetració al tumor de fluoròfors, fags, micel·les, anticossos, etc. als que està conjugat. A més augmenta l'eficàcia del diagnòstic per imatge amb nanopartícules i l'activitat antitumoral d'agents com l'abraxane (paclitaxel recobert d'albúmina). El pèptid iRGD supera les limitacions del pèptid RGD pel que fa a l'extravasació dels vasos i la penetració del parènquima tumoral contra l'elevada pressió intersticial (Sugahara, Teesalu et al. 2009). A més, co-administrat de forma soluble amb diferents drogues antitumorals com abraxane, doxorubicina o doxorubicina encapsulada en liposomes i trastuzumab presenta el

mateix efecte (Sugahara, Teesalu et al.) (**Figura 9**). En aquesta tesi, hem inserit el pèptid iRGD a la càpsida de l'adenovirus oncolític ICOVIR15K amb l'objectiu de dirigir el virus cap a la vasculatura i les cèl·lules tumorals i per augmentar l'extravasació i penetració a la massa tumoral i l'activitat antitumoral.

Les integrines ( $\alpha_v\beta_{3/5}$ ) i la NRP-1 estan sobreexpressades a l'endoteli tumoral, a més l'augment de l'expressió de NRP-1 correlaciona amb l'augment de l'agressivitat, l'estadi i el mal pronòstic en molts tipus tumorals com en càncers gastrointestinal, prostàtics, de pulmó, ovari, gliomes, osteosarcomes, melanomes i tumors de colon (Ellis 2006; Pellet-Many, Frankel et al. 2008; Wild, Staton et al. 2012), per això sembla una diana interessant per redirigir l'adenovirus al tumor. La NRP-1 s'expressa també a la vasculatura normal i angiogènica i a diferents tipus cel·lulars com osteoblasts, cèl·lules dendrítiques, cèl·lules T i altres (Ellis 2006). És un co-receptor amb un paper essencial en l'angiogènesi, la regulació de la permeabilitat vascular, el desenvolupament del sistema nerviós, i també juga un paper important en la supervivència, migració i invasió cel·lular.



**Figura 9. Mecanismes del pèptid iRGD: Unió i penetració.** El pèptid iRGD s'acumula a la superfície de les cèl·lules tumorals i de les cèl·lules endotelials dels vasos del tumor que expressen integrines  $\alpha_v$ . El motiu RGD permet la unió a les integrines. Posteriorment el pèptid és proteolitzat per una proteasa (desconeguda) associada a la cèl·lula tumoral per exposar l'element CendR (RXXK/R) a l'extrem C-terminal. L'element C-terminal promou la unió a la neuropilina-1 i en conseqüència la penetració a les cèl·lules i teixits. El pèptid pot penetrar a les cèl·lules i teixits amb una càrrega. Modificat de Sugahara *et al* 2009 (Sugahara, Teesalu et al. 2009).



### 3.5.3 DISSEMINACIÓ INTRATUMORAL DEL VIRUS

Un cop l'adenovirus arriba al tumor s'ha de disseminar per tota la massa tumoral per poder eliminar-la. Els tumors són masses heterogènies compostes per cèl·lules tumorals, endotelials, fibroblasts i cèl·lules immunes; a més les cèl·lules tumorals i els fibroblasts generen una matriu extracel·lular (ECM) constituïda per proteïnes com el col·lagen, la fibronectina o la laminina i per polisacàrids com l'àcid hialurònic. Aquest estroma no permissiu a la replicació viral, no només bloqueja la dispersió del virus per la massa cancerosa, sinó també l'arribada de les drogues des dels vasos a les cèl·lules tumorals (Neesse, Michl et al.).

La pressió intersticial, que és superior a l'interior del tumor que a la perifèria, dificulta l'extravasació dels vasos, l'arribada de macromolècules i nutrients i la disseminació del virus per la massa tumoral (Strauss and Lieber 2009). Com a conseqüència, la infecció és heterogènia i pitjor distribuïda com més gran és la massa tumoral ja que la pressió intersticial augmenta (Baxter and Jain 1989). Per això els virus després de l'administració intraperitoneal o sistèmica es localitzen al voltant dels vasos i de l'estroma. A més, l'activitat antitumoral disminueix al augmentar el tamany del tumor (Yu and Fang 2007).

Una diana molt interessant per millorar la dispersió del virus per la massa cancerosa i incrementar l'èxit de la teràpia són els fibroblasts. Els fibroblasts de l'estroma tumoral reben el nom de fibroblasts associats a tumor o CAFs. Els CAFs presenten un fenotip permanentment activat que indueix: i) la formació d'una matriu extracel·lular alterada, ii) una senyalització proliferativa sostinguda, iii) l'evasió dels supressors del creixement tumoral, iv) l'evasió de la resposta immune contra el tumor, v) l'activació de les capacitats invasives i la metastasis, vi) la inducció de l'angiogènesi, vii) la resistència a la mort cel·lular i viii) la desregulació dels mecanismes energètics de la cèl·lula (Kalluri and Zeisberg 2006) (Hanahan and Coussens). Aquestes propietats promotores del tumor, han fet que els CAFs esdevinguin una interessant diana per les teràpies antitumorals en general (Micke and Ostman 2005). En el cas de la viroteràpia, a més els fibroblasts limiten la difusió intratumoral del virus degut a la baixa permissivitat de replicació i a la capacitat de produir ECM (Sauthoff, Hu et al. 2003; Lopez, Viale et al. 2009) **(figura 8)**.

---

### **3.5.4 ESTRATÈGIES PER INCREMENTAR LA DISSEMINACIÓ INTRATUMORAL DEL VIRUS.**

Per augmentar la disseminació del virus per la massa tumoral s'han proposat varies estratègies: superar la barrera de l'estroma mitjançant l'ús d'enzims degradadors de la matriu extracel·lular o augmentant la permissivitat dels fibroblasts i l'augmentar l'alliberació viral de la cèl·lula infectada.

#### **3.5.4.1 Ús d'enzims degradadors de la matriu i increment de la permissivitat dels CAF.**

Per millorar la dispersió del virus per la massa tumoral s'han armat els adenovirus oncolítics amb enzims degradadors de la matriu. La primera aproximació va ser l'ús de la relaxina. La relaxina és una hormona peptídica que disminueix l'expressió de col·lagen i augmenta l'expressió de metal·loproteïnases de la matriu (MMP) que degraden la matriu extracel·lular; aquests adenovirus milloren la dispersió del virus reduint la presència de teixit connectiu (Kim, Lee et al. 2006; Ganesh, Gonzalez Edick et al. 2007). Altres grups han investigat l'ús de la metal·loproteïnasa-8 (Cheng, Sauthoff et al. 2007) i la decorina (Choi, Lee et al. 2010) amb el mateix objectiu. L'àcid hialurònic també és una important barrera de l'estroma i una interessant diana terapèutica pel seu rol en la progressió tumoral (Toole 2004) i en la limitació de la disseminació viral. Per això la hialuronidasa humana PH20 ha estat utilitzada ja sigui per co-administració amb un adenovirus oncolític (Ganesh, Gonzalez-Edick et al. 2008) com armant-lo (Guedan, Rojas et al. 2010).

Amb l'objectiu de permetre la replicació dels adenovirus oncolítics en els CAFs es va introduir el promotor de SPARC, un promotor activat en les cèl·lules tumorals i CAFs, controlant l'expressió d'E1a. Així s'augmentava la potència antitumoral en un model de tumors amb mescleres de cèl·lula tumoral i fibroblasts (Lopez, Viale et al. 2009).

#### **3.5.4.2 Augment de l'alliberament viral de la cèl·lula infectada**

La sortida del virus de la cèl·lula infectada és un pas limitant del cicle viral, a 48 hores post-infecció (h.p.i) només el 20% del virus produït és alliberat. Aquesta taxa d'alliberament viral limita la dispersió cèl·lula a cèl·lula de la progènie viral i

l'eficàcia antitumoral (Gros and Guedan 2010). S'han descrit varies estratègies per augmentar l'alliberament de l'adenovirus de la cèl·lula infectada:

**a) Sobreexpressió d'ADP**

Tenint en compte que l'ADP és la principal proteïna implicada en l'alliberament viral i la lisi de la cèl·lula infectada, Doronin i col·laboradors van deletar tots els gens de la regió d'E3 excepte ADP. Això provocava canvis en la regulació transcripcional de la unitat E3 donant lloc a una sobreexpressió d'aquesta proteïna. La sobreexpressió d'ADP produïa un efecte citopàtic més temprà i augmentava la disseminació cèl·lula-cèl·lula del virus sense afectar a la seva producció degut a la lisis cel·lular prematura. A més, la sobreexpressió d'ADP també augmentava l'activitat antitumoral (Doronin, Toth et al. 2000). Posteriorment s'han proposat múltiples estratègies per sobreexpressar ADP (revisat a (Gros and Guedan 2010)).

**b) Inducció de l'apoptosi**

L'augment de l'apoptosi pot afavorir l'alliberament viral. Inicialment es va demostrar que la deleció de les proteïnes antiapoptòtiques E1B/19K i E1B/55K provoca la mort de la cèl·lula infectada per l'apoptosi induïda per E1A, un alliberament viral incrementat i un augment la potència antitumoral (Sauthoff, Heitner et al. 2000). Posteriorment amb el mateix objectiu es van armar adenovirus oncolítics amb gens inductors d'apoptosi com el gen supressor de tumors p53 (Sauthoff, Pipiya et al. 2002; van Beusechem, van den Doel et al. 2002) o TRAIL (de l'anglès TNF-apoptotic-inducing ligand) (Sova, Ren et al. 2004).

**c) Bioselecció de mutacions**

L'evolució dirigida o bioselecció permet identificar mutants amb una potència incrementada en un entorn determinat. Aquest no és un concepte nou, ja al 1952 Alice Moore va demostrar la capacitat dels virus d'adaptar-se a la replicació en un entorn determinat a través de successives rondes de replicació en aquest entorn i l'aplicació d'això tant per generar virus amb més potència oncolítica com per atenuar-los (Moore 1952). Molt posteriorment s'ha utilitzat aquesta estratègia per aïllar mutants amb una potència oncolítica augmentada (Yan, Kitzes et al. 2003;

---

Subramanian, Vijayalingam et al. 2006; Kuhn, Harden et al. 2008; Uil, Vellinga et al. 2011), a més les tècniques d'ADN recombinant i de seqüenciació han permès aïllar els mutants i identificar les mutacions responsables de l'augment de la potència oncolítica. Aquesta aproximació permet identificar mutacions puntuals que augmentin la potència de l'adenovirus sense afectar a la seva viabilitat i capacitat replicativa ni augmentar el tamany del genoma. A més aquesta estratègia té la capacitat de conferir noves funcions a gens virals (Gros, Martinez-Quintanilla et al. 2008).

Aquesta tècnica consisteix en la mutagènesis a l'atzar d'un estoc de virus seguida de múltiples rondes de replicació en un entorn controlat per tal d'enriquir l'estoc amb els mutants més potents en aquest entorn. Finalment els mutants s'han d'aïllar i identificar les mutacions responsables del fenotip. Per tant es poden controlar dues variables: per una banda la variabilitat de l'estoc inicial i per l'altre la pressió selectiva. Per generar variabilitat en l'estoc inicial s'han emprat mutàgens químics i llum ultraviolada (UV) que indueixen mutacions puntuals (Yan, Kitzes et al. 2003; Subramanian, Vijayalingam et al. 2006), però també s'ha utilitzat polimerases adenovirals modificades per introduir una taxa de mutacions més elevada (Uil, Vellinga et al. 2011) i fins hi tot la combinació de varis serotips adenovirals sota condicions que afavoreixin la recombinació entre ells (Kuhn, Harden et al. 2008). Pel que fa a l'entorn selectiu, fins avui s'han utilitzat cèl·lules tumorals de diferents orígens (Yan, Kitzes et al. 2003; Subramanian, Vijayalingam et al. 2006; Kuhn, Harden et al. 2008; Uil, Vellinga et al. 2011) i tumors subcutanis *in vivo* (Gros, Martinez-Quintanilla et al. 2008).

Mitjançant aquesta estratègia s'han identificat varies mutacions puntuals que augmenten l'alliberament viral de l'adenovirus. Per una banda Yan i col·laboradors van utilitzar la mutagènesis a l'atzar i la bioselecció en cèl·lules tumorals per identificar mutants amb una potència incrementada i van aïllar dos mutants amb 7 mutacions diferents, però van identificar com a principal mutació responsable del fenotip la truncació de l'extrem C-terminal de la proteïna i-leader (Yan, Kitzes et al. 2003). Més tard Subramanian i col·laboradors van dur a terme un procés de bioselecció similar amb un virus que tenia l'ADP delecionada per identificar mecanismes virals que permetessin compensar la falta d'aquesta proteïna. Van identificar varis mutants que tenien delecions de les proteïnes E1B/19K i E1B/55K, les cèl·lules infectades amb aquests mutants morien per una apoptosi prematura i així el virus presentava un alliberament avançat. També un dels mutants presentava una truncació de l'extrem C-terminal de la proteïna i-leader (Subramanian, Vijayalingam et al. 2006). Independentment del mecanisme, la

coincidència de la truncació de l'extrem C-terminal de la proteïna i-leader posa de manifest la importància d'aquesta mutació per l'alliberament viral de la cèl·lula tumoral.

També per un procés de mutagènesis i varies rondes de bioselecció *in vivo* d'aquells mutants que presentaven una major eficàcia antitumoral, el nostre grup va identificar la mutació E3/19K-445A. Aquest mutant presenta un alliberament avançat del virus que augmenta la seva potència antitumoral *in vitro* i *in vivo*. La mutació E3/19K-445A provoca la pèrdua del domini de retenció al reticle endoplasmàtic, de manera que aquesta proteïna enlloc de quedar-se al reticle endoplasmàtic retenint l'MHC-I i per tant evitant la presentació d'antígens, es localitza a la membrana cel·lular perdent la seva funció immunoevasiva, però guanyant una nova funció implicada en l'alliberament viral (Gros, Martinez-Quintanilla et al. 2008).

Finalment Uil i col·laboradors han establert un nou mecanisme per generar estocs d'adenovirus mutants. Han seleccionat mutants de la polimerasa adenoviral que presenten una taxa d'introducció de mutacions superior. Aquesta polimerasa expressada en *trans* en cèl·lules productores s'utilitza per introduir mutacions a un adenovirus amb la polimerasa delecionada. A més aquest sistema permet realitzar successives rondes per introduir varies mutacions complementaries. Per validar el mètode, van realitzar un procés de bioselecció per identificar mutants amb una potència incrementada en cèl·lules tumorals i van identificar una mutació al lloc d'*splicing* de l'ADP que provocava la seva sobreexpressió (Uil, Vellinga et al. 2011).

Una aproximació similar va consistir en co-infectar cèl·lules tumorals amb diferents serotips adenovirals per afavorir la recombinació entre ells, fent múltiples rondes de replicació en cèl·lules de carcinoma de colon. Així van identificar el ColoAd1 que és una quimera entre els serotips Ad3/11p i presenta una delecio completa de la regió E3, una petita delecio a E4 i modificacions en la regió E2B que augmenten el seu índex terapèutic (potència/selectivitat) comparat amb l'adenovirus 5 natiu (Kuhn, Harden et al. 2008). El ColoAd1 augmenta la citotoxicitat de l'adenovirus però no s'ha descrit el mecanisme.

En el context d'aquesta tesis i amb l'objectiu de millorar la disseminació intratumoral del virus, vam voler aïllar mutants que augmentessin la replicació i l'alliberament viral en CAFs a partir d'un procés de bioselecció en aquestes cèl·lules.

### 3.5.5 ACTIVACIÓ DE LA RESPOSTA IMMUNE.

L'adenovirus administrat sistèmicament indueix una forta inflamació aguda iniciada pel reconeixement dels patrons moleculars associats a patògen (PAMPs) a través dels receptors de reconeixement de patró (PRRs) dels macròfags, cèl·lules dendrítiques i cèl·lules epitelials (Bowie and Unterholzner 2008). Això genera un pic de citocines com IL-1, IL-6 i TNF- $\alpha$  que activarà els efectors de la resposta innata. Inicialment, hi ha un pic entre 1 i 6 hores després de l'administració mediat principalment per les cèl·lules de Kupffer; i un pic secundari entre els 5 i 7 dies degut a l'expressió de gens virals (Liu and Muruve 2003; Liu, Zaiss et al. 2003). Aquests successius pics de citocines reclutaran inicialment neutròfils i cèl·lules NK al lloc de la infecció, posteriorment monòcits i cèl·lules T i permetran la maduració de la resposta immune donant lloc a una resposta adaptativa i de memòria (Alemany and Cascallo 2009). S'ha demostrat que l'adenovirus salvatge administrat sistèmicament dóna lloc a necrosis tumoral, però el virus és ràpidament eliminat pel sistema immune i els tumors recidiven no generant cap avantatge per la supervivència del pacient (Kelly and Russell 2007).

Com s'ha descrit en l'apartat del cicle viral de l'adenovirus (veure apartat 3.2.3.3), aquest presenta varis mecanismes per evadir la resposta immune antiviral però aquests no són suficients per evitar la ràpida eliminació del virus (Alemany and Cascallo 2009).

Tot i que les millors respostes clíniques amb adenovirus oncolítics s'han obtingut en pacients immunosuprimits (Kelly and Russell 2007), el paper del sistema immune en la teràpia no està clar. Per tal que la teràpia amb adenovirus oncolítics sigui efectiva, el virus ha d'arribar a totes les cèl·lules tumorals disseminades per l'organisme; però, vistes les limitacions en la biodistribució sistèmica del virus això sembla molt poc probable. Més raonable és esperar una cooperació del sistema immune per poder eliminar aquestes cèl·lules disseminades. Els tumors generen un entorn immunosuprimint; la replicació viral pot trencar aquesta forta immunosupressió reduint la massa tumoral i actuant com una forta senyal de perill que permetrà generar una resposta immune antiviral però també antitumoral. Aquesta resposta immune antitumoral tindrà la capacitat d'eliminar tant el tumor primari com les possibles metàstasis, tot i això és probable que les metàstasis també necessitin rebre virus per permetre la funció de la resposta immune antitumoral. Per augmentar aquesta resposta molts grups han armat els adenovirus amb gens immunoestimuladors com el GM-CSF (Factor estimulator de colònies de granulòcits i macròfags) (Ramesh, Ge et al. 2006), l'IFN- $\alpha$  (Shashkova, Spencer et al. 2007) i l'IFN- $\gamma$  (Sarkar, Su et al. 2005) i múltiples citocines com la

IL-4 (Post, Sandberg et al. 2007), la IL-12 (Bortolanza, Bunuales et al. 2009) i la IL-24 (Sarkar, Su et al. 2005); i amb receptors cel·lulars com el lligand de CD40 (Fernandes, Gomes et al. 2009) i l'anticòs AntiCTLA-4 (Dias, Hemminki et al.) (**figura 8**).

### **3.5.6 ALTRES ESTRATÈGIES PER AUGMENTAR LA POTÈNCIA ADENOVIRAL. AUGMENT DE LA CITOTOXICITAT.**

L'augment de la capacitat citotòxica dels adenovirus també dóna lloc a un augment de l'activitat antitumoral i per tant de l'eficàcia de la teràpia. Per augmentar aquesta citotoxicitat s'han utilitzat estratègies com:

- Armar l'adenovirus amb gens suïcides que codifiquen per un enzim convertidor de pro-drogues que convertirà una pro-droga no tòxica en un metabòlit tòxic que matarà la cèl·lula infectada. Aquests gens a més d'induir la mort de les cèl·lules infectades, presenten efecte colateral o *bystander effect* pel qual els metabòlits tòxics difonen afectant també les cèl·lules veïnes, així es poden eliminar no només cèl·lules tumorals sinó també cèl·lules veïnes no permissives com els fibroblasts. Els sistemes més utilitzats són el sistema timidina quinasa-Ganciclovir (Wildner, Morris et al. 1999; Cascante, Huch et al. 2005; Cascante, Abate-Daga et al. 2007) i el sistema citosina deaminasa-5'fluorocitosina (Akbulut, Zhang et al. 2003).
- Armar l'adenovirus amb proteïnes fusogèniques com les proteïnes env del virus de la immunodeficiència humana (env HIV) (Dewar, Natarajan et al. 1989) o la proteïna fusogènica de membrana del virus de la leucèmia del simi gibó (GALV) (Guedan, Grases et al. 2012) que indueixen la formació de sincitis entre varies cèl·lules. La formació d'aquests sincitis no afecta a la replicació del virus i millora la seva dispersió.
- La combinació dels adenovirus amb agents quimioteràpics i radioteràpia ha demostrat sinèrgia en l'activitat antitumoral tant en models preclínic (Bhattacharyya, Francis et al.; Cherubini, Kallin et al.) com clínics (Pesonen, Kangasniemi et al. 2011). És probable que aquesta sinèrgia sigui deguda a la immunosupressió general que provoquen aquestes drogues, que pot facilitar l'arribada del virus al tumor al ser injectada sistèmicament i la replicació viral degut a una disminució dels anticossos neutralitzants (Chu, Post et al. 2004). En aquesta direcció també s'administren drogues immunosupressores com la ciclofosfamida que disminueix la resposta immune antiviral, la generació d'anticossos neutralitzants i limfòcits T

reguladors i afecta la vasculatura tumoral augmentant l'extravasació de virus (Di Paolo, Tuve et al. 2006; Russell, Peng et al. 2012). També s'han descrit efectes sinèrgics amb drogues tan inductores de l'autofàgia com el RAD001 (Alonso, Jiang et al. 2008) com amb inhibidors de l'autofàgia (Botta, Passaro et al.).

### **3.6 MODEL ANIMAL PER LA CARACTERITZACIÓ DELS ADENOVIRUS ONCOLÍTIQS *IN VIVO***

El model animal més utilitzat per la caracterització dels adenovirus oncolítics *in vivo* és el ratolí però aquest model presenta varies limitacions. Per una banda l'expressió de CAR en els teixits murins no segueix exactament la mateixa distribució que en l'humà. En humans s'ha demostrat una alta expressió en cor, pàncrees i cervell, també a nivells més baixos en pròstata, testicle, pulmó, fetge i intestí. En ratolí s'ha demostrat una alta expressió de CAR en fetge, ronyó, cor, pulmó, cervell i testicle (Bergelson, Krithivas et al. 1998). Aquesta expressió diferencial pot afectar a la biodistribució del virus i cal tenir-ho en compte al extrapolar les dades del model humà al murí. A més els eritròcits humans, a diferència dels murins, expressen CAR (Carlisle, Di et al. 2009), la qual cosa pot afectar a la quantitat de virus biodisponible per transduir els teixits i la toxicitat hematològica.

L'adenovirus és espècie específic, per això el model estàndard per estudiar l'activitat antitumoral són ratolins immunodeficients amb tumors humans perquè el virus pugui replicar en les cèl·lules del tumor. Això genera dos problemes, per una banda aquests tumors humans contindran l'estroma murí que no serà permissiu a la replicació del virus i per tant limitarà l'efecte del virus oncolíctic. I per altre banda no permet estudiar l'efecte del sistema immune en la teràpia. A més, la no permissivitat del model també té efectes en els estudis de toxicitat, ja que s'esperaria una toxicitat superior en un model permissiu.

El hámster siri (*Mesocricetus auratus*) ha estat descrit com a model immunocompetent i semi-permissiu per la replicació de l'adenovirus. S'ha demostrat activitat antitumoral d'adenovirus oncolítics en varis models tumorals, inducció de resposta immune antiviral i replicació al fetge i als pulmons (Thomas, Spencer et al. 2006). A més, s'ha demostrat que és un model adequat per l'estudi de la toxicitat, que és superior que en el model murí degut a la replicació viral (Lichtenstein, Spencer et al. 2009).



La rata del cotó (*Sigmodon hispidus*) també s'ha descrit com a model immunocompetent i semi-permissiu per la replicació dels adenovirus oncolítics. A més s'han descrit varies línies cel·lulars amb la capacitat de formar tumors i on adenovirus oncolítics han demostrat certa activitat antitumoral (Toth, Spencer et al. 2005; Steel, Morrison et al. 2007).

Finalment, s'han identificat algunes línies cel·lulars murines permissives a la replicació viral; tot i que la producció viral en aquestes línies és molt baixa s'ha demostrat activitat alguns adenovirus oncolítics (Hallden, Hill et al. 2003; Oberg, Yanover et al.).

En aquesta tesi, hem utilitzat el model de hámster siri per l'estudi de l'activitat antitumoral en un entorn immunocompetent. Tot i que l'estudi de la resposta immune en aquest model és veu dificultada per la manca de reactius específics per aquesta espècie, els nostres resultats mostren que és el model més permissiu a la replicació viral. A més hem utilitzat el model murí immunocompetent per l'estudi de la toxicitat i el model murí immunodeficient pels estudis d'eficàcia antitumoral.

**Objectius**



La viroteràpia amb adenovirus oncolítics és una teràpia prometedora. Els assaigs clínics mostren un bon perfil de toxicitat d'aquests agents però una limitada eficàcia antitumoral, mostrant respostes transitòries que no són capaces d'eliminar la massa tumoral. Una de les limitacions més importants a l'eficàcia dels adenovirus oncolítics és la distribució intratumoral del virus després de l'administració sistèmica, que es veu limitada per la baixa extravasació i penetració del virus per la massa tumoral i per les barreres estromals.

L'objectiu general d'aquesta tesi és:

Dissenyar estratègies per augmentar la potència dels adenovirus oncolítics superant les barreres biològiques a la penetració del virus a la massa tumoral i la seva disseminació intratumoral, augmentant així l'eficàcia antitumoral en models immunodeficients i immunocompetents. Els objectius concrets plantejats van ser:

1. Bioseleccionar mutació/ns que augmentin la replicació i/o alliberament viral de l'adenovirus en els fibroblasts associats a tumor mitjançant múltiples rondes de replicació en aquest entorn i caracteritzar la/les mutació/ns aïllades *in vitro* i *in vivo*. Estudiar l'efecte additiu d'aquestes mutacions amb la mutació E3/19K-445A identificada prèviament pel nostre grup.
2. Incorporar la/es mutació/ns bioseleccionades en CAF a un adenovirus oncolític i caracteritzar el seu efecte en la potència del virus *in vitro* i *in vivo*.
3. Modular farmacològicament l'efecte antitumoral de l'adenovirus oncolític amb i sense la mutació bioseleccionada en models immunodeficients i immunocompetents.
4. Inserir el pèptid de penetració tumoral iRGD a l'extrem C-terminal de la fibra i caracteritzar l'augment de l'extravasació i penetració del virus amb iRGD a la massa tumoral, així com la seva eficàcia antitumoral.



**Resultats**



---

## **INFORME DELS DIRECTORS SOBRE EL FACTOR D'IMPACTE DELS ARTICLES PUBLICATS**

Com a directors de la tesis doctoral de la Cristina Puig Saus, titulada "Estratègies de millora de la potència antitumoral dels adenovirus oncolítics basades en l'increment de l'alliberament viral i l'extravasació vascular", fem constar que la doctoranda ha estat la principal responsable de l'execució, anàlisi dels resultats i redacció de l'article titulat "Adenovirus i-Leader Truncation Bioselected Against Cancer-associated Fibroblasts to Overcome Tumor Stromal Barriers" i dels altres dos manuscrits pendents de publicació. La doctoranda també ha participat activament en el disseny experimental i en la discussió i obtenció de conclusions d'aquests treballs. També ha col·laborat en l'obtenció de resultats publicats en l'article titulat "Verapamil Enhances the Antitumoral Efficacy of Oncolytic Adenoviruses". El factor d'impacte dels articles publicats s'especifica a continuació.

### **Articles publicats:**

**Cristina Puig-Saus**, Alena Gros, Ramon Alemany and Manel Cascalló. *Adenovirus i-Leader Truncation Bioselected Against Cancer-associated Fibroblasts to Overcome Tumor Stromal Barriers*. *Molecular Therapy* 2012 Jan;20(1):54-62. **Factor d'Impacte (2011 JCR Science Edition): 6.873**

Alena Gros, Cristina Puig, Sonia Guedan, Juan José Rojas, Ramon Alemany and Manel Cascalló. *Mol Ther.* 2010 May;18(5):903-11. *Verapamil Enhances the Antitumoral Efficacy of Oncolytic Adenoviruses*. **Factor d'Impacte (2010 JCR Science Edition): 7.149**

### **Manuscrits en preparació:**

Cristina Puig-Saus et al. *The combination of i-leader truncation and gemcitabine improves oncolytic adenovirus efficacy in an immunocompetent model*.



Cristina Puig-Saus et al. *Insertion of iRGD tumor-penetrating peptide into an oncolytic adenovirus to enhance antitumor efficacy.*

Tot i que no s'inclouen com a resultants en aquesta tesi doctoral, però sí com a annex, la Cristina Puig també ha participat i és coautora de la següent publicació relacionada amb el tema de la seva tesi doctoral, i d'altres treballs pendents de publicació:

Alena Gros, Jordi Martínez-Quintanilla, Cristina Puig, Sònia Guedan, David G. Molleví, Ramon Alemany i Manel Cascalló. *Bioselection of a Ggain of Ffunction Mutation that Enhances Adenoviurs 5 Release and Improves Its Antitumoral Potency.* Cancer Research 2008 Nov 1;68(21):8928-37. **Factor d'Impacte (2008 JCR Science Edition): 7.514.**

Atentament,

Dr. Ramon Alemany Bonastre

Investigador del Laboratori

de Recerca Translacional

ICO-IDIBELL

[ralemany@iconcologia.net](mailto:ralemany@iconcologia.net)

Dr. Manel Cascalló Piqueras

Investigador del Laboratori

de Recerca Translacional

ICO-IDIBELL

[mcascallo@iconcologia.net](mailto:mcascallo@iconcologia.net)

Els resultats obtinguts en el treball experimental d'aquesta tesi s'han agrupat en quatre articles científics, dos publicats i dos en procés de preparació. Els resultats es mostren ordenats cronològicament en funció de l'evolució del camp. En aquesta memòria primer es descriuran breument els resultats i seguidament s'adjuntaran els articles.

### **Article 1**

Bioselecció de la truncació de l'i-leader de l'adenovirus en fibroblasts associats a tumor per superar les barreres de l'estroma tumoral.

### **Article 2**

La combinació de la truncació de l'i-leader amb gemcitabina millora l'eficàcia dels adenovirus oncolítics en un model immunocompetent.

### **Article 3**

El verapamil augmenta l'eficàcia antitumoral dels adenovirus oncolítics.

### **Article 4**

Inserció del pèptid de penetració tumoral iRGD en un adenovirus oncolíctic per augmentar l'eficàcia antitumoral



---

**RESUM ARTICLE 1:****“Bioselecció de la truncació de l’i-leader de l’adenovirus en fibroblasts associats a tumor per superar les barreres de l’estroma tumoral”**

Amb l’objectiu de superar les barreres fibròtiques de l’estroma que limiten la replicació dels adenovirus oncolítics en el tumor, es va dur a terme un procés de bioselecció d’un estoc d’Adwt-RGD (adenovirus 5 amb la inserció del pèptid RGD al HI loop de la fibra) mutagenitzat a l’atzar. Després de varies rondes de replicació en fibroblasts associats a tumor (CAFs) recollint els virus alliberats quan l’efecte citopàtic era incipient es van aïllar sis clons que presentaven una relació virus alliberat/virus produït incrementada en CAFs i fenotip de calba gran en A549. D’aquests es va seleccionar el més potent i a partir de la seqüenciació del genoma complet i del mapatge funcional es va identificar la truncació dels últims 17 aminoàcids de l’extrem C-terminal de la proteïna i-leader com a la mutació responsable del fenotip, i és va anomenar iLG397T. Aquesta mutació dona lloc a un fenotip de calba gran i a un augment de l’alliberació viral sense afectar a la producció total de progènie viral; a més és un fenotip dominant i apoptosi-independent. Aquestes propietats augmenten la citotoxicitat del virus en CAFs i diferents línies de cèl·lules tumorals. Tot i això, la combinació d’aquesta mutació amb la mutació dominant E3/19K-445A que també augmenta l’alliberament viral no és additiva, al contrari provoca una pèrdua de producció viral. *In vivo* la mutació iLG397T no afecta a la toxicitat hepàtica, hematològica ni augmenta la pèrdua de pes; en canvi augmenta l’eficàcia antitumoral i la supervivència de l’adenovirus Adwt-RGD en un model de carcinoma de pulmó humà subcutani, i encara més en un model subcutani de carcinoma de pulmó i fibroblasts humans. Aquesta mutació havia estat identificada prèviament en altres processos de bioselecció en cèl·lules tumorals però mai havia estat demostrada la seva eficàcia *in vivo*. Aquests resultats demostren que la truncació de la proteïna i-leader és una mutació interessant per augmentar la potència dels adenovirus oncolítics



**ARTICLE 1:****“Adenovirus i-Leader Truncation Bioselected Against Cancer-associated Fibroblasts to Overcome Tumor Stromal Barriers”**

Article publicat a Molecular Therapy

Cristina Puig-Saus, Alena Gros, Ramon Alemany i Manel Cascalló

**Contribució:** Seqüenciació i mapatge funcional de l'Adclone#2 (posteriorment anomenat AdiLG397T-RGD per la mutació responsable del fenotip) a partir dels mutants recombinants Adclone#2/ Adwt. Caracterització del fenotip del mutant (cinètiques de producció i alliberament viral, estudi del tamany de calba, citotoxicitat en fibroblasts i vèries línies tumorals, caracterització de la independència d'apoptosi del fenotip del mutant, estudi de dominància). Estudis de toxicitat i eficàcia *in vivo* i establiment del model de tumors subcutanis de mesclades de cèl·lules de carcinoma de pulmó i fibroblasts humans. Generació i caracterització (cinètica de producció i alliberament viral i tamany de calba) del virus AdiLG397T-445A-RGD. Preparació de les mostres pels arrays d'expressió, anàlisi dels resultats i validació (resultats no publicats). Preparació del manuscrit i revisió.



Informació protegida per drets d'autor.

**Cristina Puig-Saus**, Alena Gros, Ramon Alemany and Manel Cascalló. *Adenovirus i-Leader Truncation Bioselected Against Cancer-associated Fibroblasts to Overcome Tumor Stromal Barriers*. *Molecular Therapy* 2012 Jan;20(1):54-62.

Disponible a <http://www.nature.com/mt/journal/v20/n1/full/mt2011159a.html>





---

**RESUM ARTICLE 2:****“La combinació de la truncació de l’i-leader amb gemcitabina millora l’eficàcia dels adenovirus oncolítics en un model immunocompetent”**

La truncació de la proteïna i-leader augmenta l’alliberament viral, la citotoxicitat i l’activitat antitumoral de l’Adwt-RGD (adenovirus 5 amb la inserció del pèptid RGD al HI loop de la fibra) especialment en cèl·lules poc permissives a la replicació viral com els fibroblasts associats a tumor (CAFs). Amb l’objectiu d’incrementar la potència antitumoral de l’adenovirus oncolític ICOVIR-15, se li va introduir la mutació iLG397T que trunca l’extrem C-terminal de la proteïna i-leader, generant l’ICOVIR-15i. L’ICOVIR-15i presenta fenotip de calba gran i citotoxicitat incrementada en la línia humana de carcinoma de pulmó (A549) i en la línia semi-permissiva de carcinoma de pàncrees de hámster siri (HP-1); degut a un alliberament viral incrementat. A més la truncació de l’i-leader augmenta l’eficàcia antitumoral i la supervivència en un model de ratolí immunodeficient amb tumors subcutanis de carcinoma de pulmó gràcies a una millor distribució i persistència del virus per la massa tumoral. En canvi en el model immunocompetent de hámster siri amb tumors subcutanis de carcinoma de pàncrees només la combinació de ICOVIR-15i amb gemcitabina (tractament estàndard de càncer de pàncrees) mostra activitat antitumoral. La pèrdua de la capacitat citotòxica incrementada de l’ICOVIR-15i en combinació amb dosis creixents de gemcitabina *in vitro*, la pèrdua d’aquesta activitat antitumoral en tumors subcutanis de carcinoma de pàncrees de hámster siri en ratolins atímics i la proliferació de limfòcits específics contra la cèl·lula tumoral incrementada en els hámsters tractats amb ICOVIR-15i i gemcitabina sembla indicar que l’efecte d’aquesta combinació és degut a una resposta immune antitumoral. Aquests resultats confirmen que la truncació de la proteïna i-leader augmenta la potència antitumoral d’un adenovirus oncolític i revelen un efecte sinèrgic de la combinació de la truncació de l’i-leader amb gemcitabina en un entorn immunocompetent.



**ARTICLE 2:**

**“The Combination of i-Leader Truncation and Gemcitabine Improves Oncolytic Adenovirus Efficacy in an Immunocompetent Model”**

Article no publicat

Cristina Puig-Saus, Eduardo Laborda, Alba Rodriguez-García, Manel Cascalló, Rafael Moreno i Ramon Alemany

**Contribució:** Generació de l'adenovirus ICOVIR-15i i caracterització dels seu fenotip (tamany de calba, cinètica de producció i alliberament viral i citotoxicitat) en els diferents models presentats. Estudi i caracterització de l'eficàcia antitumoral, supervivència i distribució intratumoral del virus en els diferents models i tractaments presentats. Caracterització *in vitro* de l'efecte de la gemcitabina en la replicació viral i l'activitat antitumoral *in vivo* dels diferents tractaments en el model de ratolins atímics amb tumors pancreàtics subcutanis de hámster siri. Estudi comparatiu de la proliferació dels PBMCs dels hamsters dels diferents grups de tractament estimulats amb PBMCs infectats, HP-1 infectades i sense infectar. Titulació dels anticossos neutralitzants. Preparació del manuscrit.



Informació no disponible. Pendent de publicació.



---

**RESUM ARTICLE 3:****“El verapamil augmenta l’eficàcia antitumoral dels adenovirus oncolítics”**

Varis virus indueixen la mort cel·lular i l’alliberament de la progènie viral alterant l’homeòstasi de calci. A més la mutació E3/19K-445A identificada prèviament pel nostre grup i que augmenta l’alliberament viral, provoca un augment de la permeabilitat cel·lular i un increment de la concentració de calci intracel·lular. Així vam hipotetitzar que l’alteració de la concentració de calci intracel·lular induïda pel verapamil (un bloquejador de canals de calci) podia augmentar l’alliberament viral i per tant la dispersió intratumoral dels adenovirus oncolítics. Els resultats mostren que el verapamil augmenta l’alliberament viral de l’adenovirus salvatge en varies línies cel·lulars tumorals i CAFs, el tamany de calba i la citotoxicitat, per un mecanisme independent dels nivells d’ADP i sense alterar el patró d’expressió de proteïnes adenovirals. El mateix efecte té el verapamil sobre la replicació *in vitro* de l’adenovirus oncolíctic ICOVIR-5. L’augment de l’alliberament viral induït pel verapamil no és exclusiu, sinó que la combinació amb diferents bloquejadors dels canals de calci com l’amlodipine i el diltiazem presenten el mateix fenotip. La combinació de l’adenovirus amb verapamil no augmenta l’apoptosi; en canvi la combinació amb els diferents bloquejadors dels canals de calci augmenten l’autofàgia tant en les cèl·lules infectades com en les no infectades. L’autofàgia però, no és el mecanisme responsable de l’alliberament viral incrementat ja que la rapamicina que és un inductor d’autofàgia no augmenta l’alliberament viral ni el tamany de calba. *In vivo*, el verapamil augmenta l’activitat antitumoral en diferents models en ratolins atímics. Tot i aquest augment de la citotoxicitat antitumoral, el verapamil no augmenta la toxicitat hepàtica, hematològica, la pèrdua de pes ni l’expressió d’E1A al fetge, després de l’administració sistèmica en ratolins immunocompetents. Els nostres resultats ressalten l’interès de la combinació dels adenovirus oncolítics amb verapamil per incrementar l’eficàcia antitumoral.





**ARTICLE 3:**

**“Verapamil Enhances the Antitumoral Efficacy of Oncolytic Adenoviruses”**

Article publicat a Molecular Therapy

Alena Gros, Cristina Puig, Sonia Guedan, Juan José Rojas, Ramon Alemany i Manel Cascalló.

**Contribució:** Generació i caracterització del mutant AdADP-. Col·laboració en experiments de citotoxicitat i tamany de calba en línies cel·lulars. El treball presentat en aquest article ha estat realitzat bàsicament per la doctora Alena Gros.



Informació protegida per drets d'autor.

Alena Gros, Cristina Puig, Sonia Guedan, Juan José Rojas, Ramon Alemany and Manel Cascalló. *Mol Ther.* 2010 May;18(5):903-11. *Verapamil Enhances the Antitumoral Efficacy of Oncolytic Adenoviruses.*

Disponible a <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20179683>



---

**RESUM ARTICLE 4:****“Inserció del pèptid de penetració tumoral iRGD en un adenovirus oncolític per augmentar l’eficàcia antitumoral”**

Una de les principals limitacions dels adenovirus oncolítics és l’extravasació i penetració a la massa tumoral. L’iRGD és un pèptid que augmenta la penetració i disseminació per la massa tumoral de les macromolècules a les que està conjugat a través de la interacció amb integrines, neuropilina-1 (NRP-1) i de la seva proteòlisi per part d’una proteasa tumoral. Nosaltres hem inserit el pèptid iRGD a l’extrem C-terminal de la fibra de l’adenovirus oncolític ICOVIR15K per augmentar la seva penetració en la massa tumoral. L’ICOVIR15K presenta la substitució del domini KKTK d’unió a heparan sulfat proteoglicans del shaft de la fibra per un motiu RGDK d’unió a integrines. Aquesta mutació disminueix el targeting hepàtic i redirigeix el virus cap al tumor. *In vitro*, la interacció amb NRP-1 a través de la inserció al C-terminal de la fibra del pèptid RPARPAR (pèptid prototip de penetració a través de NRP-1) millora la unió i internalització del virus a cèl·lules tumorals que sobreexpressen NRP-1, el mateix efecte s’observa amb el pèptid iRGD però no en totes les línies cel·lulars, probablement per la manca de la proteòlisi que activa la internalització a través d’aquest pèptid. A més, l’entrada a través de NRP-1 no augmenta la transducció ni la citotoxicitat del virus. *In vivo*, la inserció del pèptid iRGD augmenta la transducció tumoral sense afectar a la resta d’òrgans, millora la disseminació intratumoral del virus probablement degut a un augment de la penetració tumoral i augmenta l’eficàcia antitumoral i la supervivència en dos models tumorals diferents. Els nostres resultats mostren l’interès de la inserció del pèptid iRGD per millorar l’èxit terapèutic dels adenovirus oncolítics, i la seva combinació amb altres estratègies de millora de la dispersió intratumoral és molt prometedora.



**ARTICLE 4:**

**“Insertion of iRGD tumor-penetrating peptide into an oncolytic adenovirus to enhance antitumor efficacy”**

Article no publicat

Cristina Puig-Saus, Eduardo Laborda i Ramon Alemany

**Contribució:** Generació dels adenovirus oncolítics ICOVIR15K-iRGD, ICOVIR15K-RPARPAR i dels vectors AdGLK i AdGLK-iRGD. Realització dels experiments de binding i internalització a les diferents línies cel·lulars, així com els experiments de transducció i citotoxicitat. Avaluació de la biodistribució, eficàcia antitumoral i supervivència en els diferents models tumorals mostrats. Anàlisi i quantificació de la distribució intratumoral del virus. Preparació del manuscrit.





Informació no disponible. Pendent de publicació.



**Discussió**



## DISCUSSIÓ

En aquesta tesi amb l'objectiu de superar les barreres biològiques que limiten l'eficàcia dels adenovirus oncolítics i augmentar la seva potència antitumoral hem proposat estratègies per millorar la disseminació intratumoral del virus i la seva l'extravasació dels vasos i penetració a la massa tumoral.

### **MILLORA DE LA POTÈNCIA ANTITUMORAL: L'AUGMENT DE L'ALLIBERAMENT VIRAL.**

Amb l'objectiu de superar les barreres fibròtiques a la dispersió intratumoral, vam dur a terme un procés de bioselecció en CAFs per aïllar mutacions que augmentessin la permissivitat de l'adenovirus en aquestes cèl·lules. L'expressió de CAR en fibroblasts és molt baixa (Hidaka, Milano et al. 1999; Stoff, Rivera et al. 2006), i per això vam partir d'un adenovirus que presentava una infectivitat incrementada per la inserció del pèptid RGD a l'HI *loop* de la fibra (Adwt-RGD). Primer vam realitzar un procés de mutagènesis amb àcid nítrós disminuint la viabilitat de l'estoc inicial 500 vegades, i a continuació vam realitzar la bioselecció a partir de varies rondes de replicació en CAF, recollint el sobrenedant que contenia el virus alliberat quan l'efecte citopàtic era incipient i utilitzant-lo per la següent ronda de replicació. Vam hipotetitzar que així enriqueiríem en cada ronda l'estoc de virus amb aquells mutants que presentessin un alliberament incrementat en aquest entorn.

A partir d'aquesta bioselecció en CAF vam aïllar diferents clons que presentaven una alliberament viral incrementat en CAFs i A549 (línia cel·lular de carcinoma de pulmó) (**Article 1, Figura 1**). D'aquests vam seleccionar el que presentava una millor relació virus alliberat / virus produït. A partir de la seqüenciació del genoma del mutant vam identificar varies mutacions que diferien de la seqüència de l'*adenovirus reference material* (ARM) i que ja estan catalogades com a mutacions que no alteren el fenotip de l'adenovirus salvatge (Barry J. Sugarman 2003) i 4 mutacions puntuals: un canvi d'una C per una G a la posició 32635, un canvi d'una T per una C a la posició 32638 i un canvi d'una AG per una TC a la posició 32678 aquestes tres mutacions són mutacions silents localitzades a la fibra. També vam identificar un canvi d'una G per una T a la posició 8374 (que coincideix amb el nucleòtid 397 de l'*i-leader*), aquesta mutació provoca la introducció d'un codó d'STOP i en conseqüència la truncació dels últims 17 aminoàcids de l'extrem C-terminal de la proteïna *i-leader*. Vam anomenar aquesta

mutació iLG397T. El mapatge funcional del virus va confirmar que la truncació de l'i-leader era la mutació responsable del fenotip (**Article 1, Figura 2**). Aquesta mutació provoca un alliberament viral incrementat sense afectar a la producció total de la progènie viral en CAF (**Article 1, Figura 3**). Això dóna lloc a un augment en el tamany de calba en la línia cel·lular tumoral A549 (representatiu de la disseminació cèl·lula-cèl·lula) (**Article 1, Figura 1 i 2**) i de la citotoxicitat en CAFs, fibroblasts normals, i diverses línies cel·lulars tumorals (**Article 1, Figura 3**). Així vam demostrar que el fenotip de la mutació aïllada no quedava restringit a l'entorn en el que havíem fet la bioselecció sinó que també millora la potència oncolítica en cèl·lules tumorals.

Vam demostrar que la truncació de l'i-leader no augmenta la toxicitat hepàtica, hematològica ni la pèrdua de pes després de l'administració sistèmica del virus en ratolins immunocompetents (**Article 1, Figura S1**) i que augmenta l'activitat antitumoral i la supervivència en un model de tumors subcutanis de carcinoma de pulmó humà en ratolins immunodeficients (**Article 1, Figura 6**). Aquest efecte era superior en un model de tumor subcutanis establerts a partir de mesclades de cèl·lules tumorals de carcinoma de pulmó i fibroblasts humans (**Article 1, Figura 7**). Al implantar un tumor subcutani a partir de cèl·lules humanes aquest és ràpidament infiltrat per fibroblasts d'origen murí, a més s'ha descrit que els fibroblasts humans no són capaços de sobreviure a llarg termini en tumors xenoimplantats en ratolí perquè les cèl·lules tumorals recluten nou estroma que serà d'origen murí (Parrott, Nilsson et al. 2001). Nosaltres vam demostrar la persistència dels fibroblasts humans xenoimplantats conjuntament amb diferents proporcions de cèl·lules tumorals fins com a mínim dia 32 post-implantació (**Article 1, Figura 7**). La presència d'aquests fibroblasts humans limita la dispersió del virus per la massa tumoral i permet estudiar l'efecte de la truncació de l'i-leader en la replicació en CAFs *in vivo*. Aquest model però també recluta estroma d'origen murí no permissiu a la replicació viral, i per tant no és un model ideal per estudiar les barreres fibròtiques i com la replicació augmentada en els CAFs pot millorar la teràpia amb els adenovirus oncolítics. Els tumors establerts a partir de mesclades de cèl·lules tumorals i fibroblasts humans són més agressius i presenten un creixement més ràpid degut a l'efecte dels fibroblasts humans en la progressió tumoral (**Article 1, Figura 7**). És probable que l'activitat antitumoral superior observada en aquest model sigui deguda a la major agressivitat del model i no a la superació de les barreres fibròtiques. De fet, no vam ser capaços de colocalitzar fibroblasts humans i replicació viral en els tumors tractats amb Adwt-RGD o AdiLG397T-RGD a dia 19 post-administració per la baixa quantitat de fibroblasts humans i els limitats focus de replicació viral (**Article 1, Figura 7**).

---

Per tal d'estudiar l'efecte de la replicació de l'adenovirus salvatge i del nostre mutant en els fibroblasts del tumor, una altra opció és estudiar la replicació dels virus en els fibroblasts que infiltren els tumors de hámster. Tot i que no hem aprofundit en aquest estudi (només es mostra un experiment d'eficàcia per administració intratumoral d'ICOVIR-15 i ICOVIR-15i, on no hi ha eficàcia antitumoral i a més no hem estat capaços de detectar replicació viral al final del tractament), la baixa permissivitat d'aquests tumors dificulta identificar focus de replicació i encara més avaluar el paper de les barreres fibròtiques en la dispersió intratumoral. Un altre bon model podrien ser els tumors ortotòpics establerts a partir de fragments de tumors humans amb pocs passis, de manera que encara conservessin estroma humà.

Un cop demostrat que la truncació de la proteïna i-leader incrementa la potència antitumoral de l'adenovirus sense afectar a la toxicitat després de l'administració sistèmica dels virus, vam introduir aquesta mutació a l'adenovirus oncolític ICOVIR-15 per tal d'augmentar la seva potència mantenint la selectivitat per la cèl·lula tumoral; generant així l'ICOVIR-15i. Com que l'expressió de l'i-leader està controlada per E1A, la seva truncació augmentarà la potència dels adenovirus oncolítics en cèl·lules tumorals i CAF que presentin un estat proliferatiu actiu. Vam comprovar que l'ICOVIR-15i presentava un alliberament viral incrementat sense afectar a la producció viral total en cèl·lules tumorals de carcinoma de pulmó, i que això augmentava el tamany de calba i la citotoxicitat en aquesta línia cel·lular **(Article 2, Figura 1)**. A més vam demostrar que la truncació de l'i-leader augmentava l'eficàcia antitumoral per administració intratumoral del virus, augmentant la supervivència gràcies a una millor disseminació i persistència del virus en la massa tumoral **(Article 2, Figura 2)**.

La truncació de la proteïna i-leader ja havia estat identificada prèviament en dos processos de bioselecció independents amb l'objectiu d'augmentar la potència oncolítica (Yan, Kitzes et al. 2003) i l'alliberament viral d'un adenovirus amb l'ADP delecionada (Subramanian, Vijayalingam et al. 2006) en cèl·lules tumorals. Això posa de manifest l'interès d'aquesta mutació per augmentar la potència oncolítica. De fet, a partir dels processos de bioselecció realitzats per identificar mutacions que augmentin la potència de l'adenovirus en la cèl·lula tumoral s'han identificat mutacions que provoquen la truncació de l'extrem C-terminal de la proteïna i-leader, la truncació del domini de retenció al ER de la proteïna E3/19K, la sobreexpressió d'ADP i la pèrdua de funció de les proteïnes antiapoptòtiques E1B/19K i E1B/55K. Totes aquestes mutacions provoquen un alliberament viral incrementat. A més aquestes mutacions (excepte la d'E3/19K, degut probablement



a haver estat seleccionada *in vivo* i que per tant la pressió ambiental és diferent) s'han identificat en processos de bioselecció independents o havien estat caracteritzades prèviament. Això sembla indicar que el pas del cicle viral limitant per la viroteràpia és l'alliberament viral i que els processos de replicació de l'ADN viral, expressió i processament de proteïnes adenovirals, l'encapsidació i l'empaquetament de l'ADN viral són processos ja molt optimitzats pel virus, com a mínim en l'entorn de la cèl·lula tumoral. A més suggereix que els mecanismes per augmentar aquest alliberament viral són limitats. I finalment demostra l'interès i la robustesa de la bioselecció com a mètode per aïllar mutants amb unes propietats determinades en un entorn determinat.

El mecanisme pel qual la truncació de l'i-leader augmenta l'alliberament viral no està clar, però diferents hipòtesis sobre els mecanismes implicats han estat postulades. Per una banda Yan i col·laboradors van demostrar que la truncació d'aquesta proteïna provoca la seva acumulació avançada a la regió perinuclear, i atribuïen això com a la causa de la replicació viral accelerada que observaven (Yan, Kitzes et al. 2003). Per altre banda Subramanian i col·laboradors suggerien que la forma sencera de la proteïna és inactiva i que pot ser funcionalment activada per proteòlisi de l'extrem C-terminal (Subramanian, Vijayalingam et al. 2006).

En un intent d'identificar els mecanismes implicats en el fenotip del mutant amb la truncació de la proteïna i-leader, vam realitzar *arrays* d'expressió comparant el perfil d'expressió entre l'adenovirus salvatge i els adenovirus AdLG397T i AdE3/19K-445A (adenovirus amb la truncació del domini de retenció al ER de la proteïna E3/19K, que presenta una cinètica d'alliberament viral similar al AdLG397T) a 24 h.p.i. L'objectiu era identificar grups de gens diferencialment expressats entre els dos mutants i l'adenovirus salvatge per intentar establir hipòtesis sobre els diferents mecanismes implicats en el seu fenotip. Vam establir una llista dels gens sobreexpressats i infraexpressats entre els dos mutants que presentaven un alliberament viral incrementat i vam comparar els seus nivells d'expressió amb els de l'adenovirus salvatge per eliminar de la llista aquells gens que no tenien una expressió diferencial entre l'AdLG397T i l'adenovirus natiu. Així descartàvem aquells gens diferencialment expressats respecte l'adenovirus salvatge degut a la cinètica avançada de l'alliberament viral, per exemple gens relacionats amb el citoesquelet que es veuen alterats degut a la lisi de la cèl·lula infectada en aquest punt i que en l'adenovirus salvatge s'activarien unes hores més tard. Amb aquesta llista de gens vam fer un anàlisi d'agrupament dels gens segons la seva anotació funcional, per identificar grups de gens implicats en mecanismes cel·lulars determinats. Així, vam hipotetitzar que els mecanismes implicats en el fenotip del

mutant amb la truncació de l'i-leader podien estar relacionats amb l'activació de l'apoptosi, l'activació de la via de NF- $\kappa$ B i expressió de citokines o amb l'alteració dels mecanismes de processament de l'ARNm. Tot i això no vam poder verificar cap d'aquestes hipòtesis. Per una banda vam confirmar que la truncació de la proteïna i-leader no activa l'apoptosi, ja que no augmenta els nivells de caspasa-3 i el seu fenotip de calba gran i alliberament viral incrementat no s'inhibeix en presència d'un inhibidor de caspases d'ampli espectre com el Q-VD-Oph (**Article 1, Figura 4**). Pel que fa a l'activació de la via de NF- $\kappa$ B, a partir d'un plàsmid reporter que controla l'expressió de luciferasa sota un promotor induïble per NF- $\kappa$ B, vam comprovar que l'AdiLG397T induïa el promotor a nivells superiors comparat amb l'adenovirus salvatge a 48 h.p.i, però un bloquejador de l'NF- $\kappa$ B com la dexametasona no era capaç de revertir el fenotip de calba gran del mutant i per tant sembla que l'activació del promotor de NF- $\kappa$ B no és una causa sinó una conseqüència de l'alliberament viral incrementat (Resultats no mostrats). Finalment, pel que fa als mecanismes de processament de l'ARNm, vam comprovar que no hi havia diferències entre l'AdiLG367T i l'adenovirus salvatge en el patró d'expressió de proteïnes, i assumint que diferències en el processament de ARNm donarien lloc a diferències en el perfil d'expressió de proteïnes vam concloure que els mecanismes de processament de l'ARNm no estaven alterats (Resultats no mostrats).

L'alliberament de la progènie té lloc al final del cicle viral i és un mecanisme molt poc eficient. De manera que a 48 h.p.i només un 20% del total de virus produït és alliberat (Gros and Guedan 2010). Prèviament a aquest treball, múltiples publicacions havien demostrat que l'augment de l'alliberament viral és una bona estratègia per augmentar la potència oncolítica *in vitro* i l'activitat antitumoral *in vivo* (Doronin, Toth et al. 2000; van Beusechem, van den Doel et al. 2002; Liu, Hallden et al. 2004; Sova, Ren et al. 2004; Gros, Martinez-Quintanilla et al. 2008). A més, a partir de models matemàtics predictius, Wein i col·laboradors havien postulat que en absència d'una resposta immune, per aconseguir l'eliminació completa dels tumors es necessita una alta disseminació del virus per la massa tumoral al moment de la infecció i una lisis de la cèl·lula infectada el més ràpida possible (Wein, Wu et al. 2003). Basant-nos en això, i amb l'objectiu d'augmentar encara més la disseminació intratumoral del virus i l'activitat antitumoral, vam generar el virus amb les dues mutacions puntuals dominants aïllades pel grup per augmentar l'alliberament viral, la mutació E3/19K-445A i la mutació iLG397T. Així vam generar el virus AdiLG397T-445A-RGD i vam comprovar que la combinació de les dues mutacions no augmentava el tamany de calba en A549 respecte els virus

amb les mutacions individuals (**Article 1, Figura 5**). A més vam demostrar que, el nou virus generat alliberava tota la progènie viral, però que la producció total de virus disminuïa en CAFs (**Article 1, Figura 5**). Confirmant que, tal com havia estat postulat per Wodarz i col·laboradors i per Paiva i col·laboradors, hi ha un rang òptim de citotoxicitat, i que els virus que presenten un alliberament avançat no necessàriament han d'augmentar l'activitat antitumoral (Wodarz 2001; Paiva, Binny et al. 2009). Maximitzar la mort cel·lular pot disminuir la producció viral, ja que les cèl·lules infectades moren abans de poder produir prou virus i de que aquest es dissemini per la massa tumoral, i per tant pot limitar l'èxit viroterapèutic.

Al caracteritzar el mecanisme afectat per la truncació del domini de retenció a ER de la proteïna E3/19K del mutant AdE3/19K-445A es va demostrar que la mutació provocava la re-localització d'aquesta proteïna a la superfície cel·lular i que això trencava l'homeòstasi de calci augmentant-ne la seva concentració intracel·lular. A més es va demostrar que el calci extracel·lular és imprescindible per la seva funció. Així es va hipotetitzar que la proteïna E3/19K-445A podia tenir funció tipus viroporina (Gros, Martinez-Quintanilla et al. 2008). Les viroporines són proteïnes que formen canals de calci selectius a les membranes i permeten el pas de ions i molècules petites; són un mecanisme utilitzat per diverses famílies de virus per promoure l'alliberament viral (Nieva, Madan et al. 2012). Pel que fa al mecanisme de lisis i alliberament viral de l'adenovirus, s'ha hipotetitzat que l'acumulació d'ADP podria comportar un alliberament de calci dels magatzems intracel·lulars (ER principalment) i una conseqüent activació dels enzims degradadors dependents de calci (Doronin, Toth et al. 2003). A partir d'aquestes hipòtesis vam postular que la combinació de l'adenovirus amb verapamil, un bloquejador dels canals de calci, podia alterar l'homeòstasi de calci intracel·lular augmentant l'alliberament viral i en conseqüència la dispersió intratumoral i l'eficàcia antitumoral. Vam demostrar que tant el verapamil com altres bloquejadors dels canals de calci augmentaven l'alliberament viral, el tamany de calba i la citotoxicitat en diferents línies cel·lulars tumorals i també en CAF (**Article 3, Figura 1 i 3**) per un mecanisme independent d'ADP (**Article 3, Figura 2**). Aquest fàrmac també augmentava l'alliberament viral de l'adenovirus oncolític ICOVIR-5, així com la seva eficàcia antitumoral (**Article 3, Figura 6**) sense afectar a la toxicitat hepàtica, hematològica ni a la pèrdua de pes després de l'administració sistèmica en ratolins immunocompetents (**Article 3, Figura 5**); confirmant que augmentar l'alliberament viral en una fase tardana del cicle viral no afecta a la selectivitat de l'adenovirus oncolític ICOVIR-5.

L'augment de l'alliberament viral com a estratègia per augmentar la potència dels adenovirus oncolítics queda àmpliament demostrada. La discussió se centra més en l'estratègia a utilitzar per augmentar aquest alliberament viral. A més de mutacions puntuals, s'ha descrit la sobreexpressió d'ADP, la deleció de funcions virals antiapoptòtiques i l'ús de transgens inductors d'apoptosis. Fins avui, les estratègies basades en la sobreexpressió d'ADP han deletat tota o una part de la regió E3 (revisat en (Gros and Guedan 2010)), això no afecta a la replicació del virus *in vitro*, però sí que pot afectar a la potència oncolítica del virus *in vivo*, especialment en un model immunocompetent. La deleció de proteïnes virals com E1B-19K indueixen una apoptosis prematura de la cèl·lula infectada i milloren l'eficàcia antitumoral (Liu, Hallden et al. 2004), però aquests virus poden perdre producció degut a una mort prematura (Pilder, Logan et al. 1984). Finalment l'ús de transgens inductors d'apoptosis com p53 (Sauthoff, Pipiya et al. 2002; van Beusechem, van den Doel et al. 2002) o TRAIL (Sova, Ren et al. 2004) ocupen un espai del genoma i limiten la combinació amb altres estratègies que requereixin la inserció de seqüències gèniques grans al genoma viral. L'ús de mutacions puntuals bioseleccionades és interessant perquè per una banda no comprometen la replicació del virus (almenys en l'entorn en que han estat bioseleccionades) i no ocupen espai en el genoma viral, permeten així la combinació amb altres estratègies. En el cas de la truncació de la proteïna i-leader que proposem en aquest treball és interessant perquè augmenta la potència oncolítica en cèl·lules tumorals i CAFs (una de les principals barreres a la dispersió intratumoral del virus), i a més no afecta a cap de les funcions relacionades amb l'evasió de la resposta immune conegudes del virus. Els mateixos avantatges presenta la combinació amb verapamil, que no afecta ni a la producció viral ni a l'expressió de proteïnes virals (**Article 3, Figura 2**). A més, tant la truncació de la proteïna i-leader com la combinació amb verapamil augmenten la potència antitumoral d'un adenovirus oncolíctic, sense augmentar la toxicitat. Tot i això el verapamil administrat sistèmicament podria tenir altres efectes en l'organisme degut al seu paper com a bloquejador dels canals de calci.

Una estratègia interessant seria la combinació en un adenovirus oncolíctic de la truncació de l'extrem C-terminal de la proteïna i-leader aïllada per augmentar la replicació en els CAFs amb enzims degradadors de la matriu extracel·lular com la relaxina o la hialuronidasa PH20 per millorar encara més la dispersió intratumoral del virus. També seria interessant estudiar la combinació de l'estratègia anterior amb verapamil. Tot i que el verapamil també augmenta l'alliberament viral d'un virus que sobreexpressa ADP (dl732), és possible que la combinació amb la

truncació de l'i-leader, al igual que la combinació de les mutacions iLG397T i E3/19K-445A, no presentés un fenotip additiu.

L'adenovirus és un virus molt immunogènic. La interacció del sistema immune amb el virus i la cèl·lula infectada juga un paper molt important en l'activitat antitumoral del virus. De fet, en la viroteràpia actual hi ha dues gran corrents; la que postula que el sistema immune s'ha de suprimir per evitar que el virus sigui eliminat i la que postula que el virus pot actuar de senyal de perill trencat la immunosupressió pròpia dels tumors i generant una resposta immune antitumoral (Alemany and Cascallo 2009). En aquesta dicotomia, el paper dels adenovirus que presenten un alliberament viral incrementat no està clar. Per una banda és possible que la presència de més virus extracel·lular generi una resposta immune innata superior que alhora desencadeni una major resposta immune adaptativa donant lloc a una ràpida eliminació del virus i les cèl·lules infectades (Gros and Guedan 2010). Per altre banda, també és possible que com abans s'alliberi el virus de la cèl·lula infectada menys probabilitat tingui de ser eliminat a la cèl·lula pels limfòcits T citotòxics, les cèl·lules NK i les cèl·lules fagocítiques i per tant més probabilitat tingui d'infectar una cèl·lula veïna (Tollefson, Scaria et al. 1996).

La majoria dels virus que presenten un alliberament viral avançat estudiats en un entorn immunocompetent presenten alteracions o delecions de les proteïnes de la regió E3 implicades en l'evasió del sistema immune. Les proteïnes de la regió E3 són prescindibles per la replicació *in vitro* però s'ha demostrat que són importants per l'eficàcia *in vivo*. Per una banda mantenir l'expressió dels gens de la regió E3 en els vectors adenovirals augmenta l'expressió dels transgens en animals immunocompetents (Ilan, Droguett et al. 1997). A més s'ha demostrat que la delecio de la regió E3B (que conté les proteïnes E3-10.4K, 14.5K i 14.7K responsables de la inhibicio de l'apoptosi activada per FasL, TRAIL i TNF- $\alpha$ ) provoca una disminucio de la persistència del virus al tumor, un augment de la infiltració de macròfags i de la secreció de citoquines antivirals (TNF- $\alpha$  i IFN- $\gamma$ ) i una disminucio de l'activitat oncolítica *in vivo* en models murins immunocompetents (Wang, Hallden et al. 2003). A més la delecio de les proteïnes E3-6.7K i E3-19K també accelera l'eliminació dels adenovirus oncolítics en el model immunocompetent de hámster siri (Bortolanza, Bunuales et al. 2009). Tot i que l'efecte de la delecio d'E3/19K és controvertida ja que Wang i col·laboradors han demostrat que la seva delecio augmenta la replicació viral en el tumor, i no augmenta ni la resposta inflamatori aguda ni la infiltració de limfòcits T en models murins, a més presenta la mateixa eficàcia antitumoral que l'adenovirus salvatge (Wang, Hallden et al.

2003). En una aproximació purament viroterapèutica on es confia en la replicació viral per eliminar el tumor és important mantenir íntegra la regió d'E3 per augmentar la persistència i disminuir la resposta immune antiviral. En canvi en una estratègia més immunocèntrica on a més d'eliminar el tumor a partir de la replicació viral es pretén augmentar les resposta immune antitumoral, la deleció de la regió E3 pot ser interessant i caldria avaluar les diferències en la resposta immune generada i l'activitat antitumoral en presència i absència d'aquestes proteïnes. La inflamació augmentada per la deleció de la regió E3B podria afavorir la resposta immune antitumoral. A més la deleció de la proteïna E3/19K seria interessant per tal d'augmentar la presentació d'antígens tumorals des de la cèl·lula infectada.

L'activitat antitumoral d'alguns virus que presenten un alliberament viral incrementat han estat estudiats en el model immunocompetent de hámster siri. El VRX-07 (Adenovirus 5 que sobreexpressa ADP) mostra activitat antitumoral en tumors renals subcutanis de la línia tumoral HaK després de l'administració intratumoral de  $1 \cdot 10^{10}$  pfu/ tumor als dies 0, 1, 2, 4-6 en hámster siri. Tot i això no hi ha diferències entre el virus control i el virus que presenta la sobreexpressió d'ADP (Thomas, Spencer et al. 2008). El mateix resultat es mostra amb el mutant AdE3/19K-445A, on després d'una única administració intratumoral de  $2.5 \cdot 10^{10}$  vp/tumor en tumors pancreàtics subcutanis de la línia HP-1 de hámster siri es mostra eficàcia antitumoral, però no diferències significatives entre el virus control (Ad5) i el mutant que presenta un alliberament viral incrementat (Gros, Martinez-Quintanilla et al. 2008). Aquests dos virus estudiats a més de presentar un alliberament viral avançat tenen les funcions immunomoduladores de la regió E3 afectades. Per una banda el VRX-07 presenta una deleció de totes les proteïnes excepte ADP i E3-12.5K i per tant és possible que l'increment de potència oncolítica d'aquest virus es vegi compensada per una activació de la resposta inflamatòria superior. L'AdE3/19K-445A bloqueja el transport de l'MHC-I a la superfície de la cèl·lula infectada menys eficientment que l'adenovirus salvatge i per tant és probable que activi una resposta per part dels limfòcits T superior a l'adenovirus salvatge per tant, igual que en el cas anterior, és possible que l'efecte d'augment de potència antitumoral sigui contrarestat per l'augment de la resposta immune antiviral. La truncació de la proteïna i-leader sembla no afectar a cap de les funcions immunoevasores de l'adenovirus i per això sembla un virus molt adequat per estudiar l'efecte de l'alliberament viral avançat en un model immunocompetent de hámster siri.

Per estudiar el paper del sistema immune en l'activitat antitumoral de l'ICOVIR-15i primer vam comprovar que la mutació iLG397T augmenta del tamany de calba i la citotoxicitat de l'ICOVIR-15 en HP-1, una línia de carcinoma de pàncrees de hámster siri, tot i que a un nivell molt inferior comparat amb les línies cel·lulars humanes completament permissives a la replicació adenoviral (**Article 2, Figura 3**). Tot i que l'augment del tamany de calba i la citotoxicitat es deuen a l'alliberament viral incrementat, no vam poder veure aquest efecte en experiments amb infecció a alta multiplicitat d'infecció (m.o.i) i una sola ronda de replicació (**Article 2, Figura 3**), degut a la baixa permissivitat d'aquesta línia cel·lular (100 vegades inferior a A549). Tot i això a les nostres mans, aquest model és més permissiu que altres línies cel·lulars de hámster com HaPT-1, H2T i Amel3. *In vivo* vam comprovar que ni l'ICOVIR-15 ni l'ICOVIR-15i presenten activitat antitumoral en tumors pancreàtics subcutanis de la línia HP-1 després de l'administració intratumoral única de  $2.5 \cdot 10^{10}$ vp/tumor (**Article 2, Figura 4**). Aquesta manca d'eficàcia creiem que és deguda a la baixa permissivitat de replicació en les cèl·lules de hámster siri que a més presenten un creixement molt ràpid o a la ràpida eliminació del virus per part del sistema immune. Cal destacar que en experiments previs del grup en el mateix model tumoral i amb la mateixa dosis viral, l'Ad5 presentava certa eficàcia antitumoral estadísticament significativa (Gros, Martinez-Quintanilla et al. 2008), per tant és possible que al modificar el virus per fer-lo selectiu de tumor perdem certa potència antitumoral en aquest model immunocompetent. De fet, resultats similars publicats per Öberg i col·laboradors mostren una absència d'activitat antitumoral d'un adenovirus oncolític amb una deleció de la regió conservada 2 (CR2) similar a la deleció  $\Delta 24$  i de la proteïna E1B/19K en els models murins immunocompetents de tumors subcutanis TRAMC i CMT-64 després de 3 administracions intratumorals de  $1 \cdot 10^{10}$ vp/tumor a dia 1, 3 i 5. Mentre que resultats del mateix grup mostren activitat antitumoral de l'adenovirus salvatge després de l'administració intratumoral  $1 \cdot 10^{10}$ vp/tumor a dia 1, 3, 5 i 7 en el model de CMT-64 (Hallden, Hill et al. 2003).

La combinació d'adenovirus oncolítics amb agents quimioteràpics i radioteràpia ha demostrat un augment de l'eficàcia de la teràpia tant a nivell clínic (Pesonen, Kangasniemi et al. 2011) com en models preclínic. La gemcitabina és un tractament estàndard per càncer de pàncrees, tot i que els seus efectes en la supervivència són limitats (Oettle, Post et al. 2007). La gemcitabina ha demostrat efectes sinèrgics en la combinació amb adenovirus oncolítics tant a nivell clínic (Hecht, Bedford et al. 2003) com a nivell preclínic (Leitner, Sweeney et al. 2009; Nelson, Davydova et al. 2009; Onimaru, Ohuchida et al. 2010; Bhattacharyya, Francis et al. 2011; Cherubini, Kallin et al. 2011). En una aproximació més

---

translacional, ens vam plantejar estudiar l'efecte de la combinació d'aquest fàrmac amb l'ICOVIR-15i, ja que és d'esperar que la majoria de pacients amb càncer de pàncrees susceptibles d'entrar en un assaig clínic estigui rebent o hagi rebut tractament amb gemcitabina. Estudiar l'efecte de la combinació dels agents quimioteràpics amb els adenovirus oncolítics és important perquè pot tenir efectes contraris. Per una banda la gemcitabina és un anàleg de nucleòsids que s'incorpora a les cadenes d'ADN durant la seva replicació i indueix apoptosi, això pot afectar també a la replicació de l'ADN viral i per tant a la producció del virus i a l'efecte antitumoral. Per altre banda la gemcitabina provoca una leucopènia i neutropènia que podria afavorir a la replicació del virus. Així, vam demostrar que la combinació amb gemcitabina augmentava l'activitat antitumoral i la supervivència induïda per l'ICOVIR-15i, però no per l'ICOVIR-15, en tumors pancreàtics subcutanis en hámster siri (**Article 2, Figura 4**). Varies hipòtesis podrien justificar aquesta activitat antitumoral:

- i) La gemcitabina podria augmentar la citotoxicitat de la teràpia, i això sumat a la citotoxicitat incrementada de l'ICOVIR-15i podria ser la causa d'aquesta activitat antitumoral. Vam comprovar però que *in vitro* l'ICOVIR-15i perd la citotoxicitat incrementada respecte l'ICOVIR-15 en combinació amb dosis creixents de gemcitabina (**Article 2, Figura 5**), probablement per una inhibició de la replicació viral. A més no vam poder detectar replicació viral en els tumors ni amb ICOVIR15 ni amb ICOVIR15i al final del tractament.
- ii) La gemcitabina provoca una immunosupressió sistèmica que podria afavorir la replicació viral. La gemcitabina en humans disminueix el recompte total de leucòcits i neutròfils a l'inici del tractament, però s'estabilitza amb les successives rondes de tractament fins a arribar al nivell normal després de la 4 ronda (Plate, Plate et al. 2005). Tot i això vam demostrar que no hi havia diferències en la inducció d'anticossos neutralitzants contra l'adenovirus a dia 14 després de l'inici del tractament (**Article 2, Figura S1**). A més, en aquest cas esperaríem veure també un efecte parcial de la replicació de l'ICOVIR-15 en combinació amb gemcitabina i replicació viral en els tumors (**Article 2, Figura 4**).
- iii) Tot i la immunosupressió sistèmica associada als tractaments amb quimioteràpia, estudis més recents reporten que alguns agents quimioteràpics augmenten la resposta immune antitumoral a través de la seva capacitat d'eliminar les cèl·lules immunosupressores i d'induir la



mort cel·lular immunogènica o *immunogenic cell death* (Menard, Martin et al. 2008; Shiao, Ganesan et al. 2011). La gemcitabina augmenta la presentació antigènica incrementant l'expressió de HLA-I a la superfície de les cèl·lules tumorals, la maduració i funció de les cèl·lules dendrítiques i en conseqüència la proliferació i capacitat citotòxica dels limfòcits T (Nowak, Lake et al. 2003; Correale, Cusi et al. 2005; Liu, Fowler et al. 2010). També inhibeix les cèl·lules T reguladores (Rettig, Seidenberg et al. 2011; Shevchenko, Karakhanova et al. 2012) i les cèl·lules mieloides immadures o cèl·lules supressores derivades del llinatge mieloide (iMC o MDSC) (Sinha, Clements et al. 2007; Mundy-Bosse, Lesinski et al. 2011). A més s'utilitza com a adjuvant en tractaments d'immunoteràpia sobretot en vacunes antitumorals (Fridlender, Sun et al. 2010; Ishizaki, Manuel et al. 2011). Per intentar comprovar aquesta hipòtesis vam realitzar un assaig de proliferació de cèl·lules mononuclears de sang perifèrica o PBMC (de l'anglès, *peripheral blood mononuclear cells*) estimulades amb PBMCs infectades i cèl·lules tumorals HP-1 infectades i no infectades. Vam demostrar que l'estimulació amb PBMCs infectades, que actuarien de cèl·lules presentadores d'antígens virals, era molt baixa. En canvi l'estimulació utilitzant com a cèl·lules presentadores les cèl·lules del propi tumor era molt superior. A més vam comprovar que no hi havia diferències entre la proliferació induïda per les cèl·lules tumorals infectades i no infectades, la qual cosa suggeria que els limfòcits que proliferaven eren específics d'antígens de la cèl·lula tumoral. Els PBMCs són bàsicament limfòcits, cèl·lules NK i monòcits. A part dels limfòcits que proliferen al reconèixer l'antigen, les cèl·lules NK i els monòcits també podrien proliferar degut a l'estimulació per citocines secretades per les cèl·lules tumorals o els PBMCs, però aquesta seria igual en tots els grups de tractament. També vam veure que en tots els grups tractats amb gemcitabina la proliferació de limfòcits específics per la cèl·lula tumoral era superior que en els grups no tractats, la qual cosa dóna suport al paper immunoestimulador de la gemcitabina. Finalment vam comprovar que el grup tractat amb ICOVIR-15i en combinació amb gemcitabina presentava una proliferació limfocitària superior a la resta de grups i significativa respecte el grup tractat amb ICOVIR-15i sol (**Article 2, Figura 4**). Això sembla suggerir que l'activitat antitumoral observada per la combinació amb ICOVIR-15i i gemcitabina és deguda a un augment de la resposta immune antitumoral. Per intentar confirmar aquesta hipòtesis vam realitzar el mateix

experiment *in vivo* en ratolins immunodeficients amb tumors pancreàtics subcutanis de hámster siri HP-1; i vam comprovar que en els ratolins immunodeficients perdiem aquest efecte antitumoral donant suport a la hipòtesis de la resposta immune antitumoral com a responsable de l'activitat antitumoral de la combinació de l'ICOVIR-15i amb gemcitabina **(Article 2, Figura 5)**.

iv) L'estroma no només bloqueja la disseminació del virus per la massa tumoral, sinó que també limita l'arribada i la dispersió dels agents quimioteràpics al tumor. Per tant la destrucció de l'estroma amb l'ICOVIR-15i no només podria estar millorant la disseminació del virus per la massa tumoral sinó que també podria augmentar la penetració de la gemcitabina al tumor, i aquest efecte ser el responsable de la millora de l'eficàcia antitumoral de la combinació de l'ICOVIR-15i amb la gemcitabina (Neesse, Michl et al. 2010). A més l'efecte de la mort cel·lular induïda per la gemcitabina pot disminuir la pressió intersticial a l'interior del tumor facilitant la dispersió de l'ICOVIR-15i per la massa tumoral (Russell, Peng et al. 2012). Per demostrar aquesta hipòtesis caldria per una banda quantificar la gemcitabina que arriba al tumor i per altre analitzar la replicació del virus en els CAFs. Es van analitzar els tumors al final del tractament però no es va poder identificar replicació viral en cap dels tumors analitzats ni en cap dels grups de tractament, per tant no es va poder demostrar un augment de la disseminació o persistència del virus en els grups tractats amb ICOVIR-15i (a diferència dels experiments en ratolins immunodeficients amb tumors humans on sí que s'observava replicació viral en els tumors tractats amb ICOVIR15i al final del tractament **(Article 2, Figura 2)**) ni la replicació en CAFs. Un marcador subrogat de la replicació en CAF seria l'anàlisi histològic i la quantificació de CAF dins del tumor, però aquest valor no és representatiu de la replicació del virus en aquestes cèl·lules ja que el dany tissular generat per la replicació viral o la quimioteràpia recluta nous fibroblasts. Finalment, l'absència d'eficàcia antitumoral en el model murí immunodeficient també justifica aquesta hipòtesis **(Article 2, Figura 5)**, ja que en aquest model els fibroblasts són murins i per tant no permissius a la replicació viral.

Aquestes dues últimes hipòtesis no són excloents. Tot i que no ho hem pogut demostrar, és possible que la sinèrgia observada en l'eficàcia antitumoral en el model immunocompetent sigui deguda a que al administrar l'ICOVIR-15i

intratumoralment aquest replica en les cèl·lules tumorals i en els CAF i això facilita la penetració de la gemcitabina que s'administra en quatre dosis (una cada tres dies) començant el mateix dia de l'administració viral. Al augmentar la dosi de gemcitabina al tumor això pot augmentar la resposta immunoterapèutica d'aquesta droga i explicar l'augment de limfòcits específics de la cèl·lula tumoral.

Degut al tractament amb agents citotòxics es pot induir una mort cel·lular immunogènica que comporta l'alliberament de molècules pro-inflamatòries que activen les cèl·lules dendrítiques i macròfags residents. Aquests secretaran IL-1 $\beta$  i TNF- $\alpha$  que reclutaran els leucòcits perifèrics en circulació. Les cèl·lules dendrítiques i els macròfags migren cap als teixits limfoides on presentaran els antígens tumorals als limfòcits T CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> activant-los. Aquests limfòcits migraran fins al tumor i eliminaran les cèl·lules tumorals. Alguns dels leucòcits reclutats al tumor tindran funcions immunosupressores, a més aquests esdevenen dominants a mesura que els limfòcits T i les cèl·lules NK van eliminant el tumor. La funció d'aquestes cèl·lules és restablir l'homeòstasi tissular induint la reconstrucció del teixit danyat i l'angiogènesi. La incompleta eliminació de les cèl·lules tumorals en aquest entorn comporta un recreixement del tumor o l'aparició de metàstasis (revisat en (Shiao, Ganesan et al. 2011)). La mort cel·lular immunogènica o *immunogenic cell death* (ICD) és imprescindible per aquesta resposta immune antitumoral. Per tal d'activar-la les cèl·lules tumorals que estan morint han de presentar una sèrie de característiques. Per una banda han d'exposar senyals que activen la fagocitosis dels antígens tumorals coneguts com a senyals "eat me". En la ICD és imprescindible l'exposició de la calreticulina (CRT) a la superfície cel·lular. Per altre banda les cèl·lules tumorals han d'exposar senyals de perill PAMPS (de l'anglès, *pathogen-associated molecular pattern*) i DAMPS (de l'anglès, *danger-associated molecular pattern*) que activen el processament i la cross-presentació d'antígens per part de les DC. En el cas de la ICD l'alliberament de HMGB1 (de l'anglès *high-mobility group box 1*) és reconegut pel TLR4 i a través d'una cascada de senyalització depenent de MyD88 inhibeix la fusió dels fagosomes i lisosomes afavorint la presentació antigènica. Finalment durant la ICD, s'allibera ATP que activa l'inflamasoma i dona lloc a la secreció de IL-1 $\beta$  i IFN- $\gamma$ . Per tal que es doni l'activació de la resposta immune antitumoral, la regulació espai-temps d'aquests fenòmens ha de seguir un patró finament regulat (revisat en (Kepp, Galluzzi et al.; Shiao, Ganesan et al. 2011)).

Tot i que la majoria d'agents quimioteràpics activen una resposta immune antitumoral, no aconsegueixen un control complet de la malaltia, per això adjuvants i estratègies complementàries per augmentar la mort cel·lular

immunogènica sineritzen amb la quimioteràpia per augmentar l'eficàcia antitumoral (Locher, Conforti et al. 2010). Un requisit per l'èxit de la resposta immune antitumoral induïda per la ICD és l'activació de la resposta immune Th1 i la disminució de la resposta dominant Th2 que indueix la regeneració tissular, l'angiogènesi, la resposta humoral i l'estat pro-tumoral. L'activació de la resposta immune Th1 a través de citoquines tipus I com el TNF- $\alpha$ , l'IFN- $\gamma$  i la IL-2 activaran una resposta immune cel·lular antitumoral (Shiao, Ganesan et al. 2011). Davant d'aquesta situació, la combinació d'un agent quimioteràpic que indueix ICD amb un adenovirus que activarà la resposta Th1 sembla una bona estratègia per augmentar la resposta immune antitumoral. Els adenovirus oncolítics permetran el reconeixement dels PAMPs associats a la presència de virus, a més la infecció i mort de les cèl·lules causada pels adenovirus oncolítics provoca l'alliberament de múltiples senyals immunogènics: i) la secreció de citoquines pro-inflamatòries com IFN- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-18 entre altres (Di Paolo, Miao et al. 2009; Nemerow 2009), ii) l'activació de NLRP3 (de l'anglès *NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3*) i l'inflamasoma en macròfags, que acaba donant lloc a la secreció de IL-1 $\beta$  i a la mort per necrosi dels macròfags acompanyada de la secreció de HMGB1 (Barlan, Griffin et al. 2010) i iii) la secreció de HSP70 i HMGB1 en les cèl·lules infectades (Schierer, Hesse et al. 2012). A més de les senyals pro-inflamatòries, la replicació de l'adenovirus genera una font d'antígens tumorals que poden ser fagocitats per les cèl·lules dendrítiques i cross-presentats generant una resposta probablement associada a múltiples epítops (Schierer, Hesse et al. 2012). S'ha demostrat que la infecció viral no només dona lloc a una alta resposta immune contra antígens virals, sinó també una eficient cross-presentació d'antígens cel·lulars dependent de MyD88 i TLRs (Chen, Barnfield et al. 2005; Schulz, Diebold et al. 2005). Això justifica la inducció de resposta immune antitumoral per virus específics de tumor.

En aquesta línia, Boozari i col·laboradors han descrit la combinació d'un adenovirus oncolític (hTERT-Ad un adenovirus transcripcionalment regulat a través del promotor de la transcriptasa reversa de la telomerasa humana) amb bortezomib un inhibidor del proteasoma. Tant la replicació de l'adenovirus com el bortezomib indueixen estrès del ER, i la combinació dels dos indueix la mort de les cèl·lules infectades per apoptosi. Aquest tractament genera una alta resposta immune antitumoral, que dona lloc a una alta eficàcia del tractament en el tumor primari i en les metàstasis pulmonars no tractades amb virus en un model immunocompetent murí de carcinoma hepàtic. Demostren que aquest efecte és degut a la resposta immune antitumoral generada i que desapareix en repetir el

mateix experiment en ratolins atímics o bloquejant els limfòcits T CD8<sup>+</sup> amb anticossos (Boozari, Mundt et al. 2010).

Els diferents mecanismes de mort cel·lular poden conduir a una mort immunogènica o no immunogènica. Els mecanisme de mort cel·lular que indueix l'adenovirus no està molt clar. La cèl·lula infectada no mor per apoptosi, però tampoc presenta totes les característiques pròpies de la necrosis, per això Abou El Hassan van classificar la mort de la cèl·lula infectada com a mort cel·lular programada tipus necrosi (en anglès *necrosis-like programmed cell death*) en experiments realitzats amb l'AdΔ24 (Abou El Hassan, van der Meulen-Muileman et al. 2004). Altres autors han postulat que l'adenovirus indueix autofàgia com a mecanisme de mort (Ito, Aoki et al. 2006; Rodriguez-Rocha, Gomez-Gutierrez et al. 2011) tot i que també hi ha autors que postulen que l'autofàgia és un mecanisme de supervivència de la cèl·lula infectada (Baird, Aerts et al. 2008). Independentment del mecanisme exacte, el que queda clar és que l'adenovirus indueix una mort cel·lular no clàssica que està altament controlat pel virus (Baird, Aerts et al. 2008).

La diferència entre la combinació de la gemcitabina i l'ICOVIR15 comparat amb l'ICOVIR-15i és intrigant. Per una banda és possible que la potència oncolítica augmentada de l'ICOVIR-15i en combinació amb la gemcitabina permeti una major replicació del virus per la massa tumoral gràcies a la superació de les barreres fibròtiques i a la major dispersió del virus generant una major oncòlisi, exposició d'antígens cel·lulars i resposta immune antitumoral. En aquest cas observariem el mateix efecte de la combinació de la gemcitabina amb tots els virus que presenten una potència incrementada com l'Ad-E3/19K-445A o amb la combinació de l'adenovirus amb verapamil. Però també és interessant especular sobre els possibles mecanismes de mort activats diferencialment per la combinació de gemcitabina amb ICOVIR-15 o ICOVIR-15i. Boozari i col·laboradors suggerien que el mecanisme de mort cel·lular influenciava en la resposta immune generada, en concret suggerien que l'apoptosi induïda per l'estrès del ER i la resposta UPR (de l'anglès, *Unfolded protein response*) alterada en la teràpia combinada de l'hTERT-Ad i bortezumib era la responsable de l'activació de la resposta immune antitumoral (Boozari, Mundt et al. 2010). Nosaltres hem demostrat però que la truncació de la proteïna i-leader no activa l'apoptosi (**Article 1, Figura 4**). Clàssicament s'havia considerat que l'apoptosi, al ser un mecanisme de mort cel·lular fisiològica era una mort cel·lular silent a nivell immunològic i fins hi tot tolerogènic (Savill and Fadok 2000), mentre que la necrosis al ser un mecanisme patològic era immunogènica i generava resposta immune inflamatòria. Tot i això estudis posteriors han

---

determinat que hi ha subtipus de mort cel·lular immunogèniques o no en funció de subtils diferències a nivell de l'expressió de molècules a la superfície cel·lular i en els productes cel·lulars secretats per la cèl·lula que mor. El tipus d'activació de la mort cel·lular i l'estrès previ a aquesta mort, a més de l'agent causant i el tipus de mort cel·lular activada determinen l'activació de la mort cel·lular immunogènica (Green, Ferguson et al. 2009).

En aquesta línia, s'ha descrit que l'autofàgia induïda pel tractament amb drogues quimioteràpiques provoca l'alliberament d'ATP i la mort cel·lular immunogènica (Michaud, Martins et al.). Tot i això dades preclíniques demostren que el bloqueig de l'autofàgia augmenta l'eficàcia de la quimioteràpia; a més en un estudi clínic en fase I la combinació d'un inhibidor de l'autofàgia amb temsirolimus estabilitza el creixement tumoral en un 73% dels pacients mentre que el temsirolimus sol en un 0% dels pacients (Amaravadi 2011). En aquest context seria interessant estudiar l'efecte de la combinació d'un adenovirus oncolític amb verapamil que a més de induir l'alliberament viral indueix l'autofàgia i veure com això contribueix a la mort cel·lular immunogènica i a l'activitat antitumoral en un model immunocompetent.

Per tal de demostrar que la ICD i l'activació de la resposta immune antitumoral és la responsable de l'efecte antitumoral de la combinació de l'ICOVIR-15i amb la gemcitabina, a part d'estudiar la proliferació dels PBMCs en presència de les cèl·lules tumorals, es podria dur a terme altres comprovacions. Per una banda estudiar els marcadors de ICD (exposició de CRT i alliberament d'HMGB-1 i ATP) en les cèl·lules i els tumors tractats amb ICOVIR15 i ICOVIR15i sols o en combinació amb gemcitabina. També la reimplantació de cèl·lules tumorals en els animals després d'induir la resposta immune antitumoral. Si aquestes cèl·lules no formen tumors confirmariem la nostre hipòtesis. Altres possibles experiments són: el transplantament de PMBCs dels animals tractats a animals naïve amb tumors i analitzar el seu efecte antitumoral, analitzar la secreció de IFN- $\gamma$  després de l'estimulació dels PBMCs o dels limfòcits dels nòduls limfàtics pròxims al tumor després de l'estimulació amb cèl·lules tumorals i finalment podríem haver fet experiments de *footpad swelling* re-administrant antígens tumorals a un dels coixinets plantars dels hámsters i comparant la inflamació que es genera com a conseqüència de la resposta DTH (hipersensibilitat retardada, de l'anglès *delayed-type hypersensitivity*) entre els diferents grups de tractament.

Independentment del mecanisme que dóna lloc a aquest augment de l'activitat antitumoral els nostres resultats demostren l'interès de la combinació de

l'ICOVIR15i amb gemcitabina que és un dels tractaments estàndards pel càncer de pàncrees. De totes maneres seria necessari caracteritzar l'efecte d'aquesta combinació en altres models tumorals en animals immunocompetents tant en hámster siri com en ratolí. A més seria interessant confirmar si aquest efecte és degut específicament a la truncació de la proteïna i-leader o és un efecte comú a tots els virus que presentin un alliberament avançat. Per últim també seria interessant provar la combinació amb altres agent quimioteràpics amb més efecte sobre l'activació de la ICD i la resposta immune antitumoral.

Els models immunocompetents disponibles per l'estudi dels adenovirus oncolítics són poc permissius a la replicació viral i sovint les respostes antitumorals són millors en els models menys permissius (Cheong, Wang et al. 2008; Oberg, Yanover et al. 2010). Això sembla indicar que aquests models presenten una immunogenicitat inherent i per tant cal anar en compte al extrapolar els resultats a l'humà on la replicació viral serà completa i el tipus de mort cel·lular induïda pot ser diferent (Boozari, Mundt et al. 2010).

### **MILLORA DE LA PENETRACIÓ A LA MASSA TUMORAL: EL PÈPTID iRGD.**

Els virus que arriben al tumor s'amplificaran i es disseminaran per la massa tumoral. L'eficàcia de la teràpia depèn de la velocitat de replicació de les cèl·lules tumorals i el virus. La replicació viral dins del tumor està limitada per factors com l'estroma tumoral i la resposta immune antiviral, per això per eliminar la totalitat de la massa tumoral és necessari que arribi i penetri al parènquima tumoral suficient virus per iniciar varis focus de replicació i que aquests estiguin repartits per la totalitat de la massa tumoral. En aquest sentit la distribució inicial del virus juga un paper molt important. Amb l'objectiu d'augmentar la penetració tumoral, en aquest treball hem introduït el pèptid iRGD a la càpsida adenoviral que tindrà afinitat per les integrines i NRP-1 sobreexpressades en la vasculatura i la massa tumoral.

El pèptid iRGD s'ha d'inserir a l'extrem C-terminal ja que per ser funcional ha de ser proteolitzat per exposar el seu domini CendR d'unió a NRP-1. Només la fibra i la proteïna pIX de la càpsida de l'adenovirus permeten la inserció de pèptids al C-terminal. S'ha demostrat que la inserció del pèptid RGD a l'extrem C-terminal de la fibra augmenta la transducció de cèl·lules endotelials i de musculatura llisa (Wickham, Tzeng et al. 1997), a la proteïna IX la inserció del pèptid RGD també ha

demostrat un augment de la transducció en cèl·lules d'endotelioma (Vellinga, Rabelink et al. 2004). Tot i això s'ha suggerit que el direccionament de l'adenovirus cap al tumor a través de la proteïna pIX està limitat per la ineficient alliberació dels lligands fusionats a la proteïna pIX dels seus receptors a l'endosoma, limitant la sortida de l'endosoma de la partícula viral (Campos and Barry 2006), per això vam escollir l'extrem C-terminal de la fibra. Aquest queda a l'interior del *knob* i dirigit cap al *shaft*. Per tal d'assegurar que el pèptid quedés ben exposat vam utilitzar l'espaiador o *linker* (GGGS)<sub>3</sub>, tot i que anteriorment s'havia descrit l'ús del *linker* (GS)<sub>5</sub>. El (GGGS)<sub>3</sub> s'ha utilitzat per construir scFv (de l'anglès, *single chain variable fragments* o fragments variables de cadena senzilla) per separar 35 Å el C-terminal d'un domini variable de l'N-terminal de l'altre sense alterar la conformació del lloc d'unió de l'antigen (Glockshuber, Malia et al. 1990). Els resultats que es presenten en aquest treball demostren que aquest constructe permet la correcta trimerització de la fibra, això és interessant ja que s'ha descrit que aquesta és més dependent de l'estructura dels pèptids inserits que del tamany d'aquests (Wickham, Tzeng et al. 1997).

Els nostres resultats mostren que la inserció del pèptid iRGD al C-terminal de la fibra augmenta la unió a la superfície cel·lular i la internalització del virus en la línia cel·lular MCF7 (**Article 4, Figura 1**), mentre que el virus amb la inserció del pèptid RPARPAR, pèptid CendR prototip d'unió a NRP-1, millora la internalització en totes les línies cel·lulars que presenten alts nivells de NRP-1 (A549, MCF7 i HUVEC) (**Article 4, Figura 1**). El pèptid iRGD per tal de dur a terme la seva funció d'internalització cel·lular i tissular ha d'interaccionar amb integrines  $\alpha_v\beta_{3/5}$ , ser proteolitzat per una proteasa desconeguda expressada teòricament per la cèl·lula tumoral, i interaccionar amb NRP-1 (Sugahara, Teesalu et al. 2009), mentre que el pèptid RPARPAR només necessita la interacció amb NRP-1 (Teesalu, Sugahara et al. 2009). Nosaltres suggerim que això explica les diferències *in vitro* en la unió i internalització a la cèl·lula d'aquests virus, totes les línies utilitzades expressen integrines, per tant assumim que la manca de fenotip del virus amb iRGD es deu a la manca de proteòlisi del pèptid. Per tal de demostrar aquesta hipòtesi vam fer experiments d'unió i internalització pretractant el virus amb tripsina a diferents concentracions i temps d'incubació, ja que els autors que descriuen el pèptid iRGD demostren que el domini CendR pot ser exposat a través del tractament *in vitro* amb tripsina (Sugahara, Teesalu et al. 2009). Tot i això en el nostre cas, els diferents tractaments amb tripsina no van tenir cap efecte ni en els virus modificats ni en el virus control. També vam intentar confirmar el mecanisme integrina i NRP-1 dependent. Amb aquesta finalitat vam intentar inhibir la unió a integrines



bloquejant-les amb un excés del pèptid soluble iRGD i utilitzant com a control negatiu, el pèptid iRGE (pèptid que no s'uneix a integrines). Els resultats d'aquest experiment mostren que el pèptid iRGD soluble disminueix la unió i entrada a la cèl·lula de tots els virus, probablement per un bloqueig de la unió a integrines necessària per la entrada a la cèl·lula de tots els virus, i a més l'ICOVIR15K-iRGD perd el seu fenotip i s'igualava a l'ICOVIR15K. En canvi amb el pèptid iRGE no hi ha cap efecte (Resultats no mostrats). Amb la finalitat de bloquejar l'entrada a través de NRP-1, vam fer el mateix experiment però bloquejant la NRP-1 amb el pèptid RPARPAR i utilitzant com a control negatiu el pèptid RPARPARA (que no s'uneix a NRP-1 perquè no està exposat el domini CendR). Els resultats d'aquest experiment però no són conclouents.

A més hem demostrat que la inserció del pèptid iRGD, tot i augmentar la unió i internalització a la cèl·lula, no millora la transducció de la línia MCF7 (**Article 4, Figura 2**); tampoc la inserció del pèptid RPARPAR millora la citotoxicitat en A549 (**Article 4, Figura 2**). Aquests resultats suggereixen que l'entrada a través de NRP-1 no és productiva. Per tal que l'adenovirus pugui dur a terme el seu cicle viral infectiu, aquest s'ha d'internalitzar a través de vesícules endocítiques de clatrina, i ha de ser capaç de desacoblar la càpsida, escapar de l'endosoma i arribar al nucli on s'expressaran les proteïnes virals. Al modificar la via d'entrada a la cèl·lula es poden generar problemes en aquest procés. És possible que la unió del pèptid CendR a la NRP-1 sigui de tanta afinitat que no es pugui dissociar bé el receptor del lligand a l'endosoma. Tot i això, la transducció i la citotoxicitat dels virus amb els pèptids iRGD o RPARPAR a la càpsida no disminueix (**Article 4, Figura 2**), això suggereix que els mecanismes nadius d'entrada a la cèl·lula a través de CAR i integrines es mantenen.

*In vivo* el pèptid iRGD augmenta 2 vegades la transducció del tumor sense afectar significativament a cap altre òrgan, augmentant 3 vegades la relació virus al tumor respecte virus al fetge (**Article 4, Figura 3**). El pèptid iRGD millora la penetració del virus per la massa tumoral (Sugahara, Teesalu et al. 2009). Per tal de comprovar si l'adenovirus amb el pèptid iRGD també ho fa, vam intentar detectar la distribució inicial del virus per la massa tumoral, però la quantitat de virus i cèl·lules transduïdes és tant baixa que no el vam poder detectar per tècniques immunohistològiques. Tot i això, 11 dies després de l'administració del virus, els tumors tractats amb ICOVIR15K-iRGD presenten més focus de replicació i aquests estan formats per més cèl·lules que en el tractament amb ICOVIR15K, on els focus estan formats per molt poques cèl·lules (**Article 4, Figura 4**). Així, l'expressió d'E1A al tumor és 4 vegades més gran (**Article 4, Figura 4**). Nosaltres assumim

---

que aquest augment de la dispersió intratumoral és degut a l'augment de la penetració tumoral inicial. A més el pèptid iRGD, augmenta l'activitat antitumoral i la supervivència en dos models de tumors humans subcutanis, A549 que presenta una alta expressió de NRP-1 i MiaPaCa-2 amb baixos nivells de NRP-1 (**Article 4, Figura 5**). L'eficàcia *in vivo* en aquests dos models independentment del nivell de NRP-1 expressada per les cèl·lules tumorals suggereix que el paper més important de la inserció del pèptid iRGD està a nivell de la interacció amb la vasculatura. A més és possible que la proteasa que exposa el domini CendR sigui expressada per les cèl·lules de l'estroma tumoral (Park, Lenter et al. 1999; Westermarck and Kahari 1999). Això explicaria les diferències que veiem entre el fenotip *in vitro* i *in vivo* d'aquests virus. La necessitat d'interaccionar amb integrines i NRP-1 i de ser processat per una proteasa tumoral confereix certa selectivitat addicional *in vivo* al pèptid iRGD, ja que s'ha demostrat que altres pèptids CendR com el RPARPAR provoquen l'acumulació de fags en altres òrgans com als pulmons i al cor (Teesalu, Sugahara et al. 2009).

Els pèptids de penetració tumoral tipus CendR com el pèptid iRGD i el RPARPAR augmenten la internalització a les cèl·lules i teixits. Nosaltres en aquest treball hem demostrat que la seva inserció a l'extrem C-terminal de la fibra també augmenta la penetració de l'adenovirus a les cèl·lules i als tumors. Per altre banda, Teesalu i col·laboradors van demostrar que el pèptid RPARPAR augmenta la permeabilitat vascular. Per comprovar si l'ICOVIR15K-iRGD també augmenta la permeabilitat vascular, podríem haver administrat Evans blue conjuntament amb el virus, i quantificar la seva arribada al tumor. L'Evans blue s'uneix a l'albumina, per això la seva presència en un teixit s'associa a la permeabilitat vascular d'aquest teixit que permet l'extravasació de macromolècules des de la sang.

Referent a la toxicitat associada a la inserció del pèptid iRGD, hem demostrat que no augmenta la pèrdua de pes dels animals després de l'administració sistèmica (Resultats no mostrats), ni la transducció d'altres teixits a part del tumor (**Article 4, Figura 3**). Tot i això seria convenient realitzar assaigs de toxicitat hepàtica i hematològica en animals immunocompetents per confirmar que l'iRGD és suficientment selectiu de tumor i que no augmenta la toxicitat.

Finalment seria interessant estudiar la difusió intratumoral i l'eficàcia antitumoral en un nombre de models més alt, incloent models ortotòpics i immunocompetents, com el model de hámster siri. També seria interessant caracteritzar millor el paper de la NRP-1 en l'activitat antitumoral.

El mecanisme pel qual els pèptids RPARPAR i iRGD augmenten la internalització a la cèl·lula i als teixits i la permeabilitat vascular és desconegut, tot i que depèn de la interacció amb la NRP-1 (Sugahara, Teesalu et al. 2009; Teesalu, Sugahara et al. 2009). VEGF i la semaforina Sema3A interaccionen amb NRP-1 per induir la permeabilitat vascular (Becker, Waltenberger et al. 2005; Acevedo, Barillas et al. 2008) a través de motius CendR, per això sembla que el mecanisme podria estar relacionat (Teesalu, Sugahara et al. 2009). Un dels mecanismes que utilitza el VEGF per augmentar la permeabilitat vascular implica la formació d'una ruta transcel·lular a través dels anomenats orgànuls vesículo-vacuolars. Aquests formen una gran estructura vacuolar alineada amb la membrana cel·lular amb canals que permeten el pas de traçadors de fins al tamany dels eritròcits (Feng, Nagy et al. 1997; Dvorak and Feng 2001). Teesalu i col·laboradors hipotetitzen que els pèptids CendR utilitzen aquest mecanisme per augmentar la permeabilitat vascular (Teesalu, Sugahara et al. 2009). L'endocitosi i el tràfic entre membranes dels receptors és un mecanisme utilitzat per la cèl·lula per regular la senyalització de molts receptors i co-receptors amb activitat tirosina quinasa, com el VEGFR i la NRP-1 (Salikhova, Wang et al. 2008; Valdembri, Caswell et al. 2009). Un cop els receptors entren a la via endocítica poden ser degradats als lisosomes o ser reciclats cap a la membrana cel·lular (Ballmer-Hofer, Andersson et al. 2011). Aquest mecanisme també podria explicar l'augment de la internalització i extravasació induïda per la unió dels pèptids CendR a la NRP-1.

L'iRGD no és l'únic pèptid de penetració tumoral descrit. Els pèptids de *targeting* tumoral F3, LyP-1 i CRGRRST també contenen un potencial domini CendR (Ruoslahti, Bhatia et al. 2010). A més els pèptids F3 i LyP-1 augmenten l'extravasació i la penetració de la càrrega unida al tumor (Porkka, Laakkonen et al. 2002; Laakkonen, Akerman et al. 2004), i el pèptid Lyp-1 conjugat a l'abraxane, al igual que el pèptid iRGD, augmenta activitat antitumoral d'aquesta droga (Karmali, Kotamraju et al. 2009). Un altre tipus de pèptids de penetració tumoral són els pèptids catiónics com el domini de transducció proteic de la proteïna Tat del virus de la immunodeficiència humana (Tat-PTD). El Tat-PTD és un pèptid ric en aminoàcids bàsics capaç de penetrar les membranes gràcies a la interacció de les seves càrregues positives amb les càrregues negatives de la superfície cel·lular. A més s'ha demostrat que el pèptid Tat-PTD també s'uneix a la NRP-1 (Jia, Lohr et al. 2001; Teesalu, Sugahara et al. 2009), tot i que el seu mecanisme d'acció no és exclusiu a través de la unió a NRP-1, ja que mantenen la seva capacitat d'internalització inclús quan tenen la càrrega unida al C-terminal (Teesalu, Sugahara et al. 2009). El pèptid Tat-PTD però no té selectivitat tumoral (Gump and Dowdy 2007). Tot i això s'ha incorporat a l'extrem C-terminal i a l'*HI-loop* de la

---

fibra (Han, Tang et al. 2007; Kurachi, Tashiro et al. 2007) i a la regió hipervariable 5 (HVR-5) de l'hexó (Yu, Jin et al. 2011). La inserció d'aquest pèptid genera un nou mecanisme d'entrada independent de CAR que millora la transducció *in vitro* de cèl·lules tumorals. A més la inserció al C-terminal de la fibra millora la transducció de tumors *in vivo* (Han, Tang et al. 2007) i a la HVR-5 millora l'eficàcia antitumoral i la supervivència (Yu, Jin et al. 2011).

S'ha descrit la inserció de varis lligands (pèptids i anticossos) dirigits a la vasculatura tumoral per redirigir els adenovirus oncolítics cap al tumor. Tot i això l'estratègia que presentem aquí és diferent perquè el que pretén no és només redirigir el virus cap al tumor sinó augmentar l'extravasació vascular i la penetració en els tumors. Tal i com es comenta a la introducció, s'ha descrit altres estratègies per augmentar l'extravasació del virus cap al tumor, com armar l'adenovirus amb la glicoproteïna fusogènica de membrana del virus de la leucèmia del gibó (GALV) sota el control d'un promotor específic de cèl·lula endotelial (Chen, Cawood et al. 2011) o el pretractament amb TNF $\alpha$  abans de l'administració del virus que augmenta la permeabilitat dels vasos, i en conseqüència l'arribada del virus tant al fetge com al tumor (Seki, Carroll et al. 2011).

Davant de les diferents estratègies descrites per augmentar l'extravasació i la penetració del virus a la massa tumoral, el pèptid iRGD presenta varis avantatges. Primerament, el pèptid iRGD no només millora l'extravasació sinó també la penetració tumoral aconseguint una millor distribució per la massa tumoral. Al ser una petita inserció al genoma permet la combinació amb altres estratègies, i al ser específic per la cèl·lula tumoral no augmenta la toxicitat en altres òrgans. A més al ser una modificació de la càpsida el seu efecte no requereix una expressió gènica prèvia com en el cas de la proteïna fusogènica expressada en cèl·lules endotelials. Finalment, tot i que els nostres resultats semblen indicar que la seva funció està bàsicament associada a la unió a la vasculatura, el pèptid iRGD augmenta la internalització a través d'integrines i NRP-1 expressades tant a la vasculatura com a la cèl·lula tumoral.

Els nostres resultats demostren l'interès de la inserció del pèptid iRGD a l'extrem C-terminal de la fibra per augmentar la transducció i disseminació intratumoral del virus. Cal tenir en compte que en aquest treball hem inserit el pèptid iRGD a l'extrem C-terminal en una fibra que ha estat prèviament modificada substituint el domini KKTK d'unió a HSPG del *shaft* de la fibra per un motiu RGDK d'unió a integrines. Aquesta modificació de la fibra millora la transducció del tumor 3 vegades i disminueix l'acumulació de virus al fetge 6.5 vegades donant lloc a una

relació virus al tumor / virus al fetge 20 vegades superior (Bayo-Puxan, Gimenez-Alejandre et al. 2009). A més aquesta modificació augmenta significativament l'activitat antitumoral de l'adenovirus ICOVIR15 (Rojas, Gimenez-Alejandre et al. 2012). En aquest treball demostrem un paper additiu de la inserció del pèptid iRGD a la modificació anterior, i comparem en tots els experiments amb virus control amb la modificació KKTK-to-RGDK, tot i que també seria interessant veure quina és la diferència comparant amb adenovirus amb la fibra nativa. A més els nostres resultats demostren que un augment de la transducció tumoral moderat (només de dues vegades respecte el virus amb la substitució KKTK-RGDK) augmenta significativament l'activitat antitumoral. Tot i que l'ICOVIR15K-iRGD disminueix 1.6 vegades el volum tumoral al final del tractament comparat amb l'ICOVIR15K en els models tumorals de carcinoma de pulmó A549 i carcinoma de pàncrees MIA PaCa-2, només hem pogut eliminar 2 dels 12 tumors tractats amb ICOVIR15K-iRGD en el model de MIA PaCa-2 (**Article 4, Figura 5**). Això és probablement degut a que la disseminació intratumoral del virus està limitada per la presència de barreres fibròtiques i de matriu extracel·lular que limitaran l'eficàcia antitumoral d'aquest virus. Per això la inserció del pèptid iRGD pot ser combinada amb altres estratègies que millorin la disseminació intratumoral. En particular creiem que és molt interessant la combinació amb la hialuronidasa PH20, descrita pel nostre grup. Aquesta degrada l'àcid hialurònic de la matriu i augmenta l'activitat antitumoral donant lloc a una disminució del tamany tumoral inicial d'entre el 20-40% en un 60% dels animals tractats per administració sistèmica en el model de melanoma SKmel28, que presenta una alta expressió d'àcid hialurònic. També mostra major activitat antitumoral en el model de carcinoma de pàncrees NP-18 (Guedan, Rojas et al. 2010).

Teesalu i col·laboradors (Teesalu, Sugahara et al. 2009) han demostrat que els pèptids RPARPAR multimèrics són més efectius augmentant la permeabilitat vascular. Al inserir el pèptid iRGD al C-terminal de la fibra tindrem 3 còpies del pèptid a cadascun dels 12 *knobs* de l'adenovirus, i per tant tindrem aquest efect multimèric.

Seria interessant comprovar si al igual que passa amb drogues com l'abraxane, la doxorubicina o la doxorubicina encapsulada en liposomes i el trastuzumab (Sugahara, Teesalu et al.), el pèptid iRGD co-administrat juntament amb el virus no modificat també augmenta la transducció tumoral i l'eficàcia antitumoral.

---

Finalment, tot i que nosaltres utilitzem el pèptid iRGD per augmentar l'activitat antitumoral dels adenovirus oncolítics, és una estratègia interessant també per aproximacions de teràpia gènica i per vacunes antitumorals.

En aquesta tesi hem establert varies estratègies que augmenten la disseminació del virus per la massa tumoral, però els mecanismes implicats són diferents. Per una banda, les estratègies d'augment de l'alliberament viral com la truncació de la proteïna i-leader i la combinació amb verapamil permeten que el virus surti abans de la cèl·lula i pugui infectar abans les cèl·lules veïnes, augmentant així la disseminació intratumoral amb les successives rondes de replicació. Per altre banda, la inserció del pèptid iRGD augmenta la disseminació intratumoral del virus com a conseqüència d'una millor penetració inicial del virus per la massa tumoral, no degut a una millor replicació. Per tant aquestes dues estratègies milloren la disseminació intratumoral a dos nivells diferents: l'arribada al tumor i la replicació. La combinació d'aquests dos mecanismes alternatius per augmentar la disseminació intratumoral seria molt interessant.

Totes les estratègies plantejades en aquest treball augmenten l'eficàcia antitumoral d'un adenovirus oncolíctic sense augmentar o augmentant molt poc el tamany del genoma viral, i per tant permeten la combinació amb altres estratègies que millorin la biodistribució del virus, la disseminació intratumoral o que modulin la resposta immune per tal d'augmentar encara més l'eficàcia antitumoral d'un possible nou candidat clínic.



## **Conclusions**





1. L'alliberament del virus de la cèl·lula infectada és el pas del cicle viral més susceptible a ser modificat en processos de bioselecció per augmentar la potència oncolítica.
2. La truncació de l'extrem C-terminal de la proteïna i-leader augmenta l'alliberament viral i la citotoxicitat de l'adenovirus en fibroblasts associats a tumor, entorn en el qual va ser bioseleccionada aquesta mutació, i en diverses línies de cèl·lules tumorals. La inserció d'aquesta mutació a l'adenovirus oncolíctic ICOVIR15 també augmenta el seu alliberament viral i la seva citotoxicitat.
3. La truncació de l'extrem C-terminal de la proteïna i-leader augmenta l'eficàcia antitumoral de l'adenovirus en models de tumors establert a partir de cèl·lules tumorals o a partir de mesclades de cèl·lules tumorals i fibroblasts sense incrementar la toxicitat. La inserció d'aquesta mutació a l'adenovirus oncolíctic ICOVIR15 també augmenta la seva eficàcia antitumoral.
4. La combinació de la mutació E3/19K-445A amb la truncació de la proteïna i-leader no incrementa l'alliberament viral respecte els virus amb les mutacions individuals i provoca una pèrdua de la producció viral total.
5. La combinació d'ICOVIR15i amb gemcitabina augmenta l'eficàcia antitumoral en el model immunocompetent de hàmmster siri, però no *in vitro* ni en un model immunodeficient.
6. La combinació d'un adenovirus amb verapamil augmenta l'alliberament del virus de la cèl·lula infectada i l'activitat antitumoral *in vivo*.
7. La inserció del pèptid iRGD a l'extrem C-terminal de la fibra augmenta la transducció dels tumors, la disseminació intratumoral i l'eficàcia antitumoral de l'adenovirus oncolíctic ICOVIR15K.
8. La inserció del pèptid iRGD a l'extrem C-terminal de la fibra no canvia la biodistribució de l'adenovirus en els teixits normals resultant en un augment de la proporció tumor/fetge.



## **Bibliografia**



**A**

- Abou El Hassan, M. A., I. van der Meulen-Muileman, et al. (2004). "Conditionally replicating adenoviruses kill tumor cells via a basic apoptotic machinery-independent mechanism that resembles necrosis-like programmed cell death." J Virol 78(22): 12243-51.
- Acevedo, L. M., S. Barillas, et al. (2008). "Semaphorin 3A suppresses VEGF-mediated angiogenesis yet acts as a vascular permeability factor." Blood 111(5): 2674-80.
- Akbulut, H., L. Zhang, et al. (2003). "Cytotoxic effect of replication-competent adenoviral vectors carrying L-plastin promoter regulated E1A and cytosine deaminase genes in cancers of the breast, ovary and colon." Cancer Gene Ther 10(5): 388-95.
- Alba, R., A. C. Bradshaw, et al. (2010). "Biodistribution and retargeting of FX-binding ablated adenovirus serotype 5 vectors." Blood 116(15): 2656-64.
- Alcayaga-Miranda, F., M. Cascallo, et al. (2010). "Osteosarcoma cells as carriers to allow antitumor activity of canine oncolytic adenovirus in the presence of neutralizing antibodies." Cancer Gene Ther 17(11): 792-802.
- Alemaný, R. (2007). "Cancer selective adenoviruses." Mol Aspects Med 28(1): 42-58.
- Alemaný, R. (2009). "Designing adenoviral vectors for tumor-specific targeting." Methods Mol Biol 542: 57-74.
- Alemaný, R. (2012). "Chapter four--Design of improved oncolytic adenoviruses." Adv Cancer Res 115: 93-114.
- Alemaný, R. (2012). "Viruses in cancer treatment." Clin Transl Oncol.
- Alemaný, R. and M. Cascallo (2009). "Oncolytic viruses from the perspective of the immune system." Future Microbiol 4(5): 527-36.
- Alemaný, R., K. Suzuki, et al. (2000). "Blood clearance rates of adenovirus type 5 in mice." J Gen Virol 81(Pt 11): 2605-9.
- Alonso, M. M., H. Jiang, et al. (2008). "Delta-24-RGD in combination with RAD001 induces enhanced anti-glioma effect via autophagic cell death." Mol Ther 16(3): 487-93.
- Amaravadi, R. K. (2011). "Cancer. Autophagy in tumor immunity." Science 334(6062): 1501-2.
- Au, T., S. Thorne, et al. (2007). "Minimal hepatic toxicity of Onyx-015: spatial restriction of coxsackie-adenoviral receptor in normal liver." Cancer Gene Ther 14(2): 139-50.

- Bachtarzi, H., M. Stevenson, et al. (2011). "Targeting adenovirus gene delivery to activated tumour-associated vasculature via endothelial selectins." J Control Release 150(2): 196-203.
- Baird, S. K., J. L. Aerts, et al. (2008). "Oncolytic adenoviral mutants induce a novel mode of programmed cell death in ovarian cancer." Oncogene 27(22): 3081-90.
- Baker, A. H. (2004). "Designing gene delivery vectors for cardiovascular gene therapy." Prog Biophys Mol Biol 84(2-3): 279-99.
- Ballmer-Hofer, K., A. E. Andersson, et al. (2011). "Neuropilin-1 promotes VEGFR-2 trafficking through Rab11 vesicles thereby specifying signal output." Blood 118(3): 816-26.
- Barlan, A. U., T. M. Griffin, et al. (2010). "Adenovirus membrane penetration activates the NLRP3 inflammasome." J Virol 85(1): 146-55.
- Barry J. Sugarman, B. M. H., Diane L. McCallister, Fei Lu and Kenneth B. Thomas (2003). "The complete nucleic acid sequence of the adenovirus type 5 reference material (ARM) genome." Bioprocessing Journal September/October.
- Bauerschmitz, G. J., J. T. Lam, et al. (2002). "Treatment of ovarian cancer with a tropism modified oncolytic adenovirus." Cancer Res 62(5): 1266-70.
- Baxter, L. T. and R. K. Jain (1989). "Transport of fluid and macromolecules in tumors. I. Role of interstitial pressure and convection." Microvasc Res 37(1): 77-104.
- Bayo-Puxan, N., M. Gimenez-Alejandre, et al. (2009). "Replacement of adenovirus type 5 fiber shaft heparan sulfate proteoglycan-binding domain with RGD for improved tumor infectivity and targeting." Hum Gene Ther 20(10): 1214-21.
- Becker, P. M., J. Waltenberger, et al. (2005). "Neuropilin-1 regulates vascular endothelial growth factor-mediated endothelial permeability." Circ Res 96(12): 1257-65.
- Bergelson, J. M., J. A. Cunningham, et al. (1997). "Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5." Science 275(5304): 1320-3.
- Bergelson, J. M., A. Krithivas, et al. (1998). "The murine CAR homolog is a receptor for coxsackie B viruses and adenoviruses." J Virol 72(1): 415-9.
- Berk, A. J. (2005). "Recent lessons in gene expression, cell cycle control, and cell biology from adenovirus." Oncogene 24(52): 7673-85.

- 
- Bhattacharyya, M., J. Francis, et al. (2011). "An oncolytic adenovirus defective in pRb-binding (dl922-947) can efficiently eliminate pancreatic cancer cells and tumors in vivo in combination with 5-FU or gemcitabine." Cancer Gene Ther 18(10): 734-43.
- Bischoff, J. R., D. H. Kirn, et al. (1996). "An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells." Science 274(5286): 373-6.
- Boozari, B., B. Mundt, et al. (2010). "Antitumoural immunity by virus-mediated immunogenic apoptosis inhibits metastatic growth of hepatocellular carcinoma." Gut 59(10): 1416-26.
- Bortolanza, S., M. Bunuales, et al. (2009). "Deletion of the E3-6.7K/gp19K region reduces the persistence of wild-type adenovirus in a permissive tumor model in Syrian hamsters." Cancer Gene Ther 16(9): 703-12.
- Bortolanza, S., M. Bunuales, et al. (2009). "Treatment of pancreatic cancer with an oncolytic adenovirus expressing interleukin-12 in Syrian hamsters." Mol Ther 17(4): 614-22.
- Botta, G., C. Passaro, et al. (2012). "Inhibition of autophagy enhances the effects of E1A-defective oncolytic adenovirus dl922-947 against glioma cells in vitro and in vivo." Hum Gene Ther 23(6): 623-34.
- Bowie, A. G. and L. Unterholzner (2008). "Viral evasion and subversion of pattern-recognition receptor signalling." Nat Rev Immunol 8(12): 911-22.
- Breitbach, C. J., J. Burke, et al. (2011). "Intravenous delivery of a multi-mechanistic cancer-targeted oncolytic poxvirus in humans." Nature 477(7362): 99-102.

**C**

- Campos, S. K. and M. A. Barry (2006). "Comparison of adenovirus fiber, protein IX, and hexon capsomeres as scaffolds for vector purification and cell targeting." Virology 349(2): 453-62.
- Cao, Z., K. Huang, et al. (1998). "Identification of a domain on the integrin alpha5 subunit implicated in cell spreading and signaling." J Biol Chem 273(48): 31670-9.
- Carlisle, R. C., Y. Di, et al. (2009). "Human erythrocytes bind and inactivate type 5 adenovirus by presenting Coxsackie virus-adenovirus receptor and complement receptor 1." Blood 113(9): 1909-18.
- Cascallo, M., G. Capella, et al. (2003). "Ras-dependent oncolysis with an adenovirus VAI mutant." Cancer Res 63(17): 5544-50.



- Cascallo, M., A. Gros, et al. (2006). "Deletion of VAI and VAI RNA genes in the design of oncolytic adenoviruses." Hum Gene Ther 17(9): 929-40.
- Cascante, A., D. Abate-Daga, et al. (2007). "GCV modulates the antitumoural efficacy of a replicative adenovirus expressing the Tat8-TK as a late gene in a pancreatic tumour model." Gene Ther 14(20): 1471-80.
- Cascante, A., M. Huch, et al. (2005). "Tat8-TK/GCV suicide gene therapy induces pancreatic tumor regression in vivo." Hum Gene Ther 16(12): 1377-88.
- Cody, J. J. and J. T. Douglas (2009). "Armed replicating adenoviruses for cancer virotherapy." Cancer Gene Ther 16(6): 473-88.
- Correale, P., M. G. Cusi, et al. (2005). "Dendritic cell-mediated cross-presentation of antigens derived from colon carcinoma cells exposed to a highly cytotoxic multidrug regimen with gemcitabine, oxaliplatin, 5-fluorouracil, and leucovorin, elicits a powerful human antigen-specific CTL response with antitumor activity in vitro." J Immunol 175(2): 820-8.
- Coughlan, L., R. Alba, et al. (2010). "Tropism-modification strategies for targeted gene delivery using adenoviral vectors." Viruses 2(10): 2290-355.
- Chailertvanitkul, V. A. and C. W. Pouton (2010). "Adenovirus: a blueprint for non-viral gene delivery." Curr Opin Biotechnol 21(5): 627-32.
- Chang, J., X. Zhao, et al. (2009). "A Phase I study of KH901, a conditionally replicating granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: armed oncolytic adenovirus for the treatment of head and neck cancers." Cancer Biol Ther 8(8): 676-82.
- Chen, H. H., R. Cawood, et al. (2011). "Active adenoviral vascular penetration by targeted formation of heterocellular endothelial-epithelial syncytia." Mol Ther 19(1): 67-75.
- Chen, M., C. Barnfield, et al. (2005). "MyD88 expression is required for efficient cross-presentation of viral antigens from infected cells." J Virol 79(5): 2964-72.
- Cheng, J., H. Sauthoff, et al. (2007). "Human matrix metalloproteinase-8 gene delivery increases the oncolytic activity of a replicating adenovirus." Mol Ther 15(11): 1982-90.
- Cheong, S. C., Y. Wang, et al. (2008). "E1A-expressing adenoviral E3B mutants act synergistically with chemotherapeutics in immunocompetent tumor models." Cancer Gene Ther 15(1): 40-50.
- Cherubini, G., C. Kallin, et al. (2011). "The oncolytic adenovirus AdDeltaDelta enhances selective cancer cell killing in combination with DNA-damaging drugs in pancreatic cancer models." Gene Ther 18(12): 1157-65.

- 
- Choi, I. K., Y. S. Lee, et al. (2010). "Effect of decorin on overcoming the extracellular matrix barrier for oncolytic virotherapy." Gene Ther 17(2): 190-201.
- Chu, R. L., D. E. Post, et al. (2004). "Use of replicating oncolytic adenoviruses in combination therapy for cancer." Clin Cancer Res 10(16): 5299-312.

**D**

- Dehecchi, M. C., P. Melotti, et al. (2001). "Heparan sulfate glycosaminoglycans are receptors sufficient to mediate the initial binding of adenovirus types 2 and 5." J Virol 75(18): 8772-80.
- DePace, N. (1912). " Sulla scomparsa di un enorme cancro vegetante del collo dell'utero senza cura chirurgica. ." Ginecologia 9: 82-89.
- Dewar, R. L., V. Natarajan, et al. (1989). "Synthesis and processing of human immunodeficiency virus type 1 envelope proteins encoded by a recombinant human adenovirus." J Virol 63(1): 129-36.
- Di Paolo, N. C., E. A. Miao, et al. (2009). "Virus binding to a plasma membrane receptor triggers interleukin-1 alpha-mediated proinflammatory macrophage response in vivo." Immunity 31(1): 110-21.
- Di Paolo, N. C., S. Tuve, et al. (2006). "Effect of adenovirus-mediated heat shock protein expression and oncolysis in combination with low-dose cyclophosphamide treatment on antitumor immune responses." Cancer Res 66(2): 960-9.
- Dias, J. D., O. Hemminki, et al. (2011). "Targeted cancer immunotherapy with oncolytic adenovirus coding for a fully human monoclonal antibody specific for CTLA-4." Gene Ther 19(10): 988-98.
- Dmitriev, I., V. Krasnykh, et al. (1998). "An adenovirus vector with genetically modified fibers demonstrates expanded tropism via utilization of a coxsackievirus and adenovirus receptor-independent cell entry mechanism." J Virol 72(12): 9706-13.
- Dock, G. (1904). "The influence of complicating diseases upon leukemia." Am J Med Sci 127: 563-592.
- Doronin, K., J. W. Flatt, et al. (2012). "Coagulation factor X activates innate immunity to human species C adenovirus." Science 338(6108): 795-8.
- Doronin, K., K. Toth, et al. (2003). "Overexpression of the ADP (E3-11.6K) protein increases cell lysis and spread of adenovirus." Virology 305(2): 378-87.

Doronin, K., K. Toth, et al. (2000). "Tumor-specific, replication-competent adenovirus vectors overexpressing the adenovirus death protein." J Virol 74(13): 6147-55.

Dvorak, A. M. and D. Feng (2001). "The vesiculo-vacuolar organelle (VVO). A new endothelial cell permeability organelle." J Histochem Cytochem 49(4): 419-32.

## **E**

Ellis, L. M. (2006). "The role of neuropilins in cancer." Mol Cancer Ther 5(5): 1099-107.

## **F**

Feng, D., J. A. Nagy, et al. (1997). "Reinterpretation of endothelial cell gaps induced by vasoactive mediators in guinea-pig, mouse and rat: many are transcellular pores." J Physiol 504 ( Pt 3): 747-61.

Fernandes, M. S., E. M. Gomes, et al. (2009). "Growth inhibition of human multiple myeloma cells by an oncolytic adenovirus carrying the CD40 ligand transgene." Clin Cancer Res 15(15): 4847-56.

Freytag, S. O., B. Movsas, et al. (2007). "Phase I trial of replication-competent adenovirus-mediated suicide gene therapy combined with IMRT for prostate cancer." Mol Ther 15(5): 1016-23.

Fridlender, Z. G., J. Sun, et al. (2010). "Chemotherapy delivered after viral immunogene therapy augments antitumor efficacy via multiple immune-mediated mechanisms." Mol Ther 18(11): 1947-59.

Fueyo, J., C. Gomez-Manzano, et al. (2000). "A mutant oncolytic adenovirus targeting the Rb pathway produces anti-glioma effect in vivo." Oncogene 19(1): 2-12.

## **G**

Galanis, E., L. C. Hartmann, et al. (2012). "Phase I trial of intraperitoneal administration of an oncolytic measles virus strain engineered to express carcinoembryonic antigen for recurrent ovarian cancer." Cancer Res 70(3): 875-82.

- 
- Galanis, E., S. H. Okuno, et al. (2005). "Phase I-II trial of ONYX-015 in combination with MAP chemotherapy in patients with advanced sarcomas." Gene Ther 12(5): 437-45.
- Ganesh, S., M. Gonzalez-Edick, et al. (2008). "Intratumoral coadministration of hyaluronidase enzyme and oncolytic adenoviruses enhances virus potency in metastatic tumor models." Clin Cancer Res 14(12): 3933-41.
- Ganesh, S., M. Gonzalez Edick, et al. (2007). "Relaxin-expressing, fiber chimeric oncolytic adenovirus prolongs survival of tumor-bearing mice." Cancer Res 67(9): 4399-407.
- Ganly, I., D. Kirn, et al. (2000). "A phase I study of Onyx-015, an E1B attenuated adenovirus, administered intratumorally to patients with recurrent head and neck cancer." Clin Cancer Res 6(3): 798-806.
- Garcia-Castro, J., R. Alemany, et al. (2010). "Treatment of metastatic neuroblastoma with systemic oncolytic virotherapy delivered by autologous mesenchymal stem cells: an exploratory study." Cancer Gene Ther 17(7): 476-83.
- Gimenez-Alejandre, M., M. Cascallo, et al. (2008). "Coagulation factors determine tumor transduction in vivo." Hum Gene Ther 19(12): 1415-9.
- Glockshuber, R., M. Malia, et al. (1990). "A comparison of strategies to stabilize immunoglobulin Fv-fragments." Biochemistry 29(6): 1362-7.
- Goodrum, F. D. and D. A. Ornelles (1998). "p53 status does not determine outcome of E1B 55-kilodalton mutant adenovirus lytic infection." J Virol 72(12): 9479-90.
- Grander, D. and S. Einhorn (1998). "Interferon and malignant disease--how does it work and why doesn't it always?" Acta Oncol 37(4): 331-8.
- Green, D. R., T. Ferguson, et al. (2009). "Immunogenic and tolerogenic cell death." Nat Rev Immunol 9(5): 353-63.
- Gros, A. and S. Guedan (2010). "Adenovirus release from the infected cell as a key factor for adenovirus oncolysis." The Open Gene Therapy Journal 3: 24-30.
- Gros, A., J. Martinez-Quintanilla, et al. (2008). "Bioreselection of a gain of function mutation that enhances adenovirus 5 release and improves its antitumoral potency." Cancer Res 68(21): 8928-37.
- Guedan, S., D. Grases, et al. (2012). "GALV expression enhances the therapeutic efficacy of an oncolytic adenovirus by inducing cell fusion and enhancing virus distribution." Gene Ther 19(11): 1048-57.
- Guedan, S., J. J. Rojas, et al. (2010). "Hyaluronidase expression by an oncolytic adenovirus enhances its intratumoral spread and suppresses tumor growth." Mol Ther 18(7): 1275-83.

- Gump, J. M. and S. F. Dowdy (2007). "TAT transduction: the molecular mechanism and therapeutic prospects." Trends Mol Med 13(10): 443-8.
- Guse, K., T. Ranki, et al. (2007). "Treatment of metastatic renal cancer with capsid-modified oncolytic adenoviruses." Mol Cancer Ther 6(10): 2728-36.

## H

- Habib, N. A., C. E. Sarraf, et al. (2001). "E1B-deleted adenovirus (dl1520) gene therapy for patients with primary and secondary liver tumors." Hum Gene Ther 12(3): 219-26.
- Haisma, H. J. and A. R. Bellu (2011). "Pharmacological interventions for improving adenovirus usage in gene therapy." Mol Pharm 8(1): 50-5.
- Halden, G., R. Hill, et al. (2003). "Novel immunocompetent murine tumor models for the assessment of replication-competent oncolytic adenovirus efficacy." Mol Ther 8(3): 412-24.
- Hallenbeck, P. L., Y. N. Chang, et al. (1999). "A novel tumor-specific replication-restricted adenoviral vector for gene therapy of hepatocellular carcinoma." Hum Gene Ther 10(10): 1721-33.
- Hambley, T. W. and W. N. Hait (2009). "Is anticancer drug development heading in the right direction?" Cancer Res 69(4): 1259-62.
- Hamid, O., M. L. Varterasian, et al. (2003). "Phase II trial of intravenous CI-1042 in patients with metastatic colorectal cancer." J Clin Oncol 21(8): 1498-504.
- Han, T., Y. Tang, et al. (2007). "Genetic incorporation of the protein transduction domain of Tat into Ad5 fiber enhances gene transfer efficacy." Viol J 4: 103.
- Hanahan, D. and L. M. Coussens (2012). "Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment." Cancer Cell 21(3): 309-22.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." Cell 144(5): 646-74.
- Harle-Bachor, C. and P. Boukamp (1996). "Telomerase activity in the regenerative basal layer of the epidermis in human skin and in immortal and carcinoma-derived skin keratinocytes." Proc Natl Acad Sci U S A 93(13): 6476-81.
- Hecht, J. R., R. Bedford, et al. (2003). "A phase I/II trial of intratumoral endoscopic ultrasound injection of ONYX-015 with intravenous gemcitabine in unresectable pancreatic carcinoma." Clin Cancer Res 9(2): 555-61.
- Hedley, S. J., J. Chen, et al. (2006). "Targeted and shielded adenovectors for cancer therapy." Cancer Immunol Immunother 55(11): 1412-9.

- 
- Hernandez-Alcoceba, R., M. Pihalja, et al. (2002). "New oncolytic adenoviruses with hypoxia- and estrogen receptor-regulated replication." Hum Gene Ther 13(14): 1737-50.
- Hidaka, C., E. Milano, et al. (1999). "CAR-dependent and CAR-independent pathways of adenovirus vector-mediated gene transfer and expression in human fibroblasts." J Clin Invest 103(4): 579-87.
- Hobbs, S. K., W. L. Monsky, et al. (1998). "Regulation of transport pathways in tumor vessels: role of tumor type and microenvironment." Proc Natl Acad Sci U S A 95(8): 4607-12.
- Hoffmann, D., B. Meyer, et al. (2007). "Improved glioblastoma treatment with Ad5/35 fiber chimeric conditionally replicating adenoviruses." J Gene Med 9(9): 764-78.
- Hoster, H., Zanes R and vonHaam E (1949). "The association of "viral" hepatitis and Hodgkin's disease." Cancer Res 9: 473-480.
- Hotte, S. J., R. M. Lorence, et al. (2007). "An optimized clinical regimen for the oncolytic virus PV701." Clin Cancer Res 13(3): 977-85.
- Huch, M., A. Gros, et al. (2009). "Urokinase-type plasminogen activator receptor transcriptionally controlled adenoviruses eradicate pancreatic tumors and liver metastasis in mouse models." Neoplasia 11(6): 518-28, 4 p following 528.
- Huebner, R. J., W. P. Rowe, et al. (1956). "Studies on the use of viruses in the treatment of carcinoma of the cervix." Cancer 9(6): 1211-8.

**I**

- Ilan, Y., G. Droguett, et al. (1997). "Insertion of the adenoviral E3 region into a recombinant viral vector prevents antiviral humoral and cellular immune responses and permits long-term gene expression." Proc Natl Acad Sci U S A 94(6): 2587-92.
- Ishizaki, H., E. R. Manuel, et al. (2011). "Modified vaccinia Ankara expressing survivin combined with gemcitabine generates specific antitumor effects in a murine pancreatic carcinoma model." Cancer Immunol Immunother 60(1): 99-109.
- Ito, H., H. Aoki, et al. (2006). "Autophagic cell death of malignant glioma cells induced by a conditionally replicating adenovirus." J Natl Cancer Inst 98(9): 625-36.

**J**

- Jakubczak, J. L., P. Ryan, et al. (2003). "An oncolytic adenovirus selective for retinoblastoma tumor suppressor protein pathway-defective tumors: dependence on E1A, the E2F-1 promoter, and viral replication for selectivity and efficacy." Cancer Res 63(7): 1490-9.
- Jia, H., M. Lohr, et al. (2001). "Cysteine-rich and basic domain HIV-1 Tat peptides inhibit angiogenesis and induce endothelial cell apoptosis." Biochem Biophys Res Commun 283(2): 469-79.

**K**

- Kalyuzhniy, O., N. C. Di Paolo, et al. (2008). "Adenovirus serotype 5 hexon is critical for virus infection of hepatocytes in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A 105(14): 5483-8.
- Kalluri, R. and M. Zeisberg (2006). "Fibroblasts in cancer." Nat Rev Cancer 6(5): 392-401.
- Karapanagiotou, E. M., V. Roulstone, et al. (2012). "Phase I/II trial of carboplatin and paclitaxel chemotherapy in combination with intravenous oncolytic reovirus in patients with advanced malignancies." Clin Cancer Res 18(7): 2080-9.
- Karmali, P. P., V. R. Kotamraju, et al. (2009). "Targeting of albumin-embedded paclitaxel nanoparticles to tumors." Nanomedicine 5(1): 73-82.
- Kawakami, Y., H. Li, et al. (2003). "Substitution of the adenovirus serotype 5 knob with a serotype 3 knob enhances multiple steps in virus replication." Cancer Res 63(6): 1262-9.
- Kelly, E. and S. J. Russell (2007). "History of oncolytic viruses: genesis to genetic engineering." Mol Ther 15(4): 651-9.
- Kepp, O., L. Galluzzi, et al. (2011). "Molecular determinants of immunogenic cell death elicited by anticancer chemotherapy." Cancer Metastasis Rev 30(1): 61-9.
- Khuri, F. R., J. Nemunaitis, et al. (2000). "a controlled trial of intratumoral ONYX-015, a selectively-replicating adenovirus, in combination with cisplatin and 5-fluorouracil in patients with recurrent head and neck cancer." Nat Med 6(8): 879-85.

- 
- Kim, J. H., Y. S. Lee, et al. (2006). "Relaxin expression from tumor-targeting adenoviruses and its intratumoral spread, apoptosis induction, and efficacy." J Natl Cancer Inst 98(20): 1482-93.
- Knipe, D. M. H. P. M. (2007). "Fields' Virology." 5th Edition(Lippincott Williams & Wilkins , Philadelphia).
- Komarova, S., Y. Kawakami, et al. (2006). "Mesenchymal progenitor cells as cellular vehicles for delivery of oncolytic adenoviruses." Mol Cancer Ther 5(3): 755-66.
- Koski, A., M. Rajecki, et al. (2009). "Systemic adenoviral gene delivery to orthotopic murine breast tumors with ablation of coagulation factors, thrombocytes and Kupffer cells." J Gene Med 11(11): 966-77.
- Kuhn, I., P. Harden, et al. (2008). "Directed evolution generates a novel oncolytic virus for the treatment of colon cancer." PLoS One 3(6): e2409.
- Kurachi, S., N. Koizumi, et al. (2007). "Characterization of capsid-modified adenovirus vectors containing heterologous peptides in the fiber knob, protein IX, or hexon." Gene Ther 14(3): 266-74.
- Kurachi, S., K. Tashiro, et al. (2007). "Fiber-modified adenovirus vectors containing the TAT peptide derived from HIV-1 in the fiber knob have efficient gene transfer activity." Gene Ther 14(15): 1160-5.
- Kwon, O. J., E. Kang, et al. (2011). "Viral genome DNA/lipoplexes elicit in situ oncolytic viral replication and potent antitumor efficacy via systemic delivery." J Control Release 155(2): 317-25.

**L**

- Laakkonen, P., M. E. Akerman, et al. (2004). "Antitumor activity of a homing peptide that targets tumor lymphatics and tumor cells." Proc Natl Acad Sci U S A 101(25): 9381-6.
- Leitner, S., K. Sweeney, et al. (2009). "Oncolytic adenoviral mutants with E1B19K gene deletions enhance gemcitabine-induced apoptosis in pancreatic carcinoma cells and anti-tumor efficacy in vivo." Clin Cancer Res 15(5): 1730-40.
- Lewis, J. B. and C. W. Anderson (1983). "Proteins encoded near the adenovirus late messenger RNA leader segments." Virology 127(1): 112-23.
- Li, J. L., H. L. Liu, et al. (2009). "A phase I trial of intratumoral administration of recombinant oncolytic adenovirus overexpressing HSP70 in advanced solid tumor patients." Gene Ther 16(3): 376-82.



- Lichtenstein, D. L., J. F. Spencer, et al. (2009). "An acute toxicology study with INGN 007, an oncolytic adenovirus vector, in mice and permissive Syrian hamsters; comparisons with wild-type Ad5 and a replication-defective adenovirus vector." Cancer Gene Ther 16(8): 644-54.
- Lichtenstein, D. L., K. Toth, et al. (2004). "Functions and mechanisms of action of the adenovirus E3 proteins." Int Rev Immunol 23(1-2): 75-111.
- Lieber, A., C. Y. He, et al. (1997). "The role of Kupffer cell activation and viral gene expression in early liver toxicity after infusion of recombinant adenovirus vectors." J Virol 71(11): 8798-807.
- Liu, Q. and D. A. Muruve (2003). "Molecular basis of the inflammatory response to adenovirus vectors." Gene Ther 10(11): 935-40.
- Liu, Q., A. K. Zaiss, et al. (2003). "The role of capsid-endothelial interactions in the innate immune response to adenovirus vectors." Hum Gene Ther 14(7): 627-43.
- Liu, T. C., E. Galanis, et al. (2007). "Clinical trial results with oncolytic virotherapy: a century of promise, a decade of progress." Nat Clin Pract Oncol 4(2): 101-17.
- Liu, T. C., G. Hallden, et al. (2004). "An E1B-19 kDa gene deletion mutant adenovirus demonstrates tumor necrosis factor-enhanced cancer selectivity and enhanced oncolytic potency." Mol Ther 9(6): 786-803.
- Liu, W. M., D. W. Fowler, et al. (2010). "Pre-treatment with chemotherapy can enhance the antigenicity and immunogenicity of tumours by promoting adaptive immune responses." Br J Cancer 102(1): 115-23.
- Liu, Y. and A. Deisseroth (2006). "Tumor vascular targeting therapy with viral vectors." Blood 107(8): 3027-33.
- Locher, C., R. Conforti, et al. (2010). "Desirable cell death during anticancer chemotherapy." Ann N Y Acad Sci 1209: 99-108.
- Lopez, M. V., D. L. Viale, et al. (2009). "Tumor associated stromal cells play a critical role on the outcome of the oncolytic efficacy of conditionally replicative adenoviruses." PLoS One 4(4): e5119.
- Lu, W., S. Zheng, et al. (2004). "Intra-tumor injection of H101, a recombinant adenovirus, in combination with chemotherapy in patients with advanced cancers: a pilot phase II clinical trial." World J Gastroenterol 10(24): 3634-8.
- Lucher, L. A., J. S. Symington, et al. (1986). "Biosynthesis and properties of the adenovirus 2 L1-encoded 52,000- and 55,000-Mr proteins." J Virol 57(3): 839-47.

**M**

- Maeda, H., J. Fang, et al. (2003). "Vascular permeability enhancement in solid tumor: various factors, mechanisms involved and its implications." Int Immunopharmacol 3(3): 319-28.
- Maeda, H., J. Wu, et al. (2000). "Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review." J Control Release 65(1-2): 271-84.
- Majem, M., M. Cascallo, et al. (2006). "Control of E1A under an E2F-1 promoter insulated with the myotonic dystrophy locus insulator reduces the toxicity of oncolytic adenovirus Ad-Delta24RGD." Cancer Gene Ther 13(7): 696-705.
- Martin, K., A. Brie, et al. (2003). "Simultaneous CAR- and alpha V integrin-binding ablation fails to reduce Ad5 liver tropism." Mol Ther 8(3): 485-94.
- Martuza, R. L., A. Malick, et al. (1991). "Experimental therapy of human glioma by means of a genetically engineered virus mutant." Science 252(5007): 854-6.
- McConnell, M. J. and M. J. Imperiale (2004). "Biology of adenovirus and its use as a vector for gene therapy." Hum Gene Ther 15(11): 1022-33.
- McSharry, B. P., H. G. Burgert, et al. (2008). "Adenovirus E3/19K promotes evasion of NK cell recognition by intracellular sequestration of the NKG2D ligands major histocompatibility complex class I chain-related proteins A and B." J Virol 82(9): 4585-94.
- Menard, C., F. Martin, et al. (2008). "Cancer chemotherapy: not only a direct cytotoxic effect, but also an adjuvant for antitumor immunity." Cancer Immunol Immunother 57(11): 1579-87.
- Micke, P. and A. Ostman (2005). "Exploring the tumour environment: cancer-associated fibroblasts as targets in cancer therapy." Expert Opin Ther Targets 9(6): 1217-33.
- Michaud, M., I. Martins, et al. (2011). "Autophagy-dependent anticancer immune responses induced by chemotherapeutic agents in mice." Science 334(6062): 1573-7.
- Moore, A. E. (1952). "Viruses with oncolytic properties and their adaptation to tumors." Ann N Y Acad Sci 54(6): 945-52.
- Mulvihill, S., R. Warren, et al. (2001). "Safety and feasibility of injection with an E1B-55 kDa gene-deleted, replication-selective adenovirus (ONYX-015) into primary carcinomas of the pancreas: a phase I trial." Gene Ther 8(4): 308-15.

Mundy-Bosse, B. L., G. B. Lesinski, et al. (2011). "Myeloid-derived suppressor cell inhibition of the IFN response in tumor-bearing mice." Cancer Res 71(15): 5101-10.

## N

Nandi, S., I. V. Ulasov, et al. (2009). "A chimeric adenovirus with an Ad 3 fiber knob modification augments glioma virotherapy." J Gene Med 11(11): 1005-11.

Neesse, A., P. Michl, et al. (2010). "Stromal biology and therapy in pancreatic cancer." Gut 60(6): 861-8.

Nelson, A. R., J. Davydova, et al. (2009). "Combination of conditionally replicative adenovirus and standard chemotherapies shows synergistic antitumor effect in pancreatic cancer." Cancer Sci 100(11): 2181-7.

Nemerow, G. R. (2009). "A new link between virus cell entry and inflammation: adenovirus interaction with integrins induces specific proinflammatory responses." Mol Ther 17(9): 1490-1.

Nemerow, G. R. and P. L. Stewart (1999). "Role of alpha(v) integrins in adenovirus cell entry and gene delivery." Microbiol Mol Biol Rev 63(3): 725-34.

Nemunaitis, J., C. Cunningham, et al. (2001). "Intravenous infusion of a replication-selective adenovirus (ONYX-015) in cancer patients: safety, feasibility and biological activity." Gene Ther 8(10): 746-59.

Nemunaitis, J., F. Khuri, et al. (2001). "Phase II trial of intratumoral administration of ONYX-015, a replication-selective adenovirus, in patients with refractory head and neck cancer." J Clin Oncol 19(2): 289-98.

Nemunaitis, J., N. Senzer, et al. (2007). "A phase I trial of intravenous infusion of ONYX-015 and enbrel in solid tumor patients." Cancer Gene Ther 14(11): 885-93.

Nemunaitis, J., A. W. Tong, et al. (2010). "A phase I study of telomerase-specific replication competent oncolytic adenovirus (telomelysin) for various solid tumors." Mol Ther 18(2): 429-34.

Neri, D. and R. Bicknell (2005). "Tumour vascular targeting." Nat Rev Cancer 5(6): 436-46.

Nieva, J. L., V. Madan, et al. (2012). "Viroporins: structure and biological functions." Nat Rev Microbiol 10(8): 563-74.

Nowak, A. K., R. A. Lake, et al. (2003). "Induction of tumor cell apoptosis in vivo increases tumor antigen cross-presentation, cross-priming rather than cross-tolerizing host tumor-specific CD8 T cells." J Immunol 170(10): 4905-13.

**O**

- O'Shea, C. C., L. Johnson, et al. (2004). "Late viral RNA export, rather than p53 inactivation, determines ONYX-015 tumor selectivity." Cancer Cell 6(6): 611-23.
- Oberg, D., E. Yanover, et al. (2010). "Improved potency and selectivity of an oncolytic E1ACR2 and E1B19K deleted adenoviral mutant in prostate and pancreatic cancers." Clin Cancer Res 16(2): 541-53.
- Oettle, H., S. Post, et al. (2007). "Adjuvant chemotherapy with gemcitabine vs observation in patients undergoing curative-intent resection of pancreatic cancer: a randomized controlled trial." JAMA 297(3): 267-77.
- Onimaru, M., K. Ohuchida, et al. (2010). "Combination with low-dose gemcitabine and hTERT-promoter-dependent conditionally replicative adenovirus enhances cytotoxicity through their crosstalk mechanisms in pancreatic cancer." Cancer Lett 294(2): 178-86.

**P**

- Paiva, L. R., C. Binny, et al. (2009). "A multiscale mathematical model for oncolytic virotherapy." Cancer Res 69(3): 1205-11.
- Parato, K. A., D. Senger, et al. (2005). "Recent progress in the battle between oncolytic viruses and tumours." Nat Rev Cancer 5(12): 965-76.
- Park, B. H., T. Hwang, et al. (2008). "Use of a targeted oncolytic poxvirus, JX-594, in patients with refractory primary or metastatic liver cancer: a phase I trial." Lancet Oncol 9(6): 533-42.
- Park, J. E., M. C. Lenter, et al. (1999). "Fibroblast activation protein, a dual specificity serine protease expressed in reactive human tumor stromal fibroblasts." J Biol Chem 274(51): 36505-12.
- Parker, A. L., S. N. Waddington, et al. (2006). "Multiple vitamin K-dependent coagulation zymogens promote adenovirus-mediated gene delivery to hepatocytes." Blood 108(8): 2554-61.
- Parrott, J. A., E. Nilsson, et al. (2001). "Stromal-epithelial interactions in the progression of ovarian cancer: influence and source of tumor stromal cells." Mol Cell Endocrinol 175(1-2): 29-39.

- Pasqualini, R., E. Koivunen, et al. (1997). "Alpha v integrins as receptors for tumor targeting by circulating ligands." Nat Biotechnol 15(6): 542-6.
- Pellet-Many, C., P. Frankel, et al. (2008). "Neuropilins: structure, function and role in disease." Biochem J 411(2): 211-26.
- Pesonen, S., L. Kangasniemi, et al. (2011). "Oncolytic adenoviruses for the treatment of human cancer: focus on translational and clinical data." Mol Pharm 8(1): 12-28.
- Pilder, S., J. Logan, et al. (1984). "Deletion of the gene encoding the adenovirus 5 early region 1b 21,000-molecular-weight polypeptide leads to degradation of viral and host cell DNA." J Virol 52(2): 664-71.
- Plate, J. M., A. E. Plate, et al. (2005). "Effect of gemcitabine on immune cells in subjects with adenocarcinoma of the pancreas." Cancer Immunol Immunother 54(9): 915-25.
- Poller, W., S. Schneider-Rasp, et al. (1996). "Stabilization of transgene expression by incorporation of E3 region genes into an adenoviral factor IX vector and by transient anti-CD4 treatment of the host." Gene Ther 3(6): 521-30.
- Porkka, K., P. Laakkonen, et al. (2002). "A fragment of the HMGN2 protein homes to the nuclei of tumor cells and tumor endothelial cells in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A 99(11): 7444-9.
- Post, D. E., E. M. Sandberg, et al. (2007). "Targeted cancer gene therapy using a hypoxia inducible factor dependent oncolytic adenovirus armed with interleukin-4." Cancer Res 67(14): 6872-81.

## R

- Ramesh, N., Y. Ge, et al. (2006). "CG0070, a conditionally replicating granulocyte macrophage colony-stimulating factor--armed oncolytic adenovirus for the treatment of bladder cancer." Clin Cancer Res 12(1): 305-13.
- Reichard, K. W., R. M. Lorence, et al. (1992). "Newcastle disease virus selectively kills human tumor cells." J Surg Res 52(5): 448-53.
- Reid, T., E. Galanis, et al. (2001). "Intra-arterial administration of a replication-selective adenovirus (dl1520) in patients with colorectal carcinoma metastatic to the liver: a phase I trial." Gene Ther 8(21): 1618-26.
- Reid, T., E. Galanis, et al. (2002). "Hepatic arterial infusion of a replication-selective oncolytic adenovirus (dl1520): phase II viral, immunologic, and clinical endpoints." Cancer Res 62(21): 6070-9.
- Reid, T., R. Warren, et al. (2002). "Intravascular adenoviral agents in cancer patients: lessons from clinical trials." Cancer Gene Ther 9(12): 979-86.

- 
- Rettig, L., S. Seidenberg, et al. (2011). "Gemcitabine depletes regulatory T-cells in human and mice and enhances triggering of vaccine-specific cytotoxic T-cells." Int J Cancer 129(4): 832-8.
- Rodriguez-Rocha, H., J. G. Gomez-Gutierrez, et al. (2011). "Adenoviruses induce autophagy to promote virus replication and oncolysis." Virology 416(1-2): 9-15.
- Rojas, J. J., M. Gimenez-Alejandre, et al. (2012). "Improved systemic antitumor therapy with oncolytic adenoviruses by replacing the fiber shaft HSG-binding domain with RGD." Gene Ther 19(4): 453-7.
- Rojas, J. J., S. Guedan, et al. (2010). "Minimal RB-responsive E1A promoter modification to attain potency, selectivity, and transgene-arming capacity in oncolytic adenoviruses." Mol Ther 18(11): 1960-71.
- Rothmann, T., A. Hengstermann, et al. (1998). "Replication of ONYX-015, a potential anticancer adenovirus, is independent of p53 status in tumor cells." J Virol 72(12): 9470-8.
- Rowe, W. P., R. J. Huebner, et al. (1953). "Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture." Proc Soc Exp Biol Med 84(3): 570-3.
- Ruoslahti, E. (1996). "RGD and other recognition sequences for integrins." Annu Rev Cell Dev Biol 12: 697-715.
- Ruoslahti, E., S. N. Bhatia, et al. (2010). "Targeting of drugs and nanoparticles to tumors." J Cell Biol 188(6): 759-68.
- Russell, S. J., K. W. Peng, et al. (2012). "Oncolytic virotherapy." Nat Biotechnol 30(7): 658-70.

**S**

- Salikhova, A., L. Wang, et al. (2008). "Vascular endothelial growth factor and semaphorin induce neuropilin-1 endocytosis via separate pathways." Circ Res 103(6): e71-9.
- Sarkar, D., Z. Z. Su, et al. (2005). "Dual cancer-specific targeting strategy cures primary and distant breast carcinomas in nude mice." Proc Natl Acad Sci U S A 102(39): 14034-9.
- Sarkar, D., Z. Z. Su, et al. (2005). "Targeted virus replication plus immunotherapy eradicates primary and distant pancreatic tumors in nude mice." Cancer Res 65(19): 9056-63.

- Sauthoff, H., S. Heitner, et al. (2000). "Deletion of the adenoviral E1b-19kD gene enhances tumor cell killing of a replicating adenoviral vector." Hum Gene Ther 11(3): 379-88.
- Sauthoff, H., J. Hu, et al. (2003). "Intratumoral spread of wild-type adenovirus is limited after local injection of human xenograft tumors: virus persists and spreads systemically at late time points." Hum Gene Ther 14(5): 425-33.
- Sauthoff, H., T. Pipiya, et al. (2002). "Late expression of p53 from a replicating adenovirus improves tumor cell killing and is more tumor cell specific than expression of the adenoviral death protein." Hum Gene Ther 13(15): 1859-71.
- Savill, J. and V. Fadok (2000). "Corpse clearance defines the meaning of cell death." Nature 407(6805): 784-8.
- Schierer, S., A. Hesse, et al. (2012). "Human dendritic cells efficiently phagocytose adenoviral oncolysate but require additional stimulation to mature." Int J Cancer 130(7): 1682-94.
- Schoggins, J. W., M. Nociari, et al. (2005). "Influence of fiber detargeting on adenovirus-mediated innate and adaptive immune activation." J Virol 79(18): 11627-37.
- Schulz, O., S. S. Diebold, et al. (2005). "Toll-like receptor 3 promotes cross-priming to virus-infected cells." Nature 433(7028): 887-92.
- Seki, T., F. Carroll, et al. (2011). "Tumour necrosis factor-alpha increases extravasation of virus particles into tumour tissue by activating the Rho A/Rho kinase pathway." J Control Release 156(3): 381-9.
- Senzer, N. N., H. L. Kaufman, et al. (2009). "Phase II clinical trial of a granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-encoding, second-generation oncolytic herpesvirus in patients with unresectable metastatic melanoma." J Clin Oncol 27(34): 5763-71.
- Shashkova, E. V., K. Doronin, et al. (2008). "Macrophage depletion combined with anticoagulant therapy increases therapeutic window of systemic treatment with oncolytic adenovirus." Cancer Res 68(14): 5896-904.
- Shashkova, E. V., S. M. May, et al. (2009). "Expanded anticancer therapeutic window of hexon-modified oncolytic adenovirus." Mol Ther 17(12): 2121-30.
- Shashkova, E. V., J. F. Spencer, et al. (2007). "Targeting interferon-alpha increases antitumor efficacy and reduces hepatotoxicity of E1A-mutated spread-enhanced oncolytic adenovirus." Mol Ther 15(3): 598-607.
- Sherr, C. J. (2001). "The INK4a/ARF network in tumour suppression." Nat Rev Mol Cell Biol 2(10): 731-7.

- 
- Shevchenko, I., S. Karakhanova, et al. (2012). "Low-dose gemcitabine depletes regulatory T cells and improves survival in the orthotopic Panc02 model of pancreatic cancer." Int J Cancer.
- Shiao, S. L., A. P. Ganesan, et al. (2011). "Immune microenvironments in solid tumors: new targets for therapy." Genes Dev 25(24): 2559-72.
- Shinozaki, K., E. Suominen, et al. (2006). "Efficient infection of tumor endothelial cells by a capsid-modified adenovirus." Gene Ther 13(1): 52-9.
- Sinha, P., V. K. Clements, et al. (2007). "Cross-talk between myeloid-derived suppressor cells and macrophages subverts tumor immunity toward a type 2 response." J Immunol 179(2): 977-83.
- Small, E. J., M. A. Carducci, et al. (2006). "A phase I trial of intravenous CG7870, a replication-selective, prostate-specific antigen-targeted oncolytic adenovirus, for the treatment of hormone-refractory, metastatic prostate cancer." Mol Ther 14(1): 107-17.
- Smith, J. G., C. M. Wiethoff, et al. (2010). "Adenovirus." Curr Top Microbiol Immunol 343: 195-224.
- Soloway, P. D. and T. Shenk (1990). "The adenovirus type 5 i-leader open reading frame functions in cis to reduce the half-life of L1 mRNAs." J Virol 64(2): 551-8.
- Sova, P., X. W. Ren, et al. (2004). "A tumor-targeted and conditionally replicating oncolytic adenovirus vector expressing TRAIL for treatment of liver metastases." Mol Ther 9(4): 496-509.
- Steel, J. C., B. J. Morrison, et al. (2007). "Immunocompetent syngeneic cotton rat tumor models for the assessment of replication-competent oncolytic adenovirus." Virology 369(1): 131-42.
- Stoff-Khalili, M. A., A. A. Rivera, et al. (2008). "Cancer-specific targeting of a conditionally replicative adenovirus using mRNA translational control." Breast Cancer Res Treat 108(1): 43-55.
- Stoff, A., A. A. Rivera, et al. (2006). "Strategies to enhance transductional efficiency of adenoviral-based gene transfer to primary human fibroblasts and keratinocytes as a platform in dermal wounds." Wound Repair Regen 14(5): 608-17.
- Stojdl, D. F., B. Lichty, et al. (2000). "Exploiting tumor-specific defects in the interferon pathway with a previously unknown oncolytic virus." Nat Med 6(7): 821-5.
- Strauss, R. and A. Lieber (2009). "Anatomical and physical barriers to tumor targeting with oncolytic adenoviruses in vivo." Curr Opin Mol Ther 11(5): 513-22.



- Strong, J. E., M. C. Coffey, et al. (1998). "The molecular basis of viral oncolysis: usurpation of the Ras signaling pathway by reovirus." EMBO J 17(12): 3351-62.
- Subramanian, T., S. Vijayalingam, et al. (2006). "Genetic identification of adenovirus type 5 genes that influence viral spread." J Virol 80(4): 2000-12.
- Sugahara, K. N., T. Teesalu, et al. (2009). "Tissue-penetrating delivery of compounds and nanoparticles into tumors." Cancer Cell 16(6): 510-20.
- Sugahara, K. N., T. Teesalu, et al. (2010). "Coadministration of a tumor-penetrating peptide enhances the efficacy of cancer drugs." Science 328(5981): 1031-5.
- Suzuki, K., J. Fueyo, et al. (2001). "A conditionally replicative adenovirus with enhanced infectivity shows improved oncolytic potency." Clin Cancer Res 7(1): 120-6.
- Symington, J. S., L. A. Lucher, et al. (1986). "Biosynthesis of adenovirus type 2 leader protein." J Virol 57(3): 848-56.

## T

- Teesalu, T., K. N. Sugahara, et al. (2009). "C-end rule peptides mediate neuropilin-1-dependent cell, vascular, and tissue penetration." Proc Natl Acad Sci U S A 106(38): 16157-62.
- Thomas, M. A., J. F. Spencer, et al. (2006). "Syrian hamster as a permissive immunocompetent animal model for the study of oncolytic adenovirus vectors." Cancer Res 66(3): 1270-6.
- Thomas, M. A., J. F. Spencer, et al. (2008). "Immunosuppression enhances oncolytic adenovirus replication and antitumor efficacy in the Syrian hamster model." Mol Ther 16(10): 1665-73.
- Tollefson, A. E., J. S. Ryerse, et al. (1996). "The E3-11.6-kDa adenovirus death protein (ADP) is required for efficient cell death: characterization of cells infected with adp mutants." Virology 220(1): 152-62.
- Tollefson, A. E., A. Scaria, et al. (1996). "The adenovirus death protein (E3-11.6K) is required at very late stages of infection for efficient cell lysis and release of adenovirus from infected cells." J Virol 70(4): 2296-306.
- Tollefson, A. E., A. Scaria, et al. (1992). "The 11,600-MW protein encoded by region E3 of adenovirus is expressed early but is greatly amplified at late stages of infection." J Virol 66(6): 3633-42.

- 
- Tollefson, A. E., A. Scaria, et al. (2003). "Mutations within the ADP (E3-11.6K) protein alter processing and localization of ADP and the kinetics of cell lysis of adenovirus-infected cells." J Virol 77(14): 7764-78.
- Toole, B. P. (2004). "Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue." Nat Rev Cancer 4(7): 528-39.
- Toth, K., J. F. Spencer, et al. (2005). "Cotton rat tumor model for the evaluation of oncolytic adenoviruses." Hum Gene Ther 16(1): 139-46.

**U**

- Uil, T. G., J. Vellinga, et al. (2011). "Directed adenovirus evolution using engineered mutator viral polymerases." Nucleic Acids Res 39(5): e30.

**V**

- Valdembri, D., P. T. Caswell, et al. (2009). "Neuropilin-1/GIPC1 signaling regulates alpha5beta1 integrin traffic and function in endothelial cells." PLoS Biol 7(1): e25.
- van Beusechem, V. W., P. B. van den Doel, et al. (2002). "Conditionally replicative adenovirus expressing p53 exhibits enhanced oncolytic potency." Cancer Res 62(21): 6165-71.
- Vasey, P. A., L. N. Shulman, et al. (2002). "Phase I trial of intraperitoneal injection of the E1B-55-kd-gene-deleted adenovirus ONYX-015 (dl1520) given on days 1 through 5 every 3 weeks in patients with recurrent/refractory epithelial ovarian cancer." J Clin Oncol 20(6): 1562-9.
- Vellinga, J., M. J. Rabelink, et al. (2004). "Spacers increase the accessibility of peptide ligands linked to the carboxyl terminus of adenovirus minor capsid protein IX." J Virol 78(7): 3470-9.
- Vigne, E., I. Mahfouz, et al. (1999). "RGD inclusion in the hexon monomer provides adenovirus type 5-based vectors with a fiber knob-independent pathway for infection." J Virol 73(6): 5156-61.
- Virtanen, A., P. Alestrom, et al. (1982). "An adenovirus agnogene." Nucleic Acids Res 10(8): 2539-48.

**W**

- Waddington, S. N., J. H. McVey, et al. (2008). "Adenovirus serotype 5 hexon mediates liver gene transfer." Cell 132(3): 397-409.
- Wang, H., Y. Liu, et al. (2008). "In vitro and in vivo properties of adenovirus vectors with increased affinity to CD46." J Virol 82(21): 10567-79.
- Wang, Y., G. Hallden, et al. (2003). "E3 gene manipulations affect oncolytic adenovirus activity in immunocompetent tumor models." Nat Biotechnol 21(11): 1328-35.
- Wein, L. M., J. T. Wu, et al. (2003). "Validation and analysis of a mathematical model of a replication-competent oncolytic virus for cancer treatment: implications for virus design and delivery." Cancer Res 63(6): 1317-24.
- Westermarck, J. and V. M. Kahari (1999). "Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion." FASEB J 13(8): 781-92.
- White, E. (1994). "Tumour biology. p53, guardian of Rb." Nature 371(6492): 21-2.
- Wickham, T. J., E. Tzeng, et al. (1997). "Increased in vitro and in vivo gene transfer by adenovirus vectors containing chimeric fiber proteins." J Virol 71(11): 8221-9.
- Wild, J. R., C. A. Staton, et al. (2012). "Neuropilins: expression and roles in the epithelium." Int J Exp Pathol 93(2): 81-103.
- Wildner, O., J. C. Morris, et al. (1999). "Adenoviral vectors capable of replication improve the efficacy of HSVtk/GCV suicide gene therapy of cancer." Gene Ther 6(1): 57-62.
- Wodarz, D. (2001). "Viruses as antitumor weapons: defining conditions for tumor remission." Cancer Res 61(8): 3501-7.

**Y**

- Yan, W., G. Kitzes, et al. (2003). "Developing novel oncolytic adenoviruses through bioselection." J Virol 77(4): 2640-50.
- Yang, L., L. Wang, et al. (2010). "Suppression of ovarian cancer growth via systemic administration with liposome-encapsulated adenovirus-encoding endostatin." Cancer Gene Ther 17(1): 49-57.
- Ylosmaki, E., T. Hakkarainen, et al. (2008). "Generation of a conditionally replicating adenovirus based on targeted destruction of E1A mRNA by a cell type-specific MicroRNA." J Virol 82(22): 11009-15.

- 
- Yu, D., C. Jin, et al. (2011). "Adenovirus with hexon Tat-protein transduction domain modification exhibits increased therapeutic effect in experimental neuroblastoma and neuroendocrine tumors." J Virol 85(24): 13114-23.
- Yu, D. C., Y. Chen, et al. (1999). "The addition of adenovirus type 5 region E3 enables calydon virus 787 to eliminate distant prostate tumor xenografts." Cancer Res 59(17): 4200-3.
- Yu, W. and H. Fang (2007). "Clinical trials with oncolytic adenovirus in China." Curr Cancer Drug Targets 7(2): 141-8.



**Apèndix**



Informació protegida per drets d'autor.

Alena Gros, Jordi Martínez-Quintanilla, Cristina Puig, Sònia Guedan, David G. Molleví, Ramon Alemany i Manel Cascalló. *Bioselection of a Ggain of Ffunction Mutation that Enhances Adenoviurs 5 Release and Improves Its Antitumoral Potency*. *Cancer Research* 2008 Nov 1;68(21):8928-37.

Disponible a <http://cancerres.aacrjournals.org/content/68/21/8928.long>



