



INSTITUT  
D'INVESTIGACIÓ  
BIOMÈDICA  
DE BELLVITGE

**UAB**

Universitat Autònoma de Barcelona

# **Identificació de seqüències peptídiques específiques per a cèl·lules de càncer de pròstata metastàtic. Direccionament de vectors adenovirals.**

Memòria presentada per

**Anna Marazuela Duque**

per obtenir al grau de

**Doctor en Bioquímica i Biologia Molecular**

per la **Universitat Autònoma de Barcelona (UAB)**

Tesi realitzada sota la direcció de la **Dra. Àngels Fabra i Fres** al Departament d'Oncologia Molecular de l'Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL-IRO) i adscrita al Departament de Bioquímica i Biologia Molecular (Opció A) de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB).

Tutora: **Dra. Maria Plana Coll**

Vist i plau de la directora

Vist i plau de la tutora

Dra. Àngels Fabra i Fres

Dra. Maria Plana Coll

Anna Marazuela

Barcelona, 2007



*Al Sam,*



"Per ignorància ens equivocamen i  
gràcies a les equivocacions aprenem"

Proverbi romà

"Abans-d'ahir em vaig equivocar  
Ahir em vaig tornar a equivocar  
I demà veuré clar que avui potser  
també m'equivoco."

Joan Brossa



## AGRAÏMENTS

Finalment ha arribat el moment, en aquestes línies voldria agrair el recolzament a totes les persones que han estat al meu costat durant aquests anys: aquesta tesi és de tots, perquè sense tots vosaltres no hauria estat possible. MOLTES GRÀCIES!!!

Començaré per la "jefa", ja sé que no t'agrada gaire que t'anomeni així, Àngels, però després de tots aquests anys suposo que ja t'hi has acostumat. Et voldria agrair que em donessis l'oportunitat de descobrir aquest món i en aquest lab, on m'he fet gran com a professional i com a persona. Durant aquests anys al teu costat he après a estimar aquesta feina i a augmentar la meua curiositat per tot aquest món. I ha estat gràcies a la confiança que m'has demostrat sempre. Però sobretot et voldria agrair el suport durant aquests últims mesos que han estat els més difícils. Jo no em veia capaç, però tu vas tenir la paciència i em vas donar l'empenta decisiva perquè hagi pogut arribar aquest dia. Disfruta'l tant com jo!

I ara les meves companyes i companys de lab, que han patit aquest treball al meu costat:

Tònia, què puc dir-te que no t'hagi dit abans? No et pots arribar a imaginar què difícil és per mi escriure't com n'estic de contenta d'haver-te conegut. Has estat la meua mestra, la millor que podia trobar, des del primer dia que vaig trepitjar el lab. I des d'aquell dia sempre has estat al meu costat per ajudar-me en els moments de desesperació i de desànim que s'han anat repetint durant la tesi. Però per a mi, el més important ha estat tot el que m'has ensenyat com a persona, els teus consells i recomanacions, el suport i la confiança que sempre m'has demostrat i com m'has escoltat, les vegades que hem rigut i plorat juntes (quins moments, oi?). Totes aquestes coses han fet que aquests anys hagin estat molt especials, moltes gràcies per deixar-me viure'ls al teu costat!

Ana, la meua segona mestra. Moltes gràcies per l'estimació que sempre m'has demostrat, per tot el teu suport i ànims i sobretot per les converses, que tot i que últimament hagin estat pel msn, m'han fet riure i plorar com si haguessin estat en persona. Espero haver-te pogut ajudar tant com tu m'has ajudat a mi. No te n'oblidis que a casa tens dos afillats!

Mire, ens hem fet grans juntes i això no s'esborra fàcilment. Des del primer dia que et vaig conèixer vam connectar i ens vam entendre, i això ha fet que no ens facin falta paraules. Tot i que sempre anaves molt atabalada, tenies temps per ajudar-me i sé que

això sempre serà així. Moltes gràcies per totes les converses, sopars i esmorzars després dels sopars, per viure i compartir amb mi tots els moments bons i dolents, però nena, encara ens en queden molts i de molt bons i sé que els continuarem compartint!!!

La meva Eva, què t'haig de dir? Si ja ens ho hem dit tot i més. Hem rigut, plorat, ens hem enfadat i reconciliat, com totes bones amigues. Però sempre has estat aquí, al meu costat, encara que fos un moment difícil per tu. Escoltant-me i transmetent-me tota la teva saviesa, animant-me sempre que ho he necessitat. Això no es pot agrair ni amb paraules ni amb fets. Mai oblidaré les converses a les terrasses de l'Hospital, als bars i a les nostres cases, els teus consells i el teu somriure. Moltes gràcies, sense tu tot hagués estat més difícil. Ara comencem un nou camí i sé que el viurem juntes!

Ara et toca a tu Anna, la més endreçada del lab. Quin gran honor conèixer-te! Tan sols fa un parell d'anys que vas aparèixer, però has estat al meu costat en els moments més difícils fent-los més fàcils. M'ho has donat tot i m'has suportat en els meus moments més insuportables i sé que això no ha estat ni està sent gens fàcil! Estic encantada que tant tu com el Manel hagueu entrat a la meva vida, he tingut una gran sort! Moltes gràcies per tot això i més!

Cris, moltes gràcies per la teva ajuda. M'has valorat des d'un bon principi i m'ho has demostrat. M'has donat confiança i força per tirar endavant. M'has entès sobretot aquests últims mesos i m'has donat tot el teu suport. Fes-me un favor, continua amb tota aquesta força que ens has demostrat!

Olga, mi alumna-maestra. Ha sido breve pero intenso, ¿verdad? Me hubiese gustado haber podido disfrutar más tiempo a tu lado, pero no pudo ser. Aún así, me ha dado tiempo de aprender un montón de cosas de tí. Muchas gracias por toda la confianza que has puesto en mí, por todos los ánimos y consejos y sobretodo por mostrarme tu manera de ver la vida. Recuerda que en Sabadell siempre tendrás una casa.

Ei Jaume! Vas passar poc temps al nostre costat però em vas aportar una gran cosa: alegria! Els matins es feien més lleugers quan arribava i em trobava amb el teu somriure i la teva energia. Des que vas marxar que et trobem a faltar! Moltes gràcies per totes les converses, pels ànims finals i per estar al meu costat quan més ho vaig necessitar, no ho oblidaré mai!

També voldria agrair a totes/s les veïnes/s del COM:



Moltes gràcies Berta per la teva alegria i comprensió. Per demostrar-me el teu aprecí i interès. Per fer més agradables les tornades a casa després de la feina i dels sopars, i per demostrar-me que amb esforç s'aconsegueixen moltes coses! A l'Eder, per totes les converses a primera hora del matí (que ja em deixaven esgotada!), tot i que de vegades només fossin unilaterals. M'agradaria transmetre't tots els ànims que sempre m'has transmès. A la Rebeca, voldria agrair-te el teu humor que ha fet que els esmorzars i els dinars hagin estat més divertits. I encara que ara ja no hi siguin, voldria agrair a la Laura tots els teus consells i la teva estimació; i també a l'Olga, a la Yolanda i a la Sandra que van viure els meus primers passos i sempre em van demostrar ajuda i comprensió.

A la Violeta, moltes gràcies per compartir amb mi tots aquests anys. Ara ja està noia, ho hem aconseguit!

Miquel Àngel, moltes gràcies per tots els teus consells, perquè la porta del teu despatx sempre hagi estat oberta i per fer-me veure que el temps relativitza les coses. Aquest consell no l'oblidaré mai! A l'Eli, per totes les xerrades i per dir sempre el que penses; al Jordi per compartir amb tots nosaltres les experiències dels teus viatges, a mi m'han fet viatjar; a la Regi per ser la nostra Amelie particular, el teu somriure fa que aparegui el meu; a la Cris per la teva comprensió i consells; al Jairo pels ànims sobretot en aquesta etapa final; a la Gemma, per tots els teus consells tècnics i personals, a la Mar per pensar en mi sempre que es quedava lliure una hora de Lightcycler i a la Marta, per la teva frescor i alegria, encara ens queda anar juntes a un concert dels Pets!!!

A la Roser per totes les rialles compartides, per tots els consells i ànims per continuar endavant. A la M<sup>a</sup> Àngels, per totes les converses a primera hora del matí a cultius, les hores es feien més amenes.

A l'Àlex, el meu company de beca i de desesperació, ànims i ja saps quin és el meu consell. A la Vane, perquè ets una artista i sempre tens un somriure per donar-me. A la Júlia, per tota l'ajuda que m'has donat quan ho he necessitat. I a la resta del grup: a l'Anna, al Lluís, a la Cris i a la Vero sobretot pel seu interès en aquesta última etapa.

També voldria agrair als que han arribat al final. A la Isabel; a l'Ester, la Laia i la Patricia per fer més amens els matins; a Conrad por todos tus ánimos y charlas en cultivos i al Miguel. A la Cristina per tots els teus consells i a la Mireia per tota l'ajuda que m'has donat durant aquests últims mesos.

Finalment, voldria agrair a la gent de l'ICO. Especialment a l'Agnès, per sempre tenir un moment per ajudar-me; al Ramon i a la Neus, els meus mestres de virus, sense vosaltres aquest treball no hagués estat possible. Moltes gràcies per animar-me en els moments que no sortia res, per donar-me tots els vostres consells i respondre totes les meves preguntes. Ha estat un plaer treballar al vostre costat.

A la Meri i a l'Anna, perquè vam compartir els anys d'universitat i tot i agafar camins molt diferents sempre m'heu ajudat i heu estat al meu costat. Al Joan, al Mariano, al Pedro, al Xavi i al Llorenç per totes les rialles i xerrades que han fet que aquests últims anys hagin estat més divertits.

A les Nenes de Manresa, la Laia, la Laura, la Sara i l'Àstrid, que tot i la distància sempre heu estat amb mi. Per ajudar a descobrir-me i a tirar endavant. Per compartir amb mi tots aquests caps de setmana que han ajudat a què la tesi i la vida hagi estat més fàcil.

Al Joan-Marc, per tots els teus consells i ànims. Per ajudar-me ara, quan més ho necessitava. És fantàstic tenir un altre bioquímic a la família!

Als meus sabadellencs: la Meri, el Christian, l'Anna, l'Òscar, el Ricard i l'Ariadna. La vostra companyia ha fet que tot hagi estat més fàcil, agradable i divertit. Tot i no entendre ben bé el que faig, sempre m'heu escoltat i fet costat. Moltes gràcies de tot cor!

A la Mari i al Paco voldria agrair-los tota l'ajuda que m'han donat, haver-me obert sa casa i la seua vida. Sempre heu confiat en mi i sé que n'esteu orgullosos. Moltes gràcies!!!

Papas, sin vosotros no lo habría conseguido. Muchas gracias por haberme ayudado siempre y sobretodo durante este último año. Por todos vuestros consejos, ánimos y confianza. Als meus germans, Carlos i David, sé que sempre estareu amb mi. I com no, a la Sandra, per ajudar-me a descobrir la meua faceta artística i confiar tant en mi i a la meua neboteta Laia que m'ha alegrat cadascun dels caps de setmana des de fa més de quatre anys.

I ara sí, acabo, però amb la persona més important. Moltes gràcies Sam, la tesi ha estat una gran experiència, però encara ha estat millor haver-la viscut al teu costat. Perquè sempre m'has escoltat, animat i entès, perquè m'has ajudat a tenir confiança i sobretot per voler compartir tots els moments amb mi. Hem passat moments molt difícils que ens

han fet més forts, poc a poc, hem anat superant-los i sempre junts. Només em queda dir-te una cosa: HO HEM ACONSEGUIT! Ismetot'!



<b>%</b>	Tant per cent	<b>EGF</b>	<i>Epidermal Growth Factor</i>
<b>°C</b>	Graus centígrads	<b>EGTA</b>	Àcid etilenglicol tetraacètic
<b>Å</b>	Amstrongs	<b>EtOH</b>	Etanol
<b>Aa</b>	Aminoàcid	<b>FACS</b>	<i>Flow Assessed Cell Sorter</i>
<b>AAV</b>	Virus adenoassociat	<b>FELASA</b>	<i>Federation of European Laboratory Animal Science Associations</i>
<b>Ad</b>	Adenovirus	<b>FGF</b>	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
<b>Ad5</b>	Adenovirus humà tipus 5	<b>FITC</b>	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
<b>Ad2</b>	Adenovirus humà tipus 2	<b>fm</b>	Estroma fibromuscular
<b>ADP</b>	<i>Adenovirus Death Protein</i>	<b>g</b>	Força centrífuga relativa
<b>AIPC</b>	Càncer de Pròstata Androgen Independent	<b>G</b>	Gauge
<b>AJCC</b>	<i>American Joint Comitte on Cancer</i>	<b>GDEPT</b>	<i>Gene Dependent Enzym Prodrug Therapy</i>
<b>AR</b>	Receptor d'Andrògens	<b>GFP</b>	<i>Green Fluorescent Protein</i>
<b>BSA</b>	Albúmina de Sèrum Boví	<b>GM-CSF</b>	Factor estimulant de colònies granulocítiques macrofàgiques
<b>CAR</b>	<i>Coxsackie-Adenovirus Receptor</i>	<b>h</b>	Hora
<b>CCLR</b>	<i>Cell Culture Lysis Reagent</i>	<b>HBP</b>	Hiperplàsia Benigna de Pròstata
<b>CD</b>	Citosina Desaminasa	<b>HBS</b>	<i>Hepes Buffered Saline</i>
<b>CEC</b>	<i>Cell Extract Clarified</i>	<b>HBSS</b>	<i>Hans Balanced Salt Solution</i>
<b>CK5</b>	Citoqueratina 5	<b>HSV-tk</b>	<i>Herpes Simplex Virus- timidine kinase</i>
<b>CK8</b>	Citoqueratina 8	<b>HV</b>	Herpesvirus
<b>CK14</b>	Citoqueratina 14	<b>HVR</b>	<i>Hyper Variable Region</i>
<b>CK18</b>	Citoqueratina 18	<b>IL-2</b>	Interleuquina 2
<b>cm<sup>2</sup></b>	Centímetres quadrats	<b>IL-12</b>	Interleuquina 12
<b>CMV</b>	Citomegalovirus	<b>IGF1</b>	<i>Insulin Growth Factor 1</i>
<b>Cox-2</b>	Ciclooxigenasa 2	<b>IPTG</b>	Isopropiltio-β-D-galactòsid
<b>CP</b>	Càncer prostàtic	<b>ITR</b>	<i>Inverted Terminal Repeat</i>
<b>CRAds</b>	Adenovirus Condicionalment Replicatius	<b>Kb</b>	Quilobase
<b>C-terminal</b>	Carboxi terminal	<b>KDa</b>	QuiloDalton
<b>CZ</b>	Zona central de la glàndula prostàtica	<b>LAR</b>	<i>Luciferase Assay Reagent</i>
<b>DEAE</b>	Dietaminoetil	<b>LB</b>	Luria-Bertani
<b>DMEM</b>	<i>Dulbeco's Modified Eagle's Medium</i>	<b>luc</b>	Luciferasa
<b>DMEM-BSA</b>	DMEM,1%BSA	<b>LV</b>	Lentivirus
<b>DMSO</b>	Dimetil sulfòxid	<b>M</b>	Molar
<b>DNA</b>	Àcid desoxiribonucleic	<b>MHC-I</b>	Complexe Major d'Histocompatibilitat I
<b>dNTP</b>	Desoxinucleòtid trifosfat	<b>min</b>	Minuts
<b>DO</b>	Densitat òptica	<b>ml</b>	Mil·lilitre
<b>ECGS</b>	<i>Endothelial Cell Growth Supplement</i>	<b>MLP</b>	<i>Major Late Promoter</i>
<b>EDTA</b>	Àcid etilendiaminotetraacètic		

## Abreviacions

<b>mm</b>	Mil·límetre	<b>pv/cèl</b>	Partícules virals/cèl·lula
<b>mM</b>	Mil·limolar	<b>PZ</b>	Zona perifèrica
<b>mRNA</b>	RNA missatger	<b>Rb</b>	Retinoblastoma
<b>µg</b>	Microgram	<b>RLB</b>	<i>Reporter Lysis Buffer</i>
<b>µl</b>	Microlitre	<b>rpm</b>	Revolucions per minut
<b>µm</b>	Micròmetre	<b>RV</b>	Retrovirus
<b>µM</b>	Micromolar	<b>s</b>	Esfínter prostàtic
<b>ng</b>	Nanogram	<b>sCAR</b>	Forma soluble de CAR
<b>nm</b>	Nanòmetre	<b>SDS</b>	Dodecilsulfat Sòdic
<b>nM</b>	Nanomolar	<b>seg</b>	Segons
<b>NPC</b>	<i>Nuclear Pore Complex</i>	<b>SLP-I</b>	<i>Leukoprotease Secretory Inhibitor Promoter I</i>
<b>N-terminal</b>	Aminoterminal	<b>ssDNA</b>	DNA de cadena senzilla
<b>PAP</b>	Fosfatasa Àcida Prostàtica	<b>TA</b>	Temperatura Ambient
<b>pb</b>	Parell de bases	<b>TAE</b>	Tris Acetat EDTA
<b>PBS</b>	<i>Phosphate Buffered Saline</i>	<b>TBS</b>	<i>Tris Buffered Saline</i>
<b>PBS<sup>++</sup></b>	PBS MgCl <sub>2</sub> , CaCl <sub>2</sub>	<b>TE</b>	Tris EDTA
<b>PBS-BSA</b>	PBS, 1%BSA	<b>TL</b>	<i>Track-luc</i>
<b>PCR</b>	Reacció en cadena de la polimerasa	<b>TNM</b>	<i>Tumour, Nodule, Metastasis</i>
<b>pDMAEM</b>	Poli(dimetilaminoetilmetacrilats)	<b>TP</b>	Proteïna Terminal
<b>PEG</b>	Polietilenglicol	<b>TZ</b>	Zona de Transició
<b>PEI</b>	Polietilenimina	<b>U</b>	Unitats
<b>pfu</b>	<i>plaque forming units</i>	<b>UD</b>	Segment Distal de la Uretra
<b>pHPMA</b>	poly[N-(2-hydroxypropyl)methacrilamide]	<b>UICC</b>	<i>Unione Internationale Contre le Cancer</i>
<b>PIN</b>	Neoplàsia Intraepitelial Prostàtica	<b>v/v</b>	Volum/volum
<b>PSA</b>	Antigen Específic de Pròstata	<b>VV</b>	Vacciniavirus
<b>PSMA</b>	Antigen de Membrana Específic de Pròstata	<b>XGal</b>	5-Bromo-4-cloro-3-endoil-β-D-galactopiranos
<b>pv</b>	Partícules virals		

## 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, Aspàtic	<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

Índex





<b>INTRODUCCIÓ .....</b>	<b>1</b>
<b>1.- ANATOMIA I HISTOLOGIA DE LA PRÒSTATA HUMANA.....</b>	<b>3</b>
<b>2.- EL CÀNCER DE PRÒSTATA: INCIDÈNCIA, FACTORS PRONÒSTICS, BASES MOLECULARS I PROGRESSIÓ. ....</b>	<b>5</b>
2.1.- Incidència del càncer de pròstata.....	5
2.2.- Factors pronòstics del càncer de pròstata. ....	6
Grau histològic i estadiatge clínic.....	6
Cribratge del càncer de pròstata. ....	8
2.3.- Bases moleculars i progressió tumoral del càncer de pròstata.....	9
2.4.- El càncer de pròstata metastàtic. ....	11
<b>3.- TERÀPIES CONVENCIONALS DEL CÀNCER DE PRÒSTATA.....</b>	<b>11</b>
<b>4.- LA TERÀPIA GÈNICA : APLICACIONS EN EL CÀNCER DE PRÒSTATA.....</b>	<b>13</b>
4.1.- A qui hauria d'anar dirigida, quin tipus de material genètic s'hauria de transferir i amb quin efecte?.....	14
Teràpia gènica immunològica.....	14
Teràpia gènica correctora. ....	15
Teràpia gènica suïcida o GDEPT (Gene-Dependent Enzyme Prodrug Therapy) .....	15
4.2.- Quina seria la ruta o via d'administració? .....	16
4.3.- Quin seria el vehicle de transferència? .....	17
<b>5.- SISTEMES DE TRANSFERÈNCIA NO VIRALS. ....</b>	<b>17</b>
<b>6.- ELS VECTORS VIRALS. ....</b>	<b>19</b>
6.1.- Els Retrovirus (RVs). ....	21
6.2.- Els virus Adenoassociats (AAVs).....	22
6.3.- Els Herpesvirus (HVs).....	22
6.4.- Els Vacciniavirus (VV).....	23
<b>7.- ELS ADENOVIRUS I ELS VECTORS ADENOVIRALS. ....</b>	<b>23</b>
7.1.- Estructura i biologia molecular dels Adenovirus. ....	23
7.2.- Infecció cel·lular, replicació i transcripció del genoma viral. ....	27
7.3.- Els vectors adenovirals. ....	29
<b>8.- DIRECCIONAMENT TRANSDUCCIONAL DELS VECTORS ADENOVIRALS. ....</b>	<b>32</b>
8.1.- Modificació mitjançant molècules adaptadores. ....	33
8.2.- Modificació mitjançant polímers. ....	33
<b>9.- MODIFICACIÓ GENÈTICA DE LA CÀPSIDE DE L'Ad5. INCORPORACIÓ DE LLIGANDS ESPECÍFICS. ....</b>	<b>34</b>
9.1.- Incorporació de lligands específics a la fibra de l'Ad5. ....	35
9.2.- Incorporació de lligands específics a altres proteïnes de la càpside.....	37
<b>10.- ADMINISTRACIÓ SISTÈMICA DE VECTORS ADENOVIRALS.....</b>	<b>38</b>

<b>11.- DIRECCIONAMENT DE VECTORS EN LA TERÀPIA GÈNICA DEL CÀNCER DE PRÒSTATA.....</b>	<b>39</b>
<b>JUSTIFICACIÓ DEL TREBALL I OBJECTIUS .....</b>	<b>41</b>
<b>MATERIALS I MÈTODES .....</b>	<b>45</b>
<b>1.- ETAPES EXPERIMENTALS DEL PRESENT TREBALL.....</b>	<b>47</b>
<b>2.- CRIBRATGE DE LA LLIBRERIA DE <i>PHAGE DISPLAY</i> (<i>BIOPANNING IN VITRO</i>). .....</b>	<b>49</b>
<b>3.- CARACTERITZACIÓ I MANIPULACIÓ DELS FAGS.....</b>	<b>51</b>
<b>4.- <i>BINDING ASSAY IN VITRO</i>. .....</b>	<b>52</b>
<b>5.- MUTAGÈNESI DIRIGIDA. ....</b>	<b>53</b>
<b>6.- RECOMBINACIÓ HOMÒLOGA.....</b>	<b>56</b>
<b>7.- GENERACIÓ DELS ADENOVIRUS RECOMBINANTS. ....</b>	<b>57</b>
<b>8.- AMPLIFICACIÓ DELS ADENOVIRUS RECOMBINANTS.....</b>	<b>58</b>
<b>9.- PURIFICACIÓ DE PARTÍCULES VIRALS. ....</b>	<b>59</b>
<b>10.- ASSAJOS D'INFECTIVITAT <i>IN VITRO</i>.....</b>	<b>60</b>
<b>11.- ASSAJOS D'INFECTIVITAT <i>IN VIVO</i>.....</b>	<b>61</b>
<b>12.- ANÀLISI PER PCR A TEMPS REAL. ....</b>	<b>61</b>
<b>13.- ANÀLISI PER CITOMETRIA DE FLUX (FACS).....</b>	<b>62</b>
<b>14.- INOCULACIÓ ORTOTÒPICA DE CÈL·LULES TUMORALS.....</b>	<b>63</b>
<b>15.- LÍNIES CEL·LULARS I CULTIU CEL·LULAR. ....</b>	<b>64</b>
15.1.- Criopreservació de les línies cel·lulars. ....	66
15.2.- Aïllament i cultiu d'hepatòcits murins. ....	66
<b>16.- METODOLOGIA ADDICIONAL EMPRADA.....</b>	<b>67</b>
16.1.- Obtenció i transformació de bacteries químicament competents.....	67
16.2.- Obtenció de DNA plasmídic. ....	68
16.3.- Purificació de DNA plasmídic. ....	68
16.4.- Obtenció de DNA adenoviral. ....	68
16.5.- Anàlisi per PCR. ....	69
16.6.- Digestió enzimàtica. ....	70
16.7.- Seqüenciació de DNA. ....	70
16.8.- Càlcul del nombre de partícules virals. ....	71
16.9.- Electroforesi de proteïnes. ....	71
16.10.- Mesura de l'activitat de gens reporters. ....	72
16.11.- Quantificació de proteïna. ....	72
<b>17.- ANÀLISI INFORMÀTIC DE LES SEQÜÈNCIES PEPTÍDIQUES. ....</b>	<b>73</b>

<b>18.- COMPOSICIÓ DE LES SOLUCIONS EMPRADES.....</b>	<b>73</b>
<b>RESULTATS .....</b>	<b>75</b>
<b>1.- IDENTIFICACIÓ DE SEQÜÈNCIES PEPTÍDIQUES ESPECÍFIQUES PER A CÈL·LULES METASTÀSIQUES DE CÀNCER DE PRÒSTATA. ....</b>	<b>77</b>
1.1.- Cribratge i selecció de fags que s'uneixen específicament a cèl·lules PC3MM2.....	77
1.2.- Identificació i anàlisi de les seqüències peptídiques reconegudes per les cèl·lules..	82
1.3.- Elecció de seqüències peptídiques específiques per a la unió a les cèl·lules PC3MM2. ....	88
1.4.- Estudi de les eficiències d'unió de fags portadors de les seqüències peptídiques escollides.....	96
1.4.1.- Eficiències d'unió a les línies i variants cel·lulars de càncer de pròstata. ....	97
1.4.2.- Eficiències d'unió a línies cel·lulars no tumorals.....	99
1.4.3.- Eficiències d'unió a altres línies cel·lulars tumorals humanes d'origen no prostàtic.....	101
<b>2.- DIRECCIONAMENT DE VECTORS ADENOVIRALS. INSERCIÓ DE LES SEQÜÈNCIES PEPTÍDIQUES ESCOLLIDES A L'HI LOOP DE LA FIBRA DE L'ADENOVIRUS 5.....</b>	<b>103</b>
2.1.- Disseny i construcció dels adenovirus recombinants.....	103
2.2.- Estudi de la infecció <i>in vitro</i> dels adenovirus recombinants AdTLCTPQ, AdTLCYPS i AdTLCPLH.....	107
2.3.- L'AdTLCTPQ i l'AdTLCPLH tenen la capacitat d'infectar les cèl·lules PC3MM2 utilitzant un receptor diferent a CAR. ....	113
2.4.- Estudi de la infecció <i>in vivo</i> dels vectors AdTLCTPQ, AdTLCYPS i AdTLCPLH en un model ortotòpic de càncer de pròstata. ....	114
<b>DISCUSSIÓ .....</b>	<b>119</b>
<b>CONCLUSIONS .....</b>	<b>137</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>141</b>
<b>ÍNDEX DE TAULES I FIGURES .....</b>	<b>157</b>

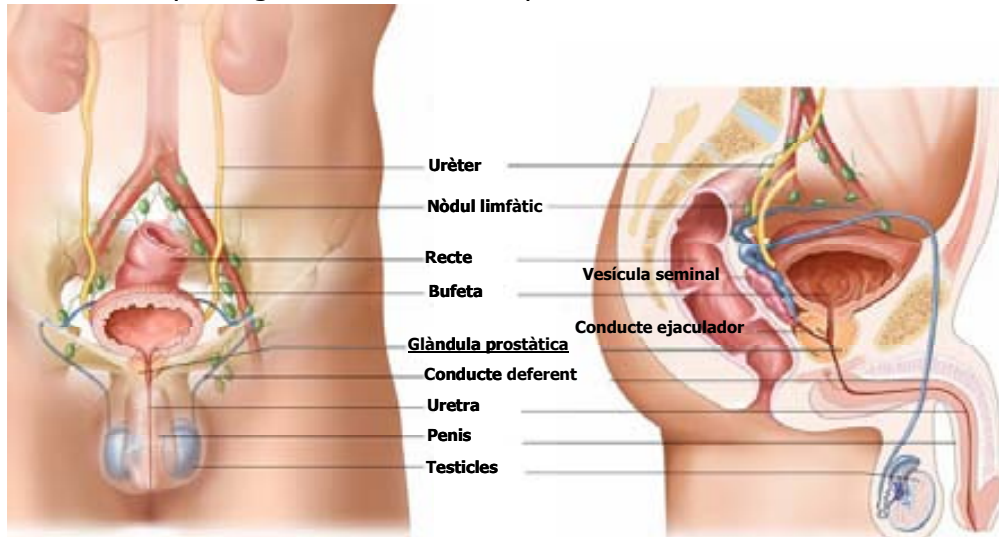


# Introducció



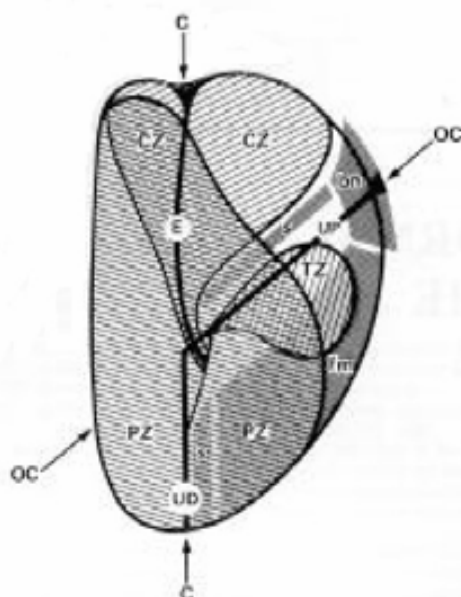
## 1.- ANATOMIA I HISTOLOGIA DE LA PRÒSTATA HUMANA.

La pròstata és un òrgan glandular fibromuscular d'aproximadament 20g que es troba localitzat sota la bufeta urinària i davant del recte (figura I.1). Degut a què la uretra la travessa longitudinalment, qualsevol creixement d'aquest òrgan es tradueix en una obstrucció urinària que origina el síndrome del prostatisme.



**Figura I.1.- Anatomia del sistema urinari i reproductor masculí mostrant la pròstata, els testicles i la bufeta entre altres òrgans.** Font: <http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/prostate/>.

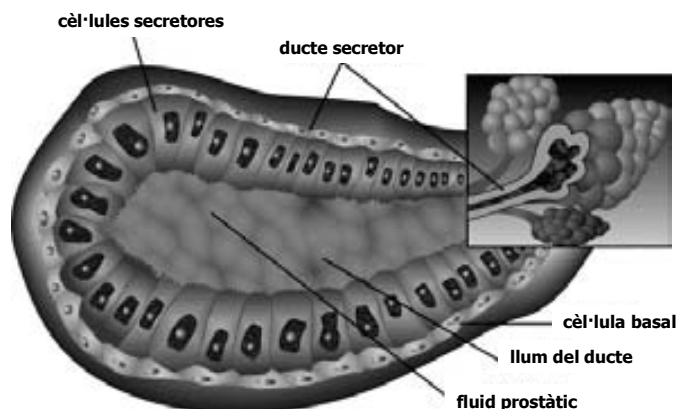
Des del punt de vista anatòmic es diferencien tres zones: la zona perifèrica (PZ) que conté el 70% del teixit glandular prostàtic i és on es desenvolupa la neoplàsia intraepitelial prostàtica (PIN) i el carcinoma prostàtic (CP) (McNeal, 1968; McNeal, 1969), la zona central (CZ) que comprèn el 25% del teixit glandular prostàtic i la zona de transició (TZ) que està formada pel 5% restant de teixit glandular prostàtic i és on s'origina la hiperplàsia benigna de pròstata (HBP) (McNeal, 1978) (figura I.2).



**Figura I.2.- Tall sagital de la pròstata.** Es mostra el segment distal de l'uretra (UD), el segment proximal de l'uretra (UP), el conducte ejaculador (E), l'estroma fibromuscular anterior (fm) i l'esfinter prostàtic (s). Es distingeixen les tres zones de la pròstata: zona central (CZ), zona perifèrica (PZ) i zona de transició (TZ). (Foster, C.S. And Bostwick, D.G.; 1998)

Des del punt de vista histològic, la glàndula prostàtica està formada per un component glandular i un de no glandular fusionats i continguts dins de la càpsula prostàtica. El component no glandular inclou: l' esfínter preprostàtic, l' esfínter estriat, l' estroma fibromuscular anterior i la càpsula prostàtica. En el component glandular hi trobem els acins i conductes prostàtics (formats per un epiteli glandular amb dos compartiments histològics ben definits: el basal i el secretor) submergits en una matriu d' estroma, teixit connectiu, vascular i fibromuscular. Pel desenvolupament i funcionament de la pròstata existeix una estreta interconnexió amb l' estroma (Farnsworth, 1999), que també s'ha vist implicada en el desenvolupament del càncer de pròstata (Chung et al., 2003).

En un epiteli normal de pròstata es poden distingir tres poblacions cel·lulars diferents: **les cèl·lules basals, les cèl·lules epitelials secretores de la llum i les cèl·lules neuroendocrines** (figura I.3).



**Figura I.3.- Esquema dels components cel·lulars de la glàndula prostàtica.** Tall de la regió glandular indicant els tipus cel·lulars presents en els conductes prostàtics, incloent les cèl·lules de la llum i les basals. Adaptat de (Collins et al., 2001).

Tal i com indica el seu nom, les cèl·lules basals es troben separades de l' estroma per la membrana basal, expressen p63 a més a més de les citoqueratines CK5 i CK14 i es caracteritzen per expressar baixos nivells de receptor d' andrògens (AR) (Bonkhoff, Stein, and Remberger, 1993). Les cèl·lules epitelials de la llum són la població majoritària en la pròstata normal, representant el component exocrí de la glàndula prostàtica. Aquestes tenen la funció de secretar una gran varietat de productes al plasma seminal, entre els quals s'hi troben l' antigen específic prostàtic (PSA) i la fosfatasa àcida prostàtica (PAP) i a més a més, expressen citoqueratina CK8 i CK18. A diferència de les cèl·lules basals, les cèl·lules luminals expressen elevats nivells d' AR i per tant són dependents d' andrògens per sobreviure (Kyprianou and Isaacs, 1988; Sar et al., 1990). Les cèl·lules neuroendocrines es troben disperses en l' epiteli secretor de la pròstata, localitzades sobre la capa de cèl·lules basals i de forma aleatòria entre les cèl·lules secretores. Estan molt diferenciades i són insensibles a andrògens atès que han perdut l' expressió d' AR (Bonkhoff, Stein, and



Remberger, 1995). A més a més, existeix una població cel·lular que presenta un fenotip intermedi expressant tant marcadors basals com luminals (CK5, CK8, CK14, CK18 i PSA) (Bonkhoff, Stein, and Remberger, 1994).

## **2.- EL CÀNCER DE PRÒSTATA: INCIDÈNCIA, FACTORS PRONÒSTICS, BASES MOLECULARS I PROGRESSIÓ.**

### **2.1.- Incidència del càncer de pròstata.**

El càncer de pròstata és un dels càncers més comuns, essent la segona causa de mort en homes, després del càncer de pulmó (Mabjeesh, Zhong, and Simons, 2002; MacRae et al., 2006; Mazhar and Waxman, 2004; Papatsoris and Papavassiliou, 2001). El principal problema és la impossibilitat de curar pacients amb la malaltia disseminada (Papatsoris and Papavassiliou, 2001). L'Associació Americana del Càncer va estimar 234.460 nous casos i 27.350 morts de càncer de pròstata als Estats Units el 2006. El fet que més d'un 75% dels diagnòstics d'aquest tipus de càncer són d'homes majors de 65 anys, indica que aquesta tendeix a ser una malaltia d'homes d'avançada edat, població que s'espera que incrementi en un 200% al 2020 (Papatsoris and Papavassiliou, 2001). L'allargament de la mitjana de vida juntament amb les millors en la detecció del càncer de pròstata han causat un increment en la incidència d'aquest tipus de tumor, tot i que la taxa de mortalitat es manté constant (Papatsoris and Papavassiliou, 2001).

El càncer de pròstata a Espanya és la tercera causa de mort per càncer, després del càncer de pulmó i del càncer colorectal, produint 5.448 morts l'any 2000. Pel que fa a Catalunya, i segons les estadístiques del Registre poblacional del Càncer a Tarragona, el càncer de pròstata és el cinquè tumor més freqüent després del càncer de pulmó, de pell, colorectal i de bufeta i representa el 10,9% dels càncers en homes. Segons el Pla nacional d'oncologia 2001-2004 (taula I.1), el càncer de pròstata és el tercer tipus de càncer que ha presentat un major augment en el nombre de casos detectats per any, concretament del 35,5%.

	<b>1998-1999</b>	<b>2000-2001</b>	<b>2002-2003</b>	<b>2004-2005</b>	<b>% increment</b>
pulmó	2880	3310	3815	4400	52,8
colorectal	1690	1900	2130	2370	40,2
cavitat oral	690	765	850	930	34,8
estómac	845	855	870	880	4,1
bufeta urinària	1650	1680	1900	200	21,2
<b>pròstata</b>	1240	1390	1535	1680	<b>35,5</b>

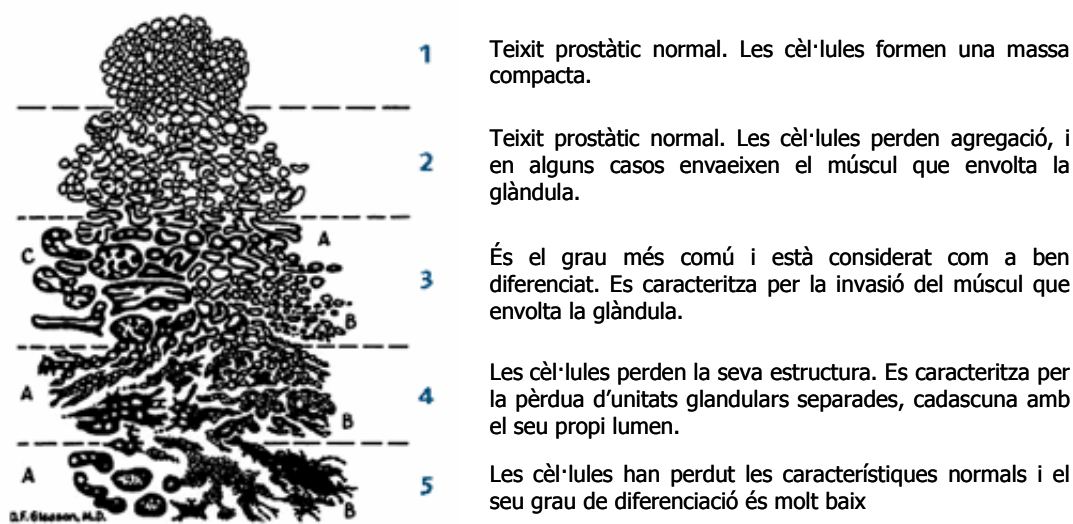
**Taula I.1.- Càlcul dels casos nous anuals dels principals tipus de càncer a Catalunya en homes (1998-2005).** Font: Pla Nacional d'Oncologia a Catalunya:2001-2004. Generalitat de Catalunya. Departament de Sanitat i Seguretat social.

## 2.2.- Factors pronòstics del càncer de pròstata.

En el càncer de pròstata existeixen diversos factors que defineixen la seva naturalesa, com per exemple, factors relacionats amb el grau i estadi tumoral i factors relacionats amb marcadors moleculars. L'estudi d'aquests factors permetrà l'elecció de la teràpia més adient en cada pacient.

### **Grau histològic i estadiatge clínic.**

El sistema de Gleason és el més utilitzat per a l'anàlisi del **grau histològic** de diferenciació del carcinoma prostàtic (Gleason, 1966). Aquest sistema es basa en el grau de diferenciació cel·lular i en el patró del creixement tumoral (referit a l'estroma prostàtic) que varia des de ben diferenciat -o grau 1- fins a indiferenciat -o grau 5- (figura I.4).



**Figura I.4.- Esquema dels diferents graus de diferenciació d'un carcinoma prostàtic.** Adaptat de (Gleason, 1966).

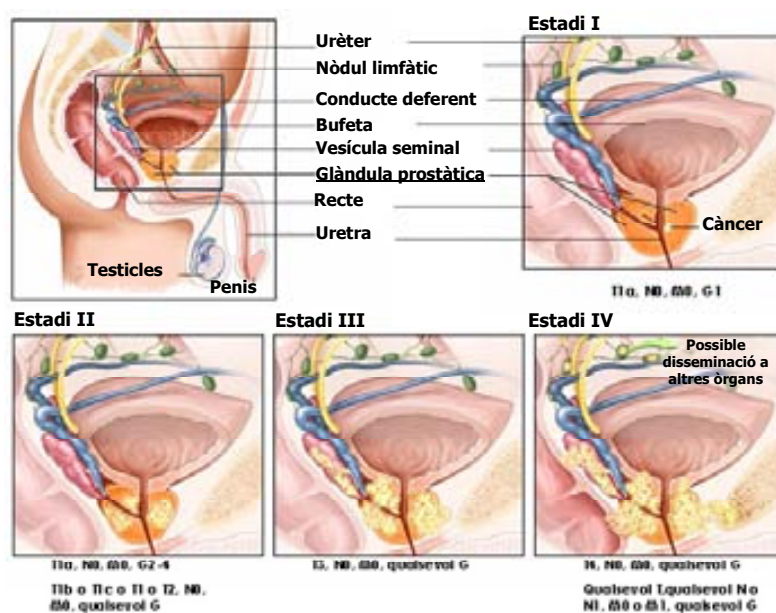
Degut a què la majoria de carcinomes prostàtics presenten més d'un patró histològic (Aihara et al., 1994), s'assigna el grau histològic al patró predominant i el grau histològic al segon patró predominant. Ambdós graus se sumen obtenint valors compresos del 2 al 10 (sistema combinat de Gleason). Segons el sistema combinat de Gleason, els adenocarcinomes de pròstata es poden classificar en ben diferenciats (valors de 2 a 4), moderadament diferenciats (valors de 5 a 7) i desdiferenciats (valors de 8 a 10).

L'**estadi clínic** d'un tumor prostàtic es determina per la classificació de Jewett -descrita al 1975 (Jewett, 1975) i posteriorment modificada- i segons el TNM (*Tumour, Nodules, Metastasis*) proposat i publicat per l'AJCC (*American Joint Committee on Cancer*) i la UICC (*Unione Internationale Contre le Cancer*) al 1997 i posteriorment revisat al 2002 (Taula I.2).

<b>TUMOR PRIMARI (T)</b>	<b>Tx</b>	No es pot avaluar el tumor primari.
	<b>T0</b>	No hi ha evidència de tumor primari.
	<b>T1</b>	Tumor primari no evident clínicament, no palpable ni visible per tècniques d'imatge. <b>T1a:</b> troballa histològica incidental en el ≤5% del teixit ressecat. <b>T1b:</b> troballa histològica incidental en el ≥5% del teixit ressecat. <b>T1c:</b> tumor identificat per biòpsia (degut a marcadors elevats)
	<b>T2</b>	Tumor limitat a la pròstata. <b>T2a:</b> el tumor ocupa la meitat del lòbul o menys. <b>T2b:</b> el tumor ocupa la meitat del lòbul però no dos lòbuls. <b>T2c:</b> el tumor ocupa dos lòbuls.
	<b>T3</b>	El tumor s'estén per la càpsula prostàtica. <b>T3a:</b> Extensió extracapsular (unilateral o bilateral). <b>T3b:</b> el tumor envaeix les vesícules seminals.
	<b>T4</b>	El tumor és fix o envaeix altres estructures adjacents diferents a les vesícules seminals (com el coll vesical, l'esfínter extern, el recte, músculs elevadors i/o la paret pèlvica).
<b>GANGLIS LIMFÀTICS REGIONALS (N)</b> (Ganglis limfàtics pèlvics sota la bifurcació de les artèries comunes ilíaqües)	<b>Nx</b>	No es poden avaluar els ganglis limfàtics regionals.
	<b>N0</b>	No hi ha evidència de ganglis limfàtics regionals.
	<b>N1</b>	Metàstasi en els ganglis limfàtics regionals.
<b>METÀSTASIS A DISTÀNCIA (M)</b>	<b>Mx</b>	No es poden avaluar les metàstasis a distància.
	<b>M0</b>	No hi ha evidència de metàstasis a distància.
	<b>M1</b>	Metàstasi a distància. <b>M1a:</b> els ganglis limfàtics no regionals es troben afectats. <b>M1b:</b> metàstasi a os. <b>M1c:</b> metàstasi a altres localitzacions amb o sense metàstasi a os.

**Taula I.2.- Classificació dels estadis clínics dels carcinomes prostàtics segons el TNM (Tumour, Nodules, Metastasis).** Font: NCI, *Nacional Cancer Institute* (<http://www.cancer.gov/>).

En la figura I.5 es mostra una representació del TNM (revisat al 2002) que agrupa les categories definides segons el TNM en quatre estadis (estadi I a IV) incloent el grau histopatològic (G) on Gx equival a què el grau histopatològic no es pot avaluar, G1 (ben diferenciades: Grau de Gleason 2-4), G2 (moderadament diferenciades, Grau de Gleason 5-6) i G3-4 (poc diferenciades o desdiferenciades, Grau de Gleason 7-10).



**Figura I.5.- Representació dels estadis clínics del carcinoma prostàtic.** AJCC 2002. Font: NCI, *Nacional Cancer Institute* (<http://www.cancer.gov/>).

### ***Cribratge del càncer de pròstata.***

Degut a l'elevada dificultat pel tractament del càncer de pròstata, també és important la cerca d'eines que permetin la detecció d'aquesta malaltia en estadis primerencs per poder establir-ne un diagnòstic i pronòstic i decidir la teràpia més adequada (Bok and Small, 2002). Una de les eines de diagnòstic i pronòstic més usada en el càncer de pròstata és la detecció de **marcadors biomoleculars** específics per aquest tipus de càncer. S'utilitzen marcadors com PAP i PSA, dels quals no se'n coneixen els mecanismes que els relacionen amb la transformació de l'epiteli prostàtic, però s'ha vist una correlació entre els seus nivells en sèrum i una elevada probabilitat de càncer de pròstata ocult i un avançat estadi de la malaltia. En la taula I.3 es mostren els nivells sèrics de PSA i la probabilitat de càncer de pròstata associada.

<b>Nivells de PSA sèrics (ng/ml)</b>	<b>Probabilitat de càncer de pròstata</b>
0-2	1%
2-4	15%
4-10	25%
>10	>50%

**Taula I.3.- Probabilitat de càncer de pròstata associada als nivells de PSA detectats en sèrum.** Font: MD Anderson Cancer Center (<http://www.mdanderson.org>).

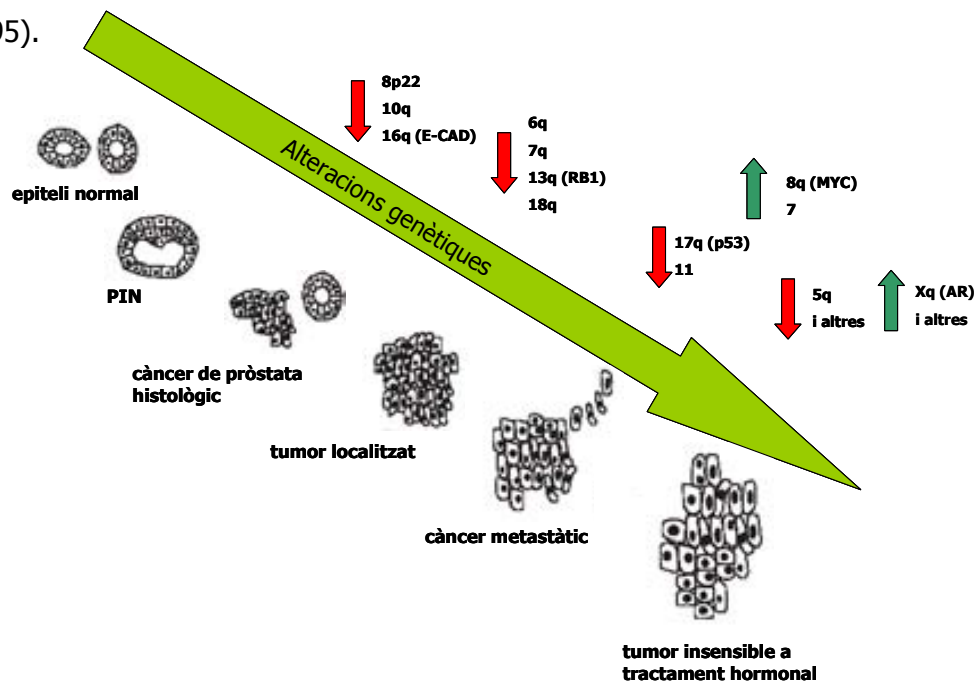
Aquests marcadors tradicionals però, presenten limitacions -com la detecció de nivells elevats d'aquests marcadors en la hiperplàsia benigna de pròstata i la seva expressió per part d'altres teixits diferents al teixit prostàtic- que fan que s'estiguin estudiant nous marcadors biomoleculars més específics. Alguns exemples són: IGF1, hormones com la

testosterona i androstenediona, factors de creixement endotelials (VEGF, bFGF i endotelina) i factors de resorció i de formació de l'os (Bok and Small, 2002).

### 2.3.- Bases moleculars i progressió tumoral del càncer de pròstata.

La major part dels càncers de pròstata són d'origen epitelial i es manifesten com a adenocarcinomes que poden detectar-se a diferents estadis clínicohistològics. Aquests inclouen, de menys a més agressivitat, la neoplàsia intraepitelial prostàtica (PIN), el carcinoma localitzat, el carcinoma invasiu i el carcinoma metastàtic (Nikitin, Matoso, and Roy-Burman, 2007).

Les cèl·lules tumorals de l'adenocarcinoma expressen AR i secreten PSA, d'igual manera que les cèl·lules epitelials de la llum, i per això els pacients responen als tractaments de depleció hormonal. Però a mesura que evoluciona el tumor, les cèl·lules perden l'expressió d'AR i esdevenen refractaris d'aquest tipus de tractament (Nikitin, Matoso, and Roy-Burman, 2007). A nivell molecular, com en el cas de càncer de còlon (Vogelstein et al., 1988), també s'ha hipotetitzat un model de progressió (figura I.6) basant-se en l'adquisició de canvis genètics que podrien ocórrer en els diferents estadis d'evolució clínicohistològics (Visakorpi et al., 1995).

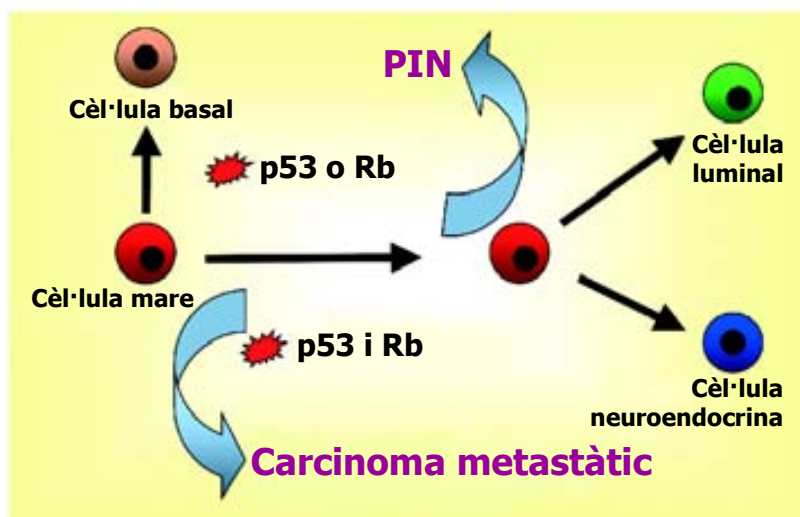


**Figura I.6.- Representació d'un model teòric de progressió tumoral de càncer de pròstata.** Canvis genètics associats a la progressió tumoral del càncer de pròstata. Les fletxes en vermell indiquen pèrdues d'expressió dels gens indicats i les fletxes en verd indiquen guanys d'expressió dels gens indicats. Adaptat de (Visakorpi et al., 1995).

Aquests canvis afecten a diferents cromosomes, com els 6-8, 10, 13, 16-18 i Y (Brothman et al., 1999). De fet, en fases primerenques del tumor s'han observat pèrdues de material genètic de les regions cromosòmiques 6q14-21, 8p22, 10q, 16q, 17q21, 18q21 i Y. En

tumors avançats però encara localitzats es detecten pèrdues de 5q21, 6q, 7q, 8p21, 8q24, 13q i 18q i guanys en 7, 8 i 10q24. Canvis en 11p13, 16q22-24, 17p i Xq11-13 s'han vist en carcinomes amb metàstasis. En tumors insensibles a teràpia hormonal, s'han observat guanys dels cromosomes 7, 8q i Xq (AR) (Visakorpi et al., 1995).

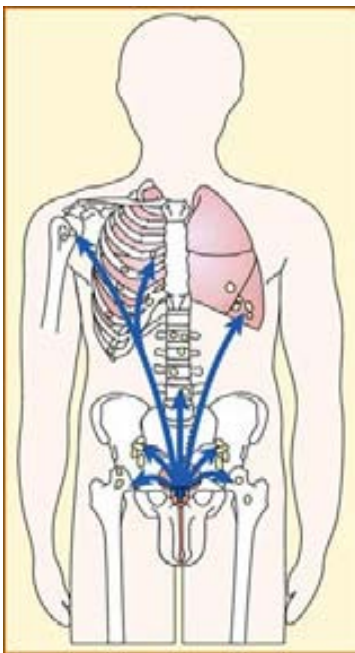
Tot i que les característiques patològiques suggereixen que són les cèl·lules luminals, les que inicien el càncer de pròstata, el tipus concret que l'origina és polèmic, existint treballs que suggereixen que la malaltia és derivada de progenitors intermedis localitzats a les capes basals (van Leenders et al., 2001; van Leenders and Schalken, 2001) o de les cèl·lules basals (Bonkhoff, Stein, and Remberger, 1994). De fet, en els darrers anys -de la mateixa manera que s'ha proposat en altres carcinomes i tumors sòlids o en algunes leucèmies (Al-Hajj et al., 2003; Bonnet and Dick, 1997; Singh et al., 2004)-, alguns autors suggereixen que són les cèl·lules mare de pròstata (*stem cells*) les que adquireixen les mutacions inicials que donaran lloc al càncer de pròstata (Collins and Maitland, 2006; Nikitin, Matoso, and Roy-Burman, 2007), podent esser una explicació de l'heterogeneïtat sovint observada en aquests tumors (Aihara et al., 1994). A diferència de les cèl·lules diferenciades, les cèl·lules mare persisteixen durant tota la vida de l'individu presentant una major possibilitat d'acumular mutacions. En la figura I.7 es mostra un possible mecanisme de carcinogènesi de pròstata associat a la deficiència de p53 i Rb en les cèl·lules mare, basat en els resultats obtinguts en experiments d'inactivació en un epiteli murí de pròstata (Nikitin, Matoso, and Roy-Burman, 2007).



**Figura I.7.- Representació d'un possible mecanisme de carcinogènesi de pròstata associat a la deficiència de p53 i Rb.** La inactivació de p53 o Rb en un epiteli normal de pròstata portaria al desenvolupament de PIN en cèl·lules diferenciades luminalment (en verd); en canvi, la inactivació d'ambdós gens és necessària per a la transformació maligna de la cèl·lula mare (en vermell) comuna pels llinatges luminal i neuroendocrí (en blau). Aquesta inactivació portaria al desenvolupament d'un carcinoma metastàtic i invasiu amb diferenciació luminal i neuroendocrina. Les cèl·lules basals (en taronja) provindrien d'un llinatge mare independent. Adaptat de (Nikitin, Matoso, and Roy-Burman, 2007).

## 2.4.- El càncer de pròstata metastàtic.

El càncer de pròstata normalment s'inicia com una lesió petita i ben diferenciada. Tot i que els tractaments estàndards (prostatectomia radical i radioteràpia) funcionen en alguns pacients amb la malaltia localitzada, una gran part de pacients presentaran un tumor recurrent. Inicialment, el tumor -tal i com succeeix en el teixit prostàtic normal- és dependent d'andrògens pel seu creixement i supervivència essent efectiva la teràpia de privació d'andrògens. Tot i així, molts pacients desenvoluparan un tumor independent a andrògens (AIPC), una forma de càncer de pròstata considerada letal que progressarà (Feldman and Feldman, 2001). Actualment **el càncer de pròstata metastàtic** es considera incurable (Arya et al., 2006; Mazhar and Waxman, 2004) i els tractaments en aquests pacients tenen una finalitat pal·liativa. En la figura I.8 es mostren els teixits i òrgans afectats per les metàstasis d'origen prostàtic: en una primera fase, les metàstasis envaeixen els nòduls limfàtics i/o l'os (Arya et al., 2006). Quan les metàstasis es localitzen a regions òssies distants a la glàndula o a altres òrgans (com el pulmó) normalment no provenen del tumor primari sinó de les metàstasis inicials.



**Figura I.8.- Representació dels teixits i òrgans afectats per les metàstasis d'origen prostàtic.** Font: <http://www.healthsystem.virginia.edu>.

## 3.- TERÀPIES CONVENCIONALS DEL CÀNCER DE PRÒSTATA.

Els tractaments convencionals pel càncer de pròstata localitzat són la cirurgia i la radioteràpia, però més de la meitat dels pacients amb malaltia disseminada no es curen (Mazhar and Waxman, 2004). Una vegada el càncer de pròstata ha metastatitzat, les opcions de tractament es restringeixen a la teràpia hormonal -depleció d'andrògens, (Stanizzi and Hall, 2007)-, però sovint esdevé resistent al tractament hormonal al cap de 14-

20 mesos (Mabjeesh, Zhong, and Simons, 2002). En pacients que han desenvolupat resistència hormonal, la quimioteràpia basada en el taxà ha estat la primera teràpia que ha demostrat un benefici, tot i que modest, en la seva supervivència (Stanizzi and Hall, 2007).

En la taula I.4 es descriuen els tractaments convencionals d'aquests malalts amb càncer de pròstata segons l'estadi clínic del tumor que presenten.

<b>Estadi del càncer de pròstata</b>	<b>Tractaments convencionals</b>
<b>Estadi I</b> (T1a, N0, M0 G1)	<ol style="list-style-type: none"> <li>1.- Espera amb control sense tractament addicional (en pacients seleccionats).</li> <li>2.-Prostatectomia radical normalment amb linfoadenectomia pèlvica. En pacients que presenten penetració capsular o invasió de vesícules seminals, es considera la radioteràpia postoperatòria.</li> <li>3.- Radioteràpia definitiva de feix extern (EBRT, <i>External-Beam Radiation Therapy</i>).</li> <li>4.- Implantació intersticial de radioisòtops (braquiteràpia).</li> </ol>
<b>Estadi II</b> (T1a, N0, M0, G2-4 i T1b o T1c o T1 o T2, N0, M0, qualsevol G)	<ol style="list-style-type: none"> <li>1.- Prostatectomia radical normalment amb linfoadenectomia pèlvica. En pacients que presenten penetració capsular o invasió de vesícules seminals, es considera la radioteràpia postoperatòria.</li> <li>2.- Espera amb control sense tractament addicional (en pacients seleccionats).</li> <li>3.- Radioteràpia definitiva de feix extern amb o sense teràpia hormonal.</li> <li>4.- Implantació intersticial de radioisòtops (braquiteràpia).</li> </ol>
<b>Estadi III</b> (T3, N0, M0, qualsevol G)	<ol style="list-style-type: none"> <li>1.- Radioteràpia definitiva de feix extern amb o sense teràpia hormonal.</li> <li>2.-Teràpia hormonal.</li> <li>3.- Prostatectomia radical normalment amb linfoadenectomia pèlvica, amb o sense radioteràpia postoperatòria.</li> <li>4.- Espera amb control sense tractament addicional (en pacients seleccionats).</li> <li>5.- Radioteràpia, teràpia hormonal o resecció transuteral com a teràpia pal·liativa.</li> </ol>
<b>Estadi IV</b> (T4, N0, M0, qualsevol G i qualsevol T, qualsevol N o N1, M0 o M1, qualsevol G)	<ol style="list-style-type: none"> <li>1.- Teràpia hormonal.</li> <li>2.- Radioteràpia definitiva de feix extern amb o sense teràpia hormonal.</li> <li>3.- Radioteràpia o resecció transuteral com a teràpia pal·liativa.</li> <li>4.- Espera amb control.</li> </ol>
<b>Càncer de pròstata recurrent</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1.- Radioteràpia.</li> <li>2.-Prostatectomia radical en pacients inicialment tractats amb radioteràpia.</li> <li>3.- Teràpia hormonal.</li> <li>4.- Medicació pal·liativa, radioteràpia definitiva de feix extern, implantació intersticial de radioisòtops (braquiteràpia) o altres tractaments pal·liatius per disminuir el dolor ossi.</li> </ol>

**Taula I.4.- Tractaments convencionals del càncer de pròstata segons l'estadi clínic.** Font: NCI, *Nacional Cancer Institute* (<http://www.cancer.gov/>).



El fet que els tractaments convencionals del càncer de pròstata tan sols funcionin amb pacients amb la malaltia localitzada juntament amb els efectes secundaris d'aquests tractaments -com per exemple impotència, incontinença i un risc més elevat de fractures òssies (Cross and Burmester, 2006)- demostra que són necessàries noves modalitats de tractament com a adjuvants a les teràpies convencionals.

#### **4.- LA TERÀPIA GÈNICA : APLICACIONS EN EL CÀNCER DE PRÒSTATA.**

Els avanços dels darrers anys en biologia cel·lular i molecular han permès no tan sols el coneixement de les bases moleculars de determinades malalties sinó també el desenvolupament de tecnologies per a la transferència de material genètic *in vitro* i *in vivo*. En aquest sentit, la teràpia gènica -que sorgeix com una eina terapèutica per restablir, substituir o potenciar les funcions biològiques de cèl·lules i teixits sans- ha estat emprada amb èxit pel tractament de malalties genètiques -especialment monogèniques (com per exemple, la fibrosi quística i la distròfia muscular de Duchenne)- i infeccioses (com per exemple, la SIDA i el tètanus) (Edelstein et al., 2004; Young et al., 2006). Tanmateix, la teràpia gènica també s'ha proposat com a alternativa als tractaments convencionals del càncer amb la finalitat d'assolir un efecte antitumoral (Mabjeesh, Zhong, and Simons, 2002; Mazhar and Waxman, 2004).

Però l'ús de la teràpia gènica en càncer, a diferència de la resta d'aplicacions terapèutiques, és molt més complex atès que, a més a més d'identificar el gen diana l'expressió del qual es vol modificar, es plantegen una sèrie d'interrogants i reptes:

- (1) a qui hauria d'anar dirigida, quin tipus de material genètic s'hauria de transferir i amb quin efecte?**
- (2) quina seria la ruta o via d'administració?**
- (3) quin seria el vehicle de transferència?**

L'eficàcia dels tractaments de teràpia gènica en càncer depèn en part de la resolució d'aquestes preguntes, i és per això que centraré aquesta part de la introducció a resumir els coneixements i les estratègies terapèutiques desenvolupades en els darrers anys (especialment en càncer de pròstata) que ens han conduït a plantejar els objectius d'aquesta tesi i el desenvolupament d'aquest treball.

#### **4.1.- A qui hauria d'anar dirigida, quin tipus de material genètic s'hauria de transferir i amb quin efecte?**

En el càncer de pròstata s'han desenvolupat tres estratègies, classificades segons l'efecte assolit, pel tractament de malalts en fases avançades de la malaltia degut al fracàs dels tractaments convencionals (Foley, Lawler, and Hollywood, 2004; MacRae et al., 2006). Aquestes són : **la teràpia gènica immunològica, teràpia gènica correctora i teràpia gènica suïcida**. Pel que fa al tipus de material genètic que s'hauria de transferir, tant el RNA (oligonucleòtids, ribozims, siRNA, mRNA) com el DNA (oligonucleòtids, plasmidis, cromosomes artificials) (Wagner, Kircheis, and Walker, 2004) podrien ser emprats per modular o modificar l'expressió gènica i obtenir els beneficis terapèutics desitjats, però la majoria dels estudis en teràpia gènica del càncer de pròstata en fases preclíniques i clíniques han emprat la transferència de DNA (Belldegrun et al., 2001; Eder et al., 2000; Freytag et al., 2002; Freytag et al., 2003; Gulley et al., 2002; Herman et al., 1999; Honda et al., 2002; Nasu, Ebara, and Kumon, 2004; Pisters et al., 2004; Sanda et al., 1999; Satoh et al., 2004; Simons et al., 1999; Trudel et al., 2003; Zhang et al., 2002). A continuació es comenten les tres estratègies terapèutiques emprades en estudis en fase preclínica i clínica de teràpia gènica del càncer de pròstata.

##### ***Teràpia gènica immunològica.***

La modificació per teràpia gènica del sistema immunitari ha donat molts fruits en assajos clínics de teràpia gènica en càncer (Young et al., 2006). Mitjançant l'expressió de citoquines -com per exemple la Interleuquina-2 (IL-2) (Belldegrun et al., 2001) o el factor estimulant de colònies granulocítiques-macrofàgiques (GM-CSF) (Simons et al., 1999)- o de proteïnes antigèniques tumorals -com per exemple, en el cas del càncer de pròstata, l'expressió de l'antigen específic de pròstata (PSA) (Eder et al., 2000; Gulley et al., 2002; Sanda et al., 1999)- es pot aconseguir l'activació de resposta immunitària contra les cèl·lules tumorals.

En estudis en fase clínica emprant la transferència d'IL-2 per administració intraprostàtica (Belldegrun et al., 2001; Trudel et al., 2003) s'han obtingut bones expectatives en observar-se una disminució dels nivells sèrics de PSA. Els resultats obtinguts en estudis preclínics per la transferència d'IL-12, han portat a l'inici d'estudis en fase clínica en pacients amb càncer de pròstata avançat (Nasu, Ebara, and Kumon, 2004). Per altra banda, en estudis en fase clínica basats en la transferència *ex vivo* de GM-CSF s'ha observat una activació de la resposta immunològica, tant cel·lular com humoral, contra les cèl·lules de càncer de pròstata (Simons et al., 1999).

***Teràpia gènica correctora.***

Aquesta es basa en la correcció dels errors genètics que presenten les cèl·lules tumorals. Aprofitant que la sobreexpressió en cèl·lules de càncer de pròstata de p53 i el gen proapoptòtic *bax* inhibeix el creixement tumoral (Asgari et al., 1997; Li et al., 2001), alguns autors els han emprat en la teràpia gènica pel càncer de pròstata.

S'han obtingut bones expectatives en estudis preclínic en models animals de càncer de pròstata emprant la transferència del gen proapoptòtic *bax* sota el control d'un promotor constitutiu (Honda et al., 2002) o d'un promotor específic de pròstata (Lowe et al., 2001; Zhang et al., 2002). Els resultats indiquen un augment de la inducció de l'apoptosi en cèl·lules tumorals de càncer de pròstata. De manera similar, en estudis en fase clínica utilitzant la transferència de p53, es va observar un increment de cèl·lules apoptòtiques en 8 dels pacients analitzats (Pisters et al., 2004).

***Teràpia gènica suïcida o GDEPT (Gene-Dependent Enzyme Prodrug Therapy) .***

Es tracta de la introducció a les cèl·lules diana d'un enzim que metabolitza una droga no citotòxica convertint-la en citotòxica. La droga no citotòxica s'injecta de forma sistèmica produint-se la mort de les cèl·lules que hagin rebut el transgen i també de les cèl·lules veïnes, degut al transport de l'agent citotòxic a aquestes cèl·lules mitjançant les unions gap pel que s'anomena *bystander effect* (MacRae et al., 2006). S'ha demostrat que tan sols la infecció d'un 10% de les cèl·lules tumorals pot eradicar el tumor (Shalev et al., 2000), essent aquesta estratègia menys dependent d'una transferència gènica eficient (Foley, Lawler, and Hollywood, 2004; MacRae et al., 2006). Els sistemes enzim/prodroga més emprats en assajos clínics pel càncer de pròstata han estat el gen de la timidina quinasa del Virus Herpes Simplex (HSV-tk) en combinació amb la prodroga Ganciclovir i el gen de la Citosina Desaminasa (CD) que converteix la 5-fluorocitosina en el 5-fluoracil.

Estudis en fase clínica utilitzant el sistema HSV-tk/ganciclovir (Herman et al., 1999) o la combinació dels dos sistemes enzim/prodroga (Freytag et al., 2002) van demostrar bons resultats en detectar-se en ambdós casos una disminució del PSA sèric. També s'han descrit estudis en fase clínica basats en la combinació dels sistemes enzim/prodroga i radioteràpia que han demostrat la funcionalitat de la combinació d'aquestes dues teràpies (Freytag et al., 2003; Satoh et al., 2004).

#### 4.2.- Quina seria la ruta o via d'administració?

Un altre fet que cal considerar per a la seguretat i eficàcia de la teràpia gènica és la ruta o via d'administració del vector terapèutic. Aquesta administració es pot realitzar *ex vivo* -que implica la manipulació i introducció del gen terapèutic *in vitro* emprant les cèl·lules extretes d'un teixit o òrgan del pacient, les quals es reintrodueixen al pacient després d'haver estat seleccionades per a l'expressió del gen escollit- o *in vivo* -en què el vector s'administra directament al pacient per injecció *in situ* al teixit d'interès o per injecció sistèmica- (Foley, Lawler, and Hollywood, 2004; Mabweesh, Zhong, and Simons, 2002).

L'administració *ex vivo* ha estat emprada en estudis en fase clínica de teràpia gènica immunològica pel tractament de pacients de càncer de pròstata (Simons et al., 1999). Utilitzant aquest tipus d'administració s'evitaria el risc de transferència gènica a cèl·lules i teixits no diana, però presenta dificultats tècniques, degudes principalment a les condicions de cultiu, que ha limitat el seu ús en teràpia gènica (Foley, Lawler, and Hollywood, 2004).

Respecte a l'administració *in vivo*, en estudis clínics de teràpia gènica s'han utilitzat les vies d'administració intratumoral, subcutània, intradèrmica, intramuscular i intravenosa (o sistèmica) (Foley, Lawler, and Hollywood, 2004). La selecció de la ruta o via d'administració dependrà tant de la malaltia com del transgen utilitzat. Si s'utilitza un vector que codifica per un antigen tumoral (com per exemple el PSA) no és necessari l'alliberament específic al tumor, essent bones rutes d'administració la intradèrmica, la intramuscular i la subcutània (que permet l'administració de volums més elevats de vector) (Foley, Lawler, and Hollywood, 2004). Tant aquestes rutes d'administració com la injecció intraprostàtica, limiten la transferència del transgen a l'àrea que envolta el punt d'injecció, tot i així, una petita part del vector serà absorbit a la circulació sistèmica arribant a altres òrgans i especialment a fetge i per tant produint-se la transferència del transgen a cèl·lules no diana (Foley, Lawler, and Hollywood, 2004). Pel que fa a la injecció intravenosa, la transferència del transgen no es veu limitada a la zona d'administració, essent de gran interès en el cas del càncer ja que permetria el tractament de la malaltia disseminada (Wickham, 2000), però també presenta limitacions com el risc de transferència del transgen a cèl·lules i teixits no diana, l'acumulació d'elevades concentracions del vector terapèutic al fetge produint efectes hepatotòxics i la inhibició per part de les proteïnes del sèrum d'alguns tipus de vectors obtenint una disminució de la transferència del transgen (Foley, Lawler, and Hollywood, 2004). En el cas del càncer de pròstata, en la major part d'estudis en fase clínica s'ha emprat la injecció intratumoral (DeWeese et al., 2001; Freytag et al., 2002; Teh et al.,

2001) facilitada per l'ús de tècniques similars en la braquiteràpia, però també la injecció directa a metàstasis d'os i de nòduls limfàtics (Kubo et al., 2003) i la injecció intravenosa (Tolcher, 2001).

#### **4.3.- Quin seria el vehicle de transferència?**

Un dels veritables problemes en l'aplicació de la teràpia gènica és la manca de sistemes eficients en la transferència del material genètic a les cèl·lules diana, resultant en l'expressió ineficient del transgen en aquestes cèl·lules i en respostes immunològiques indesitjades.

Conceptualment, el vehicle ideal hauria de transferir el transgen de forma específica i eficient a les cèl·lules diana, no hauria de ser ni tòxic, ni immunogènic, ni mutagènic i s'hauria de poder produir a elevades concentracions i sense un cost elevat per a la societat (Mazhar and Waxman, 2004). Per aquest propòsit, s'han desenvolupat dos tipus de sistemes de transferència: els **no virals** i els **virals** (Mabjeesh, Zhong, and Simons, 2002; Mazhar and Waxman, 2004), alhora que també s'han inclòs promotors i *enhancers* per millorar el rendiment i l'especificitat de l'expressió del transgen a les cèl·lules diana.

#### **5.- SISTEMES DE TRANSFERÈNCIA NO VIRALS.**

Els sistemes de transferència no virals són vehicles sintètics que es basen en la introducció del transgen a les cèl·lules per mètodes químics o físics. Són menys immunogènics que els vectors virals, no tenen limitació en la mida del transgen que han de transferir i es poden produir fàcilment a gran escala. Tot i això, presenten desavantatges que han limitat la seva aplicació en la teràpia gènica contra el càncer. Entre elles cal assenyalar la baixa eficiència de transferència del transgen (MacRae et al., 2006).

La major part dels sistemes de transferència no virals són de tipus químic i de naturalesa catiónica, permetent interaccions electrostàtiques amb el DNA. El complex generat -amb càrrega neta positiva- facilita la interacció amb les membranes cel·lulars -amb càrrega negativa- i la internalització a la cèl·lula majoritàriament per una via endocítica (El-Aneed, 2004). Aquest tipus de vectors com són els poliplexes, lipoplexes i nanoplexes redueixen tant la mida com la càrrega del DNA, protegint-lo així de la hidròlisi per les nucleases sèriques, evitant interaccions indesitjades amb components sanguinis i augmentant l'entrada a la cèl·lula (Wagner, Kircheis, and Walker, 2004).

Els nanoplexes són associacions o encapsulacions del DNA en nanopartícules. Poden ser nanosferes, si el DNA es troba dispers per tota la partícula, o nanocàpsules, si el DNA es troba absorbit a la superfície de la partícula. Alguns exemples són nanocàpsules de poli(alquilcianoacrilat), gelatina o albúmina (Wagner, Kircheis, and Walker, 2004). Pel que fa als poliplexes, són associacions del DNA amb polímers catiónics, com per exemple, proteïnes que s'uneixen de forma natural al DNA -com histones o protamines-, polímers sintètics d'aminoàcids -com la polilisina- o altres polímers com el DEAE-dextrà, pDMAEM (poli(dimetilaminoetilmetacrilats)), PEI (polietilenimina), dendrímers catiónics o polímers carbohidratats (Wagner, Kircheis, and Walker, 2004). Els lipoplexes són associacions de DNA amb lípids, es poden produir fàcilment, no són immunogènics i poden transfectar un ampli rang de tipus cel·lulars. Aquests, però, presenten una baixa eficiència de transfecció, ja que un cop el liposoma arriba a la cèl·lula diana, aquest s'ha d'unir a la seva superfície, entrar mitjançant endocitosi o fagocitosi i finalment escapar de la vesícula per tal d'evitar la degradació. La seva administració ha de ser de forma local atès que la unió a les proteïnes del sèrum pot portar a la seva desintegració i a la posterior degradació del DNA (MacRae et al., 2006). Els liposomes han estat utilitzats per alliberar gens terapèutics en estudis preclínics (Iyer et al., 2001) i en estudis clínics de càncer de pròstata (Belldegrun et al., 2001). Cal esmentar la transferència de DNA mitjançant precipitació amb fosfat càlcic, en què el precipitat que es forma és introduït a les cèl·lules per endocitosi o fagocitosi. Aquest sistema, però, tan sols s'utilitza en sistemes *in vitro* i *ex vivo* (Rochlitz, 2001).

Els sistemes de transferència no virals de tipus físic utilitzen forces físiques (com camps elèctrics o magnètics o forces mecàniques) per a l'alliberament del DNA a les cèl·lules o teixits. Un exemple és l'electroporació, que implica l'aplicació d'un camp elèctric després de l'administració local del DNA i que provoca una reestructuració transitòria de la membrana cel·lular (afectant sobretot als fosfolípids), modificant la seva permeabilitat i permetent així la introducció de DNA a l'interior de la cèl·lula. Depèn de la duració, la intensitat i el nombre de polsos elèctrics (Wagner, Kircheis, and Walker, 2004) i té com avantatge que la mida del transgen no és limitant, però sí ho són la concentració de DNA i el tipus i característiques dels polsos elèctrics. Per això l'electrotransferència s'utilitza sobretot *in vitro* amb eficàcies de transfecció comparables a les obtingudes per lipofecció. Tot i així, també s'ha emprat *in vivo* per a la transfecció de p53 en tumors subcutanis de pròstata (Mikata et al., 2002). Un altre sistema no viral de tipus físic és la biobalística o bombardeig de partícules, inicialment desenvolupat en cèl·lules vegetals i que es basa en el bombardeig del teixit d'interès amb

microesferes d'or coactades amb el DNA emprant pistoles d'heli (MacRae et al., 2006; Wagner, Kircheis, and Walker, 2004). Aquest procediment s'ha aplicat en vacunes de DNA i teràpies antitumorals (Wagner, Kircheis, and Walker, 2004; Wang et al., 2001).

El sistema més simple de transferència no viral, és la injecció directa de DNA nu, però, a l'igual que la resta dels sistemes comentats fins ara, presenta baixes eficiències de transferència gènica (Wagner, Kircheis, and Walker, 2004), observant-se la màxima eficiència en el múscul (Mabjeesh, Zhong, and Simons, 2002). Aquest procediment s'ha emprat en estudis preclínics, on la injecció intramuscular d'un plasmidi codificant per PSA va activar una forta resposta immunològica en el model animal emprat (Kim et al., 1998).

## **6.- ELS VECTORS VIRALS.**

Els vectors virals han estat i són encara considerats com els vectors d'excel·lència per la teràpia gènica, atès que a la natura els virus són els responsables de la transferència de material genètic a les cèl·lules (El-Aneed, 2004). Malgrat això, el seu ús està limitat pels efectes secundaris que provoquen i les possibles infeccions víriques que hagi patit l'hoste prèviament al tractament, les quals podrien induir una resistència en aquest tipus de teràpia.

Els vectors virals més utilitzats en teràpia gènica són els Adenovirus (Ads), els Retrovirus (RVs) -incloent els lentivirus-, els virus Adenoassociats (AAVs), els Herpesvirus (HVs) i els Vacciniavirus (VVs), els quals resumiré breument, excepte en el cas dels Ads que han estat objecte concret del treball que presento i que comento més extensament en els següents apartats. En la taula I.5 s'han resumit les principals característiques, avantatges i limitacions dels diferents vectors virals comentats en aquest treball.

		<b>Retrovirus (RV)</b>	<b>Adenovirus (Ad)</b>	<b>Virus Adenoassociat (AAV)</b>	<b>Herpesvirus (HV)</b>	<b>Vacciniavirus (VV)</b>
<b>Característiques</b>	<b>Mida del transgen</b>	8 Kb	7,5 a 37 Kb	4,5 Kb	≥30 Kb	≤25 Kb
	<b>Concentració (pfu/ml)</b>	10 <sup>6</sup> -10 <sup>9</sup>	10 <sup>8</sup> -10 <sup>10</sup>	10 <sup>6</sup> -10 <sup>8</sup>	10 <sup>6</sup> -10 <sup>9</sup>	10 <sup>7</sup> -10 <sup>9</sup>
	<b>Administració</b>	<i>ex vivo</i> i <i>in vivo</i>	<i>ex vivo</i> i <i>in vivo</i>	<i>ex vivo</i>	<i>ex vivo</i> i <i>in vivo</i>	<i>ex vivo</i> i <i>in vivo</i>
	<b>Localització intracel·lular</b>	Nuclear	Nuclear	Nuclear	Nuclear	Citoplasmàtica
	<b>Expressió del transgen</b>	Estable	Transitòria	Desconeguda, possiblement estable	Transitòria	Transitòria
	<b>Infecció cel·lular</b>	Tan sols cèl·lules en divisió (excepte els lentivirus)	Tant cèl·lules en divisió com quiescents	Tant cèl·lules en divisió com quiescents	Tant cèl·lules en divisió com quiescents	Tant cèl·lules en divisió com quiescents
	<b>Immunogenicitat</b>	No	Sí	Sí	Sí	No
<b>Avantatges</b>	Es transmet a la progènie de les cèl·lules transduïdes.  Expressió del transgen de llarga durada.	Es poden produir a elevats títols.  Elevada eficiència de transducció.  Episomal, no hi ha risc de mutagènesi insertacional.  Elevada expressió del transgen.	No són patògens.  Elevada eficiència de transducció.	Mida del transgen gran.  Episomal, no hi ha risc de mutagènesi insertacional.	Mida del transgen gran.  Es replica <i>in vivo</i> .	
<b>Desavantatges</b>	Risc de mutagènesi insertacional.  Baixa eficiència de transducció.  Inactivat pel complement <i>in vivo</i> .  El direccionament és difícil.	La seva infecció provoca resposta immune cel·lular immediata limitant la durada de l'expressió.  La resposta immune humoral impedeix la reinfecció.  Inflamació local del teixit.	Mida del transgen limitada.  Es poden produir reorganitzacions durant la integració al genoma.  Risc de contaminació amb Ad <i>helper</i> o de AAV wt.  Mutagènesi insertacional.	Expressió transitòria.  Citopàtic.  És difícil produir-los a gran escala.	Baixa eficiència.  Immunitat preexistent que limita l'expressió a 1 mes de durada.	

**Taula I.5.- Característiques, avantatges i desavantatges dels vectors virals.** Adaptat de (Jolly, 1994; Mabweesh, Zhong, and Simons, 2002).



### 6.1.- Els Retrovirus (RVs).

Els vectors retrovirals han estat els més usats en assajos clínics de teràpia gènica des de 1990 quan es van utilitzar pel tractament d'un pacient amb deficiència d'adenosina desaminasa (Jolly, 1994). Els RVs pertanyen a la família *Retroviridae*, presenten un genoma de cadena doble de RNA que una vegada a l'interior de la cèl·lula i utilitzant la transcriptasa reversa viral, es converteix en un DNA de doble cadena intermedi. Aquest entra al nucli cel·lular on s'integra aleatòriament al genoma de la cèl·lula hoste emprant les seqüències virals anomenades *Long Terminal Repeats* (LTR) (Mabjeesh, Zhong, and Simons, 2002). El genoma del retrovirus codifica pels gens *gag*, *pro*, *pol* i *env*. El gen *gag* codifica per la proteïna estructural interna del virió, el gen *pro* per la proteasa viral, el gen *pol* per la transcriptasa reversa viral i el gen *env* pels dos components que formen el complex que interacciona específicament amb els receptors cel·lulars, la glicoproteïna de superfície (SU) i la proteïna transmembrana (TM). Els vectors derivats de retrovirus presenten aquests gens substituïts pel transgen (El-Aneed, 2004) i per tant és necessari l'ús d'una línia cel·lular empaquetadora que expressi aquests gens en *trans* per la seva producció (Young et al., 2006).

Els avantatges d'aquests vectors són la seva elevada eficiència de transducció, que no són immunogènics i la capacitat d'integrar-se al genoma de la cèl·lula hoste permetent l'expressió estable del transgen durant un període de temps llarg (Boris-Lawrie and Temin, 1994). Aquesta capacitat d'integració pot ser beneficiosa pel seu ús en teràpia gènica, però també pot portar a efectes no desitjats representant una limitació pel seu ús en teràpia gènica, com l'activació de protooncògens a conseqüència de la mutagènesi insertacional -tal i com va succeir en l'estudi en fase clínica que es va realitzar amb pacients que presentaven SCID-X1, on 3 de 17 pacients van desenvolupar leucèmia després de tres anys del tractament degut a la integració del genoma viral en regions proximals al promotor del protooncogen LOM2 (Young et al., 2006)-. Altres limitacions són la infecció tan sols de cèl·lules que es troben en divisió (excepte en el cas dels lentivirus), la informació genètica que pot transportar (8Kb) degut a la mida petita del seu genoma (9-10Kb de DNA) i la dificultat de ser produïts a gran escala pel seu ús *in vivo* (MacRae et al., 2006). Tot i així aquests virus han estat emprats en assajos clínics pel càncer de pròstata (Simons et al., 1999).

## 6.2.- Els virus Adenoassociats (AAVs).

Els AAVs són virus de la família *Parvoviridae*, tenen un genoma petit de DNA (4,7 Kb) de cadena senzilla i requereixen un virus *helper* (Ad o HV) per a la seva replicació. Els seus dos gens (*cap* i *rep*) es troben flanquejats pels *Inverted Terminal Repeats* (ITR) que marquen l'inici i final del genoma viral. El gen *cap* codifica per les proteïnes de la càpside i el gen *rep* s'encarrega dels processos d'integració i replicació. Els AAVs són virus humans, tot i que no se'ls ha associat una patologia concreta (Mabjeesh, Zhong, and Simons, 2002; Young et al., 2006). De fet, poden infectar diversos tipus de cèl·lules tant en divisió com quiescents (MacRae et al., 2006; Vorburger and Hunt, 2002), integrant-se preferencialment en el cromosoma 19 del genoma podent-hi persistir durant tota la vida de la cèl·lula (Muzyczka, 1992) tot i que, en el cas dels vectors derivats dels AAVs, el seu genoma persisteix com a episoma (Young et al., 2006). En els vectors derivats dels AAVs emprats en teràpia gènica, s'han substituït els gens *cap* i *rep* pel transgen, evitant així respostes immunològiques per part de l'hoste (El-Aneed, 2004).

Els avantatges d'aquests vectors són que no presenten toxicitat ni immunogenicitat, però tenen com a limitació la mida del DNA que es pot introduir (4,5Kb) atès a la mida del seu genoma. Altres limitacions són la dificultat i ineficàcia del procés de producció -degut en part al virus *helper* complementari- i la possibilitat que es generin AAV salvatges i AAV competents en la replicació (rcAAV) (MacRae et al., 2006; Vorburger and Hunt, 2002).

## 6.3.- Els Herpesvirus (HVs).

Els HVs són virus de la família *Herpesviridae* de DNA lineal de doble cadena i presenten la càpside envoltada per una fina capa de proteïnes i un embolcall de bicapa lipídica. La mida del seu genoma és de 152Kb que es replica al nucli de forma episòmica, permetent el transport de com a mínim 30Kb de DNA exogen (Vorburger and Hunt, 2002). Als vectors derivats d'aquests virus, per tal de disminuir els efectes tòxics, se'ls han deletat gens com *ICP27*, *ICP4* i *ICP34,5* (Foley, Lawler, and Hollywood, 2004). Aquests virus presenten un extens tropisme, podent infectar la major part de cèl·lules humanes tant si estant en divisió com si no i atès a què el seu genoma es replica a nucli, l'alliberació del transgen pot ser nuclear. Però són citotòxics per un nombre elevat de tipus cel·lulars, esdevenint aquesta la principal limitació pel seu ús en teràpia gènica (Mabjeesh, Zhong, and Simons, 2002; MacRae et al., 2006).

#### **6.4.- Els Vacciniavirus (VV).**

Els VVs pertanyen a la família *Poxviridae*, presenten un genoma de DNA de cadena doble de 186Kb (El-Aneed, 2004) que es replica al citoplasma de la cèl·lula hoste (Foley, Lawler, and Hollywood, 2004) podent transportar grans quantitats de DNA exogen ( $\leq 25$ Kb). Presenten els avantatges que infecten tant cèl·lules en divisió com quiescents i es poden produir fàcilment a gran escala (MacRae et al., 2006). Aquests virus, però, són immunogènics, essent aquest un desavantatge per ser utilitzat com a vector en teràpia gènica. Tot i així, han estat emprats en la teràpia gènica contra el càncer de pròstata per alliberar vacunes de PSA (Eder et al., 2000; Gulley et al., 2002; Sanda et al., 1999).

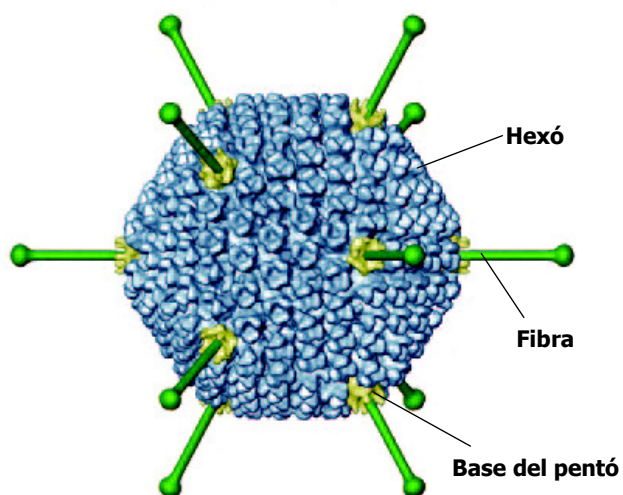
#### **7.- ELS ADENOVIRUS I ELS VECTORS ADENOVIRALS.**

Van ser descoberts per *Rowe et al.* fa mig segle (Rowe et al., 1953) i, degut a què aquests virus són els causants de malalties respiratòries, oculars i gastrointestinals en humans han estat àmpliament estudiats.

Els Ads pertanyen a la família *Adenoviridae* que es divideix en dos gèneres, els *Aviadenoridus* i *Mastadenovirus* (dins del qual hi ha els Ads humans). A la natura es troben 51 serotips diferents d'Ads humans que s'han classificat en 6 grups (A-F) segons l'homologia que presenten en la seqüència, la seva capacitat d'aglutinar glòbuls vermells, l'oncogenicitat en rosegadors i l'organització genòmica (Zhang and Bergelson, 2005). Existeix una correlació, tot i que imperfecta, entre els diferents grups i el seu tropisme tissular. Concretament, els virus dels grups B1, C i D són causants d'infeccions respiratòries, el grup B2 d'infeccions de ronyó i de tracte urinari, el grup F de gastroenteritis i alguns serotips del grup D s'associen a queratoconjuntivitis (Zhang and Bergelson, 2005). Els Ads del grup C Ad2 i Ad5, són els adenovirus més ben caracteritzats (Rux and Burnett, 2004) i concretament en aquest treball hem emprat l'Ad5.

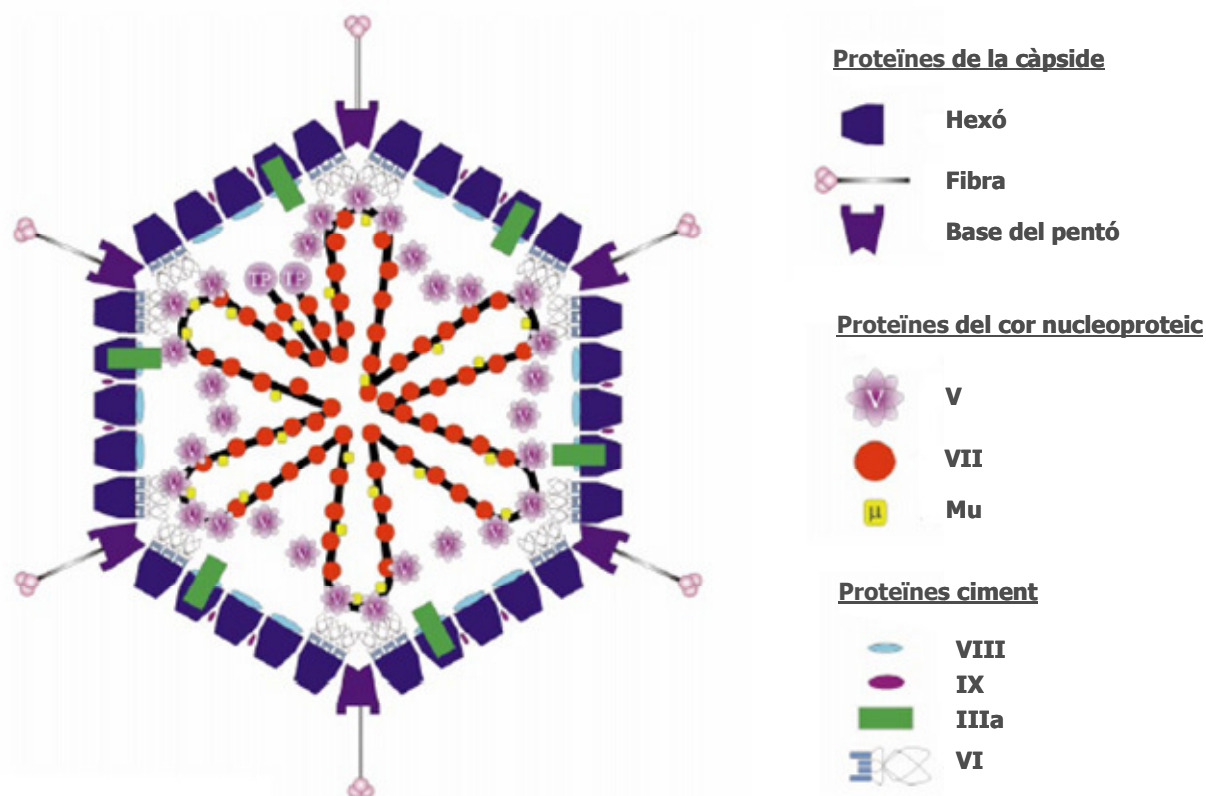
##### **7.1.- Estructura i biologia molecular dels Adenovirus.**

Els Ads són partícules víriques no embolcallades amb estructura icosaèdrica, tenen una mida de 70-90nm i el seu pes molecular és de 150MDa (figura I.9). La càpside icosaèdrica està formada per 20 cares triangulars, 30 arestes i 12 vèrtexs, amb un diàmetre aproximat de 926Å sense incloure les fibres, la longitud de les quals varia entre 120 i 315Å segons el serotip (Stewart et al., 1991).



**Figura I.9.- Estructura de l'adenovirus.** Resolució de 17Å. Cadascuna de les 20 cares triangulars de d'icosaedre està formada per 12 còpies de trímer d'hexó (en blau), a cada vèrtex una fibra (en verd) sobresurt de la base del pentó (en groc). L'estructura de la capsida d'hexó i de la base del pentó són derivades de la imatge de microscopia crioelèctrica de l'Ad5. Les fibres s'han modelat a partir de l'estructura atòmica de la fibra de l'Ad2. Adaptat de (Zhang and Bergelson, 2005).

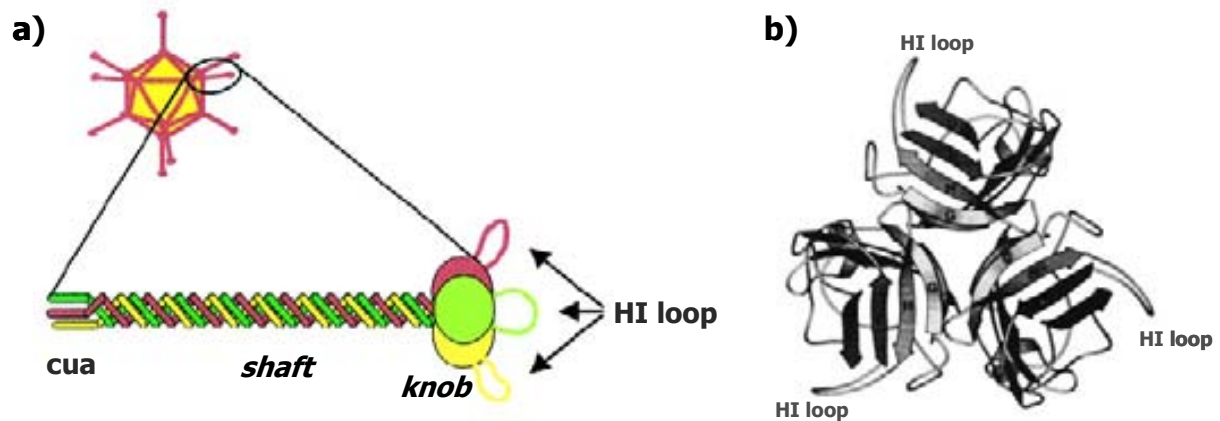
Els adenovirus presenten una capsida proteica externa protegint el cor nucleoproteic intern (Majhen and Ambriovic-Ristov, 2006; McConnell and Imperiale, 2004). La capsida icosaèdrica està formada per tres proteïnes majoritàries: hexó (pII), base del pentó (pIII) i fibra (pIV) i per les proteïnes minoritàries pVI, pVIII, pIX, pIIIa i pIVa2. En el cor nucleoproteic hi trobem la doble cadena de DNA lineal amb les proteïnes pV i Mu (figura I.10).



**Figura I.10.- Proteïnes estructurals de l'adenovirus.** Secció d'una partícula adenoviral, la localització dels components de la capsida estan ben definits, en canvi, la disposició dels components del cor nucleoproteic són conjecturals. Adaptat de (Russell, 2000).

La càpside de l'Ad està formada per 252 subunitats anomenades capsòmers: 240 hexons i 12 pentons. Els hexons estan formats per trímers de la proteïna majoritària II (pII), associades a l'hexó es troben les proteïnes pVI, pVIII i pIX que són minoritàries i juguen un paper important en l'estabilització i l'acoblament de les partícules virals. L'estructura del pentó és més complexa: la base del pentó (que està formada per un pentàmer de la proteïna pIII) actua com a ancoratge de la fibra (pIV) que és la principal responsable de la unió dels virions a la superfície cel·lular (Rux and Burnett, 2004). La fibra és un homotrímer de tres polipèptids orientats de forma paral·lela (Stouten et al., 1992) i conté tres dominis funcionals i estructurals diferents (figura I.11 a)):

- a) Un **domini amino terminal** (N-terminal) que de forma no covalent uneix la fibra a la base del pentó, que s'anomena **tail** o **cua**.
- b) El domini que s'anomena **shaft**, la llargada del qual és diferent segons el serotip al que pertany el virus (Green et al., 1983). Està format per repeticions de 15 aminoàcids, essent variable el número de repeticions entre els diferents isotips. El número de repeticions determina la longitud de la fibra i per tant la distància entre el domini *knob* i la proteïna de la base del pentó. En el *shaft* de la fibra de l'Ad5 s'han descrit dos dominis de flexibilitat; un en les darreres repeticions del *shaft* que permet la flexibilitat del domini *knob*, i l'altre, en la tercera repetició del *shaft* que permet el plegament de la fibra. Tant la longitud (Shayakhmetov and Lieber, 2000) com la flexibilitat del domini *shaft* (Wu et al., 2003) tenen un paper clau en l'entrada de l'Ad5 a la cèl·lula hoste.
- c) Un **domini carboxi terminal** (C-terminal) que forma el **Knob** i que és responsable de la unió del virió al receptor cel·lular (Xia et al., 1994). Presenta una estructura globular formada per un conjunt de làmines  $\beta$  connectades per llaços (*loops*) d'extensions variables. En aquest treball, les seqüències heptapeptídiques seleccionades de la llibreria de *Phage Display* Ph.D.-C7C s'han introduït en un d'aquests *loops*, concretament en l'**HI loop**. Tal i com es mostra en la figura I.11 b), en el *knob* de la fibra de l'Ad5 es troben 3 HI loops exposats a l'exterior del *knob* que connecten les làmines  $\beta$  H i I (Krasnykh et al., 1998). Estudis mutacionals dels loops AB, DE o FG del *knob* de la fibra han demostrat l'abolició de la interacció de la fibra amb el receptor cel·lular majoritari CAR (Bewley et al., 1999; Kirby et al., 1999; Roelvink et al., 1999).

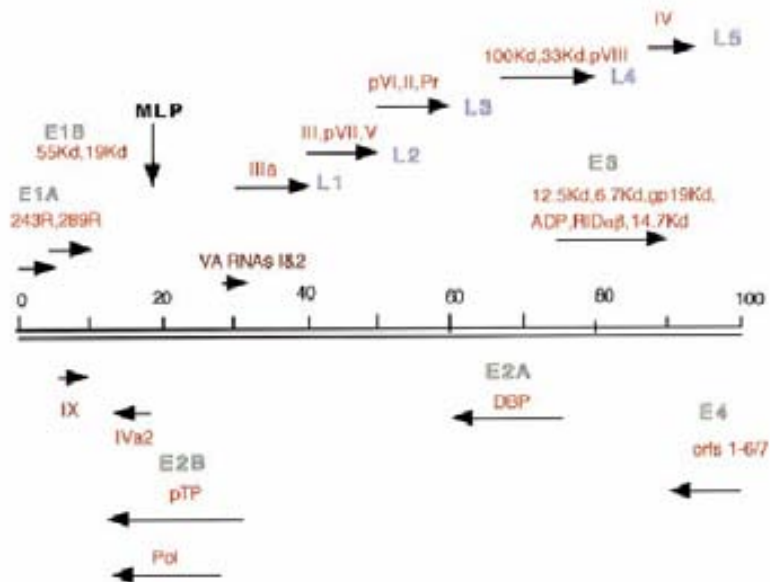


**Figura 1.11.- Estructura de la fibra de l'adenovirus i del seu domini Knob.** (a) La proteïna de la fibra és una molècula homotrimèrica formada per tres dominis estructurals: el N-terminal (*tail*), el *shaft*, i el C-terminal (*knob*). Adaptat de (Krasnykh et al., 2000). (b) Model tridimensional del *knob* de la fibra de l'Ad5. L'HI loop, exposat a l'exterior del *knob*, connecta les làmines  $\beta$  H i I. Adaptat de (Krasnykh et al., 1998).

En el cor nucleoproteic hi trobem la molècula de DNA lineal de doble cadena de 36Kb flanquejada per Repeticions Terminals Invertides (ITRs) de 100-140pb que actuen com a elements *cis* durant la replicació del genoma viral. En les ITRs s'hi uneixen de forma covalent la Proteïna Terminal (TP) que serveix com a encebador iniciador de la replicació del genoma viral. A part de la molècula de DNA, el cor nucleoproteic conté les proteïnes pV, pVI, Mu i pVII (*Histone-like*) (Rux and Burnett, 2004).

A més a més, els adenovirus contenen aproximadament 10 còpies de la proteasa de l'adenovirus, una endopeptidasa de cisteïnes que promou el desacoblament de les proteïnes estructurals en l'endosoma i que a la fase final de l'acoblament viral participa en el processament de la majoria de les preproteïnes estructurals a la seva forma madura (McConnell and Imperiale, 2004).

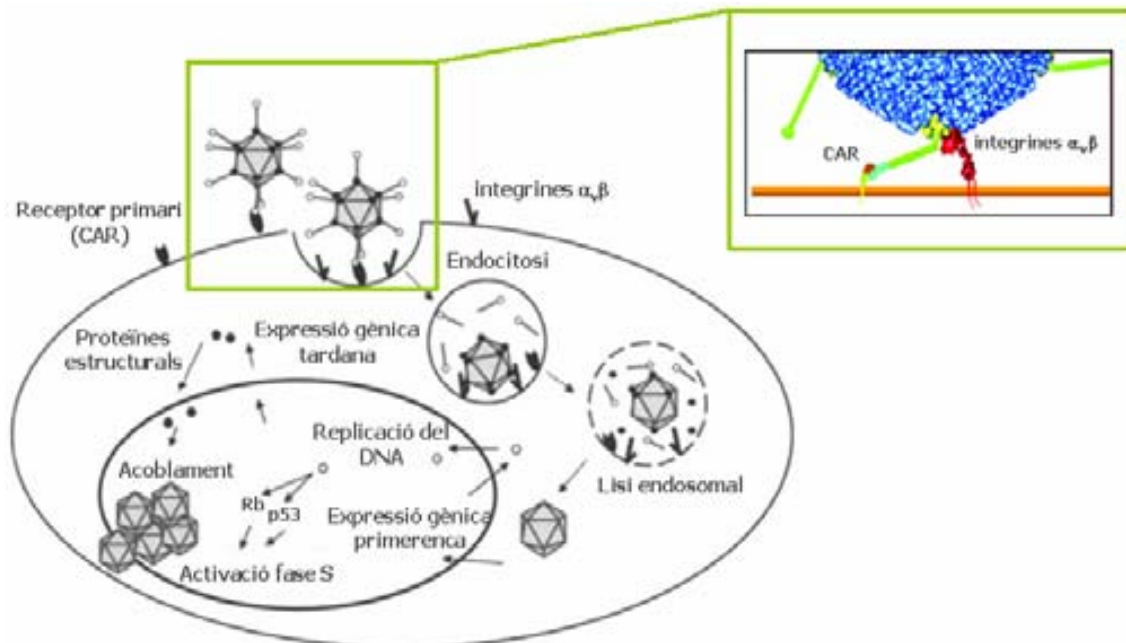
En el genoma de l'Ad (figura I.11), els gens estan codificats en les dues cadenes de la molècula en una sèrie d'unitats de transcripció superposades: 5 de transcripció primerenca (E1A, E1B, E2, E3 i E4), 4 de transcripció intermitja (Iva2, IX, VAI i VAII) i una de transcripció tardana sota control del promotor tardà o *Major Late Promoter* (MLP). A partir de la unitat de transcripció tardana per processament alternatiu d'una única molècula d'RNA es generen cinc famílies de RNA tardà (L1-L5) que donaran lloc a totes les proteïnes estructurals (Majhen and Ambriovic-Ristov, 2006; McConnell and Imperiale, 2004).



**Figura I.12.- Transcripció del genoma de l'adenovirus.** Les unitats de transcripció primerenca estan marcades en verd i les unitats de transcripció tardanes en blau. Les fletxes indiquen la direcció de la transcripció (Russell, 2000).

### 7.2.- Infecció cel·lular, replicació i transcripció del genoma viral.

L'entrada dels adenovirus a les cèl·lules, tal i com s'ha definit en experiments *in vitro*, normalment consisteix en un primer pas on el virus s'uneix al receptor primari seguit per la interacció amb un receptor secundari responsable de la internalització del virus (figura I.13) (Zhang and Bergelson, 2005).



**Figura I.13.- Cicle infectiu de l'adenovirus.** L'entrada a la cèl·lula s'inicia per la unió d'elevada afinitat de la *knob* de la fibra amb el seu receptor primari (en aquest cas CAR), seguida per la internalització del virus mediada per la interacció amb el receptor secundari (en aquest cas les integrines  $\alpha_v\beta$ ). Adaptat de (Kanerva and Hemminki, 2004). En el recuadre en verd es mostra una ampliació de la interacció amb els dos receptors. Adaptat de (Zhang and Bergelson, 2005).

El receptor primari responsable de la unió de l'Ad5 a la superfície cel·lular més ben estudiat és el *Coxsackie-Adenovirus Receptor* (CAR) (Bergelson et al., 1997). S'han descrit altres possibles receptors primaris per aquesta unió com el Complexe Major d'Histocompatibilitat I (MHC-I) (Hong et al., 1997) i els Heparan Sulfat Glicosaminoglicans (Dehecchi et al., 2000), tot i així, la correlació existent entre els nivells d'infecció i els d'expressió de CAR a la cèl·lula (Curiel, 1999) confirma el paper d'aquest receptor en la unió de l'Ad5 a la superfície cel·lular. CAR pertany a la superfamília de les immunoglobulines, media les adhesions cel·lulars homotípiques i està present en unions intracel·lulars especialitzades com el disc intercalat cardíac (Zhang and Bergelson, 2005). Tot i que la distribució tissular de CAR en humans no està ben definida, s'ha trobat el seu mRNA en diversos òrgans, incloent cor, cervell, ronyó, intestí, pulmó, fetge i ronyó (Zhang and Bergelson, 2005). En els ratolins s'ha identificat el receptor CAR homòleg a l'humà, aquest també és receptor pels adenovirus humans però presenta un patró d'expressió diferent a l'humà; observant-se els nivells més alts d'expressió al fetge i relativament elevats al cor, als pulmons i als ronyons (Bergelson et al., 1998).

La unió de l'Ad a CAR és d'elevada afinitat i es produeix a través del domini C-terminal *knob* (Xia et al., 1994) i concretament a la cara lateral del domini *knob* (Roelvink et al., 1999). A continuació es produeix la internalització de l'Ad a la cèl·lula per endocitosi via vesícules de clatrina (Meier and Greber, 2004), mediada a través de la interacció de baixa afinitat del motiu Arg-Gly-Asp (RGD), localitzat a la base del pentó, amb els membres de la família d'integrines  $\alpha_v\beta$  (Wickham et al., 1993). Després del desacoblament del virus dins els endosomes i en el cas de l'Ad2 i l'Ad5 el pH àcid induïx la sortida dels virions de l'endosoma (McConnell and Imperiale, 2004), el genoma viral és transportat al nucli, a través d'un mecanisme mediat per microtúbuls, on s'uneix al *Nuclear Pore Complex* (NPC). El desacoblament de la càpsida al NPC permet la importació del genoma viral al nucli i el començament del programa de transcripció viral (McConnell and Imperiale, 2004).

La primera unitat de transcripció viral que s'expressa és E1A, produint-se múltiples productes de mRNA i proteïnes per processament de mRNA diferencial. Els dos transcrits d'E1A que es produeixen en la infecció primerenca són un mRNA de 13S que codifica per la proteïna 289R (on R equival a residus aminoacídics) i un de 12S que codifica per la proteïna 243R. Durant la infecció, les proteïnes E1A actuen com a transactivadores de la resta de les unitats de transcripció primerenques i induïxen l'entrada a la fase S de la cèl·lula infectada (interaccionant amb proteïnes com Rb), creant així l'ambient òptim per a la replicació de l'Ad. La desregulació del cicle cel·lular induïda per E1A promou l'apoptosi i són les proteïnes



codificades en la unitat de transcripció E1B les que s'encarreguen de mantenir la supervivència cel·lular en unir-se directament a p53, Bax i Bak. La regió E2 codifica per les proteïnes necessàries per a la replicació del genoma viral, concretament per la DNA polimerasa, la proteïna preterminal i la proteïna de 72KDa d'unió a DNA de cadena senzilla. Tot i que l'Ad es replica al nucli necessita la seva pròpia maquinària enzimàtica degut a la seva estructura cromosomal, ja que no té telòmers. La replicació del genoma succeeix per un sistema de desplaçament de cadena mediat per la proteïna de 72KDa i la DNA polimerasa. Els productes de la regió E3 debiliten la resposta immunològica de l'hoste permetent la persistència de les cèl·lules infectades i la regió E4 codifica per proteïnes que s'han vist involucrades en el control del cicle cel·lular i en la transformació cel·lular -revisat a (McConnell and Imperiale, 2004)-.

Com ja s'ha comentat anteriorment, els gens d'expressió tardana són transcrits en forma d'un precursor i codifiquen per les proteïnes estructurals de la càpside i per altres proteïnes involucrades en l'acoblament del virus. Tot i que l'acoblament succeeix al nucli, la trimerització de l'hexó comença al citoplasma. Els trímers d'hexó es transloquen al nucli on s'associen a la base del pentó i a les proteïnes minoritàries de la càpside formant l'esquelet proteic. El DNA viral s'introdueix en aquest esquelet proteic amb la intervenció del senyal empaquetador i de les proteïnes que s'uneixen al DNA. Una vegada ha succeït l'acoblament i l'empaquetament del DNA, la proteasa de l'adenovirus processa una sèrie de proteïnes estructurals a la seva forma madura, produint finalment els virus infectius. La lisi cel·lular i l'alliberament de la progènie succeeix aproximadament 30 hores després de la infecció en un procés on hi participa la proteïna E3-11,6K també anomenada *Adenovirus Death Protein* (ADP), que tot i pertànyer a la regió E3, tan sols es produeix a la fase tardana i sota el control del promotor MLP enlloc del promotor E3 -revisat a (McConnell and Imperiale, 2004)-.

### **7.3.- Els vectors adenovirals.**

Els Ads han estat extensament usats com a vectors per teràpia gènica atès que poden infectar una àmplia varietat de teixits i cèl·lules (tant quiescents com en divisió) sense incorporar el seu genoma al de la cèl·lula hoste, la seva preparació i producció són relativament fàcils, els nivells de transferència del transgen són elevats comparats amb altres vectors, presenten baixa patogenicitat en humans i poden transportar fragments de DNA relativament grans. Actualment els adenovirus són les vectors més usats en teràpia gènica, atès que un 25% dels assajos clínics en funcionament utilitzen vectors adenovirals

(*Gene Therapy Clinical Trials Worldwide*, <http://www.wiley.co.uk/genetherapy/clinical/>). Concretament, en el cas de càncer de pròstata, s'han utilitzat tant vectors adenovirals deficients en replicació (Herman et al., 1999; Trudel et al., 2003) com vectors adenovirals condicionalment replicatius (CRAbs) (Freytag et al., 2002; Freytag et al., 2003). Tot i així, aquests virus també presenten limitacions per a ser usats com a vectors, fet que ha portat a intensos estudis per tal de millorar-los.

Una de les limitacions és que són immunogènics. La seva replicació activa la resposta immunitària cel·lular que eliminarà les cèl·lules infectades. Amb la finalitat de millorar el temps d'expressió del transgen després de l'administració del vector, s'han desenvolupat diferents generacions de vectors adenovirals mitjançant delecions de parts del seu genoma reduint la capacitat de replicació del vector i per tant, també, l'eliminació de les cèl·lules transduïdes per part del sistema immunitari de l'hoste (McConnell and Imperiale, 2004).

Els vectors de primera generació presenten els cassets d'expressió E1 i/o E3 delecionats, permetent la introducció de 8,2Kb de DNA (McConnell and Imperiale, 2004). Els vectors amb la regió E1 delecionada presenten una capacitat de replicació disminuïda, essent necessària per a la seva producció línies cel·lulars amb aquesta funció en *trans*. La més utilitzada ha estat la línia cel·lular derivada de ronyó embrionari humà HEK293 transformada amb un fragment de 4,5Kb de l'extrem esquerre del genoma de l'Ad5 incloent el gen E1A (Graham et al., 1977). Amb la delecio de la regió E3 s'obté espai addicional per a la introducció de DNA. Aquests vectors presenten dues limitacions importants: la primera és que durant la seva producció i mitjançant la recombinació entre la regió E1A de la línia empaquetadora i el genoma viral es poden obtenir contaminacions de virus competents en replicació (Lochmuller et al., 1994), la segona, i més important, és l'estimulació de la resposta immunològica cel·lular, segurament deguda a les baixes taxes de replicació que es donen fins i tot en absència de la regió E1A, i la conseqüent destrucció de les cèl·lules infectades (Majhen and Ambriovic-Ristov, 2006; McConnell and Imperiale, 2004). Tot i presentar problemes, poden ser útils en aplicacions que requereixin temps curts d'expressió.

Els vectors de segona i tercera generació presenten les regions E1 i/o E3, E2 i E4 delecionades, són menys immunogènics que els de primera generació i permeten la inserció de fragments de DNA majors (Majhen and Ambriovic-Ristov, 2006; McConnell and Imperiale, 2004). L'aproximació més prometedora per assolir expressions a temps llargs sense els efectes deguts a la presència de gens virals són els *Helper-dependent* o *gutless vectors*. En aquest cas, s'han eliminat tots els gens virals estructurals i només es mantenen

les dues ITRs i la senyal d'empaquetament, podent transportar 37Kb de DNA (Majhen and Ambriovic-Ristov, 2006; McConnell and Imperiale, 2004).

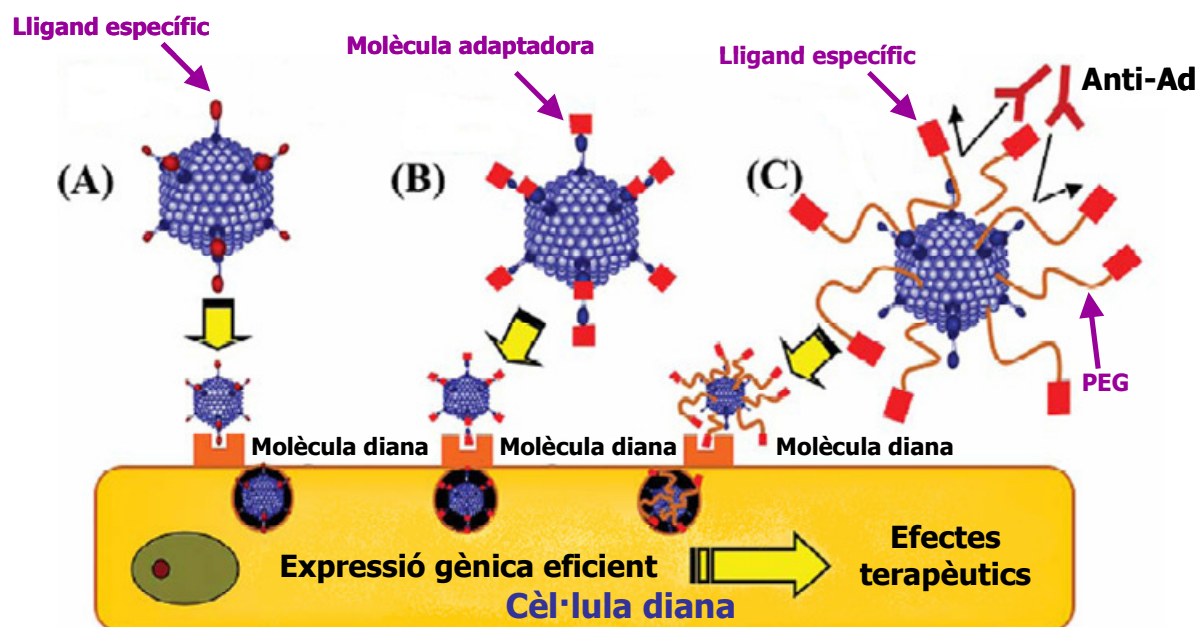
Un altre tipus de vectors adenovirals són aquells dissenyats per matar de forma selectiva el teixit d'interès, anomenats oncolítics o condicionalment replicatius (CRAds) (McConnell and Imperiale, 2004). Aquests es modifiquen genèticament per tal d'aprofitar els canvis específics tumorals, permetent tan sols la seva replicació en les cèl·lules tumorals. L'ús d'aquests CRAds té el benefici addicional de l'amplificació local, procés que continua durant tot el temps que hi hagi cèl·lules tumorals (Majhen and Ambriovic-Ristov, 2006). Per tant, al contrari que els vectors adenovirals anteriorment descrits, el CRAd no és tan sols el vehicle per a la transferència gènica, sinó que actua com a agent terapèutic. Es poden distingir dos tipus de CRAds: els que presenten la regió E1 mutada o delecionada i els que presenten la regió E1 sota el control d'un promotor tumor específic. Per tal d'augmentar l'efecte oncolíctic, aquests vectors adenovirals poden portar gens que codifiquen per citoquines o per enzims dels sistemes enzim/prodroga comentats anteriorment (Majhen and Ambriovic-Ristov, 2006). Dos exemples de CRAds són l'ONYX-015 que presenta dues mutacions en el gen que codifica per la proteïna que s'uneix a p53 per inhibir l'apoptosi de la cèl·lula infectada (E1B de 55KDa) i l'Ad5-Δ24 que presenta una regió de 24 pb d'E1A delecionada responsable de la unió a Rb (Majhen and Ambriovic-Ristov, 2006).

El problema més important de qualsevol tipus de vector per ser utilitzat en la teràpia gènica contra el càncer és la capacitat de distingir les cèl·lules normals de les tumorals (Majhen and Ambriovic-Ristov, 2006). Concretament, en el cas dels adenovirus, el fet que presentin un extens tropisme suposa, alhora que un avantatge, una important limitació pel seu ús en teràpia gènica ja que augmenta les possibilitats de transferència del transgen a cèl·lules no diana. Per això, ha estat de gran interès l'estudi del direccionament específic de l'expressió del transgen a les cèl·lules diana. Aquest es pot realitzar a dos nivells: a nivell transcripcional i/o a nivell transduccional (Rots et al., 2003). El direccionament transcripcional consisteix en l'expressió restringida del transgen mitjançant el seu control per promotors específics de tumor o de teixit (Rots et al., 2003). A continuació es comenta més extensament el direccionament transduccional, ja que ha estat el realitzat en aquest treball.

## 8.- DIRECCIONAMENT TRANSDUCCIONAL DELS VECTORS ADENOVIRALS.

Mitjançant el direccionament transduccional dels vectors, s'aconseguiria la transferència del transgen específicament a les cèl·lules diana, reduint la immunogenicitat i toxicitat d'aquests, augmentant la seguretat de la teràpia i finalment permetent l'administració sistèmica dels vectors. Aquesta última suposaria un gran impacte en la teràpia gènica del càncer, ja que actualment la majoria dels assajos clínics es basen en la injecció intratumoral dels vectors. La injecció intratumoral limita la teràpia a tumors localitzats essent ineficaç pel tractament de les metàstasis. A més a més, la injecció intratumoral és ineficient, degut a que normalment el vector no difon a través de tot el tumor dificultant la transducció de la majoria de cèl·lules que el formen (Wickham, 2000).

Per tal d'obtenir un vector adenoviral dirigit específicament a un tipus de cèl·lula o teixit, degut a l'expressió ubiqua del seu receptor primari CAR, són necessàries 1) l'eliminació de les interaccions amb CAR i 2) el redireccionament del vector a un nou receptor (Kanerva and Hemminki, 2004; Wickham, 2000). Per a aquesta finalitat, s'han utilitzat diferents estratègies que es poden agrupar en: l'ús de molècules adaptadores, la modificació química mitjançant polímers i la modificació genètica de la càpside de l'Ad (figura I.14). A continuació es comenten les dues primeres estratègies, la tercera, atès que ha estat l'objecte d'aquest treball, es comenta més extensament en el següent apartat.



**Figura I.14.- Estratègies pel direccionament transduccional de vectors adenovirals.** (A) Modificació genètica de la càpside viral. (B) Modificació mitjançant molècules adaptadores. (C) Modificació química mitjançant polímers amb lligands. Adaptat de (Mizuguchi and Hayakawa, 2004).

### **8.1.- Modificació mitjançant molècules adaptadores.**

Aquesta estratègia es basa en l'ús de molècules adaptadores biespecífiques o bifuncionals que bloquegen la interacció de la fibra amb CAR i rediriguen el vector a un nou receptor (figura I.14 B)).

A la literatura s'han descrit diferents tipus de molècules adaptadores segons el fragment utilitzat pel bloqueig de la interacció amb CAR i el fragment que redirigeix el vector a les cèl·lules diana. Conjugats entre el fragment Fab d'un anticòs monoclonal antifibra i el folat van dirigir la infecció del vector adenoviral via el receptor del folat. Aquest receptor es troba altament expressat en diferents tipus de cèl·lules tumorals (Douglas et al., 1996). Altres treballs han descrit aquesta estratègia utilitzant diferents molècules pel redirigiment del vector adenoviral. Alguns exemples són: el factor de creixement de fibroblastes (FGF) (Goldman et al., 1997), el factor de creixement epidèrmic (EGF) (Miller et al., 1998) i un fragment anti-CD40 (Tillman et al., 1999).

En alguns casos s'han construït proteïnes de fusió amb una forma soluble de CAR (sCAR) (Dmitriev et al., 2000; Itoh et al., 2003). Treballs utilitzant la proteïna de fusió sCAR-EGF van demostrar redirigiment de vectors adenovirals a cèl·lules que expressaven el receptor d'EGF per una via alternativa de CAR (Dmitriev et al., 2000). Un altre exemple és la proteïna de fusió sCAR-SCF (factor de *stem cells*) (Itoh et al., 2003) amb la que es van obtenir augments d'infecció de cèl·lules hematopoètiques depenent dels nivells d'expressió de c-Kit.

El principal avantatge d'aquesta estratègia és l'abolició del tropisme natural de l'adenovirus, però degut a que els complexos entre el vector i les molècules adaptadores no són uniformes, es poden produir variacions entre diferents preparacions del vector (Kanerva and Hemminki, 2004; Mizuguchi and Hayakawa, 2004). A més a més, no es coneix l'estabilitat dels complexos en humans (Kanerva and Hemminki, 2004) suposant una limitació per a la seva aplicació a la clínica.

### **8.2.- Modificació mitjançant polímers.**

Molts autors, basant-se en l'ús del PEG (polietilenglicol) per a l'augment de la persistència en sang de proteïnes i preparacions farmacèutiques, han modificat químicament vectors adenovirals amb aquest polímer (Mizuguchi and Hayakawa, 2004).

El PEG reacciona amb els extrems N-terminal dels residus de Lys de l'hexó, la fibra i de la base del pentó. Vectors adenovirals modificats amb aquesta estratègia han demostrat un augment de persistència en sang i una disminució de la seva neutralització per anticossos preexistents (Croyle et al., 2001; Croyle, Yu, and Wilson, 2000; O'Riordan et al., 1999). A més a més, els Ads PEGilats presenten una disminució en la seva capacitat d'infectar les cèl·lules presentadores d'antígens, produint-se una disminució de les respostes immunitàries humorals i cel·lulars, resultant en un augment d'expressió del transgen després de la readministració del vector (Croyle et al., 2001; Oyama et al., 2003).

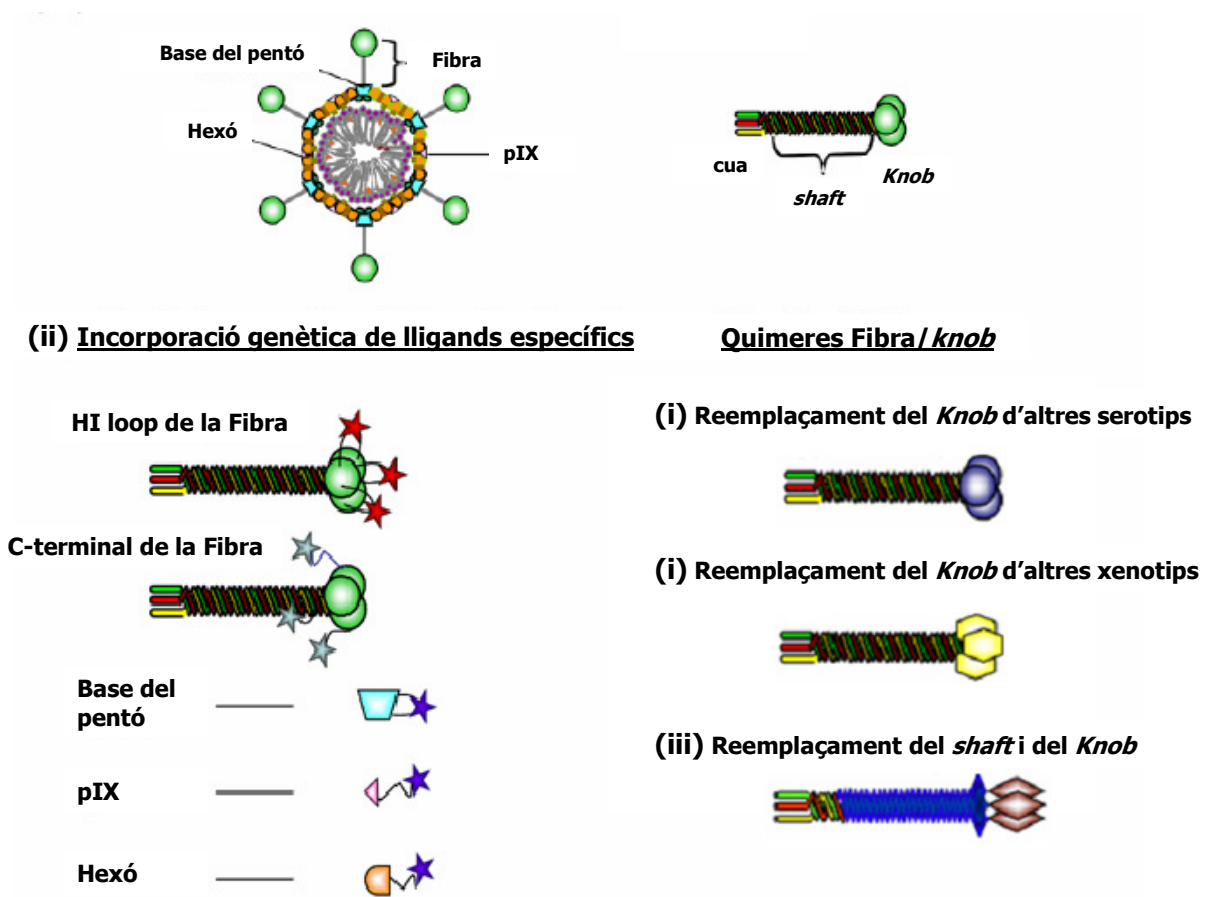
La modificació amb PEG, però, ha demostrat una disminució de la capacitat infectiva dels vectors modificats. Per tal de solucionar-ho i direccionar la transducció d'aquests vectors s'han unit molècules bifuncionals al PEG (figura I.14 C)). Adenovirus PEGilats als que s'hi va unir el bFGF van demostrar un augment en la infecció de tumors via el receptor d'aquest i independent de CAR en un model de càncer d'ovari (Lanciotti et al., 2003). Altres autors han utilitzat el pèptid RGD pel direccionament d'aquest tipus de vectors modificats (Eto et al., 2005; Ogawara et al., 2004).

A més a més del PEG, s'han descrit altres polímers per a la modificació dels vectors adenovirals. La utilització del polímer poly[N-(2-hydroxypropyl)methacrilamide] (pHPMA) per a aquesta finalitat va resultar en vectors amb un augment de la seva persistència a plasma, una disminució de la seva toxicitat i en la capacitat d'evadir-se dels anticossos neutralitzants (Fisher et al., 2001). La incorporació del pèptid derivat de la laminina SIKVAV en un adenovirus modificat amb pHPMA va demostrar la infecció d'aquest via les integrines  $\alpha_6\beta_1$  en experiments *in vitro* (Stevenson et al., 2007).

### **9.- MODIFICACIÓ GENÈTICA DE LA CÀPSIDE DE L'Ad5. INCORPORACIÓ DE LLIGANDS ESPECÍFICS.**

El direccionament genètic dels vectors adenovirals (figura I.14 A)) consisteix en la introducció de lligands que reconeixen específicament diferents receptors cel·lulars i/o l'eliminació del tropisme natural d'aquest virus (Majhen and Ambriovic-Ristov, 2006). A la literatura s'han definit diferents estratègies per a aquesta finalitat, totes basades en la manipulació del genoma viral per tal de modificar proteïnes de la càpside de l'adenovirus (Noureddini and Curiel, 2005). En la figura I.15 es mostren les possibles modificacions genètiques de les proteïnes de la càpside de l'adenovirus. Aquestes modificacions es poden realitzar reemplaçant genèticament el domini *knob* de l'Ad5 pel domini *knob* d'altres serotips

o xenotips (figura I.15(i)), o per incorporació genètica de lligands específics a les proteïnes de la càpside de l'adenovirus (figura I.15(ii)) i finalment reemplaçant la fibra o el domini *knob* de l'Ad5 per altres molècules específiques de tumor (figura I.15(iii)) (Mathis, Stoff-Khalili, and Curiel, 2005). En aquest treball hem incorporat les seqüències peptídiques seleccionades de la llibreria de *Phage Display* Ph.D.-C7C a l'HI loop de la fibra de l'Ad5, per aquest motiu, en aquest apartat es parlarà de les modificacions genètiques mitjançant la incorporació de lligands a les proteïnes de la càpside de l'Ad5 (figura I.15 (ii)).



**Figura 1.15. Estratègies de modificació genètica de les proteïnes de la càpside de l'adenovirus.** Aquestes modificacions es poden realitzar reemplaçant genèticament el domini *knob* de l'Ad5 pel domini *knob* d'altres serotips o xenotips (i), o per incorporació genètica de lligands específics a les proteïnes de la càpside de l'adenovirus (ii) i finalment reemplaçant la fibra o el domini *knob* de l'Ad5 per altres molècules específiques de tumor (iii). Adaptat de (Mathis, Stoff-Khalili, and Curiel, 2005).

### 9.1.- Incorporació de lligands específics a la fibra de l'Ad5.

Aquesta estratègia ha estat molt utilitzada degut a què la fibra és el determinant principal del tropisme de l'Ad. Una de les primeres localitzacions utilitzades va ser **l'extrem C-terminal de la fibra**. Vectors adenovirals amb la incorporació en aquesta posició de motius de poli-Lys (pèptid [K<sub>7</sub>]) i del pèptid RGD, que són reconeguts pels heparan sulfats i les integrines respectivament (Wickham et al., 1997; Wu et al., 2002), van demostrar un augment en els seus nivells de transducció a diferents línies cel·lulars refractàries a ser

transduïdes per vectors adenovirals. La incorporació d'un pèptid de 12Aa que mimetitzava la transferrina en aquesta posició va demostrar el direccionament del virus al receptor de la transferrina en cèl·lules neurogials (Joung et al., 2005). La principal limitació d'aquesta localització és la mida del lligand incorporat. S'ha descrit que l'addició de més de 27Aa al C-terminal de la fibra afecta negativament a l'estabilitat del trímer (Hong and Engler, 1996), a més a més, l'obtenció de l'estructura tridimensional de la fibra (Xia et al., 1994) va demostrar que el C-terminal està dirigit cap al virió i no cap a la superfície cel·lular, fet que confirma que aquesta no és una de les millors localitzacions possibles (Dmitriev et al., 1998).

Així doncs, una localització òptima per a la introducció de lligands a la càpside de l'Ad seria aquella que permetés l'exposició del lligand a la superfície cel·lular sense afectar l'estructura quaternària de la fibra (Krasnykh et al., 1998). El model tridimensional de la fibra proposat per Xia et al. (Xia et al., 1994) va demostrar que **l'HI loop** presentava aquestes característiques, convertint-lo en una alternativa per a la incorporació de lligands. La incorporació d'una nova seqüència a l'HI loop no afecta a la trimerització de la fibra ja que aquest no participa en les interaccions intramoleculares del *Knob*. Degut a què la majoria dels seus residus són hidrofílics, aquest es troba exposat a l'exterior del *Knob* demostrant un elevat grau de flexibilitat. Una altra característica que el reafirma com un candidat alternatiu és el fet que els diferents serotips d'Ad presenten diferents llargàries de l'HI loop. Finalment, l'HI loop no es troba involucrat en la formació del lloc d'unió a la superfície cel·lular (Krasnykh et al., 1998).

Krasnykh et al., mitjançant la introducció del pèptid FLAG (DYKDDDDK) entre els residus DTT i PSAY de l'HI loop de fibres produïdes *in vitro*, van demostrar que els pèptids inserits en aquesta posició es trobaven exposats a la superfície, ja que el pèptid FLAG era reconegut per l'anticòs anti-FLAG i per tant mantenia la capacitat d'unir-se al seu receptor. A més a més, aquesta fibra modificada era capaç d'unir-se a cèl·lules CAR positives, indicant el manteniment de les funcions estructurals i de reconeixement dels receptors de la fibra. Tot i això, calia comprovar que la incorporació de seqüències peptídiques en aquesta posició no afectava al procés de generació de l'adenovirus recombinant, fet que es va demostrar en aquest mateix treball alhora que es va demostrar que l'adenovirus recombinant mantenia l'entrada a la cèl·lula via CAR i que el pèptid FLAG mantenia el reconeixement pel seu anticòs (Krasnykh et al., 1998). Aquests resultats indicaven que l'HI loop era una bona localització per a lligands específics. Posteriorment, el mateix grup d'investigadors va introduir el pèptid CDCRGDCFC (o RGD-4C) -identificat per *in vivo phage biopanning* i que



s'uneix de forma específica a dominis extracel·lulars de diferents integrines (Pasqualini and Ruoslahti, 1996)- en aquesta mateixa posició, els adenovirus recombinants presentaven la capacitat d'infectar cèl·lules en absència de CAR usant com a receptor alternatiu les integrines, a més a més d'un augment de fins a 2 o 3 ordres de magnitud dels nivells de transducció de diferents línies tumorals humanes de càncer d'ovari (Dmitriev et al., 1998). L'administració sistèmica d'aquest vector recombinant va presentar un patró de biodistribució *in vivo* diferencial respecte a l'Ad5 amb les fibres sense modificar, demostrant que el pèptid no quedava emmascarat per components sèrics (Reynolds, Dmitriev, and Curiel, 1999). *Mizuguchi et al.* van demostrar que adenovirus recombinants expressant les seqüències peptídiques RGD o NGR -que reconeix l'aminopeptidasa N (Pasqualini et al., 2000)- presentaven un augment de la infecció de cèl·lules humanes de glioma de 100-1000 vegades la de l'adenovirus amb les fibres sense modificar (Mizuguchi et al., 2001). A més a més, s'ha descrit la incorporació de fins a 100 aminoàcids a l'HI loop sense afectar la fibra i la integritat del virió (Belousova et al., 2002).

Aquests treballs confirmen que l'HI loop representa una clara alternativa pel direccionament de vectors adenovirals, fet que ha portat a altres autors a la incorporació de diferents lligands en aquesta posició (Nicklin et al., 2003; Nicklin et al., 2001; Nicklin et al., 2004; Rittner et al., 2007; Xia et al., 2000).

## **9.2.- Incorporació de lligands específics a altres proteïnes de la càpside.**

Altres proteïnes de la càpside han estat utilitzades pel direccionament transduccional de vectors adenovirals mitjançant la incorporació de lligands específics. Aquestes són: **l'hexó, la base del pentó i la proteïna pIX.**

Tot i que **l'hexó** no participa en les interaccions de l'adenovirus amb la cèl·lula, presenta l'atractiu que es troba en gran abundància en la càpside del virus. S'ha descrit que la incorporació del lligand RGD a la regió hipervariable 5 (HV5) de l'hexó va resultar en un augment dels nivells de transducció de cèl·lules  $\alpha_v$  positives (Vigne et al., 1999).

Atès que en determinats serotips d'adenovirus s'ha demostrat que la interacció de la **base del pentó** amb les integrines cel·lulars pot iniciar directament la transducció (Huang et al., 1996; Roelvink, Kovesdi, and Wickham, 1996), alguns autors han optat per incorporar-hi lligands específics demostrant que es mantenia la integritat estructural del virió i que el pèptid era funcional (Einfeld et al., 1999).

La **proteïna pIX** estabilitza les interaccions entre els hexons contribuint a la integritat del virió (Furcinitti, van Oostrum, and Burnett, 1989) i presenta el seu extrem C-terminal exposat a la superfície de la càpside (Akalu et al., 1999), esdevenint un lloc alternatiu per la incorporació de lligands, com per exemple, el motiu poli-Lys que va resultar en el direccionament del tropisme del vector als heparan sulfats de la superfície cel·lular (Dmitriev, Kashentseva, and Curiel, 2002) i el motiu RGD (Vellinga et al., 2004). A més a més, és possible la incorporació de pèptids grans (Le et al., 2004; Meulenbroek et al., 2004), essent de gran interès per a molts investigadors.

Recentment, s'han publicat dos treballs en què es comparen els efectes en els nivells de transducció d'un mateix lligand segons la proteïna de la càpside on s'incorpora. Ambdós treballs han demostrat que la modificació de la fibra és la més eficient pel direccionament del vector adenoviral (Campos and Barry, 2006) i concretament la modificació de l'HI loop (Kurachi et al., 2007)

### **10.- ADMINISTRACIÓ SISTÈMICA DE VECTORS ADENOVIRALS.**

Les modificacions del vector mitjançant la incorporació de lligands a la càpside de l'Ad suposa una millora en la transducció de cèl·lules CAR negatives i positives pel receptor del lligand, però degut a l'expressió del receptor primari CAR en una gran varietat de cèl·lules i teixits, és important considerar que si no s'elimina el tropisme natural del virus aquest vector presentarà un tropisme expandit però no restringit, fet que tindrà repercussions en la seva posterior aplicació a la clínica (Noureddini and Curiel, 2005; Wickham, 2000). L'administració sistèmica d'un vector adenoviral al qual no se li ha eliminat el tropisme natural resulta en l'acumulació d'aquest a fetge, melsa, cor, pulmons i ronyó, tot i que aquests teixits no són necessàriament els que tenen una expressió de CAR més elevada. Segurament, el flux sanguini i l'estructura de la vasculatura de cada òrgan contribueixen a la biodistribució del vector. Un altre fet a tenir en compte és el paper que tenen els macròfags de teixit, com per exemple les cèl·lules de Kupffer del fetge, en l'eliminació del vector del torrent sanguini (Kanerva and Hemminki, 2004).

Tot això porta a pensar que per a obtenir un vector adenoviral realment dirigit a les cèl·lules i teixits diana pel seu ús a la clínica, no només són necessàries les modificacions relatives a la incorporació del lligand específic sinó també aquelles que es troben implicades en el tropisme natural del vector.

Degut a què CAR és el receptor primari de l'Ad, els primers treballs es van centrar en l'eliminació d'aquest reconeixement. Mutacions en els loops del *knob* de la fibra AB, DE o FG redueixen l'eficiència de transducció *in vitro* de cèl·lules CAR positives (Bewley et al., 1999; Kirby et al., 1999; Roelvink et al., 1999). Altres autors han eliminat la interacció entre la base del pentó i les integrines (Mizuguchi et al., 2002). L'eliminació de només una d'aquestes interaccions no va suposar canvis en la biodistribució del vector (Alemany and Curiel, 2001; Leissner et al., 2001; Mizuguchi et al., 2002). El següent pas va ser l'eliminació d'ambdues interaccions. Treballs en aquest camp han donat resultats contradictoris, obtenint-se tant la reducció de la transducció a fetge (Einfeld et al., 2001; Koizumi et al., 2003) com no (Martin et al., 2003; Smith et al., 2003). Aquests resultats contradictoris segurament són deguts a l'ús de soques d'animals o dosis d'injecció diferents (Mizuguchi and Hayakawa, 2004). Una altra interacció descrita que participa en la transducció a fetge ha estat la dels Heparan Sulfat Glicosaminoglicans amb el motiu KKTK del *shaft* de la fibra (Smith et al., 2003). Vectors adenovirals amb les tres mutacions van presentar una disminució en la transducció a fetge, però no a les cèl·lules no parequimals, resultant en una vida mitjana del vector triple mutant al torrent sanguini similar a la del vector no modificat (Koizumi et al., 2003). Recentment s'han descrit millores en aquest vector triple mutant (Koizumi et al., 2006). La interacció del *knob* de la fibra amb factors de coagulació sanguinis s'ha vist que es troba involucrada en la infecció dels hepatòcits i de les cèl·lules de Kupffer. Un vector adenoviral amb aquesta interacció abolida va demostrar una reducció en la toxicitat i en la infecció a fetge (Shayakhmetov et al., 2004).

## **11.- DIRECCIONAMENT DE VECTORS EN LA TERÀPIA GÈNICA DEL CÀNCER DE PRÒSTATA.**

Tal i com s'ha comentat anteriorment, sigui quina sigui l'estratègia i el vector utilitzats per teràpia gènica, la restricció dels seus efectes al teixit d'interès és un factor limitant per l'aplicació de la teràpia gènica a la clínica (Mabjeesh, Zhong, and Simons, 2002), essent la transferència del transgen als teixits no diana un dels grans problemes d'aquesta aproximació. En el cas del càncer de pròstata, s'han usat estratègies de transducció *ex vivo* i d'injecció intraprostàtica per tal d'aconseguir la transferència específica al teixit prostàtic (Herman et al., 1999; Simons et al., 1999), tot i així, la transducció *ex vivo* presenta dificultats tècniques especialment degudes a les condicions de cultiu i la injecció intraprostàtica en models animals ha demostrat la disseminació a altres teixits (Foley, Lawler, and Hollywood, 2004). El direccionament específic de vectors al teixit d'interès suposaria un avantatge per a l'aplicació de la teràpia gènica ja que permetria l'administració

sistèmica del vector, arribant a la malaltia disseminada (Wickham, 2003). Tal i com es comenta més extensament pel cas dels adenovirus, el direccionament específic dels vectors es pot produir tant a nivell d'expressió del transgen com a nivell de transferència del transgen.

Mitjançant el control de l'expressió del transgen, emprant promotors específics de teixit es podria restringir l'expressió d'aquest al teixit d'interès. La presència de marcadors específics de pròstata com PSA o PSMA (*Prostate Specific Membrane Antigen*) i més de 500 gens específics de pròstata, proporciona un fonament per a la teràpia gènica específica de càncer de pròstata (Mabjeesh, Zhong, and Simons, 2002). En la taula I.6 es mostren els promotors que s'han utilitzat o que es podrien utilitzar en teràpia gènica pel càncer de pròstata fins i tot per la malaltia metastàtica i androgen independent.

Promotor	Expressió	Efectivitat en models murins
<b>Gen probasina de rata</b>	Restringida a teixit prostàtic en ratolins transgènics, tot i que es detecta a nivells baixos en testicles.	Regressió del tumor.
<b>Gen BCL2</b>	Sobreexpressat en tumors prostàtics independents d'andrògens.	Disminució volum tumoral.
<b>Gen Kallikrein 3 (PSA)</b>	Usat com a marcador biomolecular, no s'expressa en teixits no prostàtics	Regressió del tumor.
<b>Gen Hidrolasa del Folat (PSMA)</b>	Expressió més elevada en teixit maligne que benigne, sobreexpressió en absència d'andrògens.	Disminució volum tumoral.
<b>Gen murí de l'osteocalcina</b>	Expressió en osteoblasts, múscul llis calcificat i tumors prostàtics.	Regressió del tumor.

**Taula I.6.- Promotors amb ús potencial per teràpia gènica del càncer de pròstata.** Adaptat de (Foley, Lawler, and Hollywood, 2004)

La majoria dels promotors han estat escollits perquè presenten activitat específica de teixit prostàtic i en alguns casos poden distingir entre teixit prostàtic benigne i maligne (Foley, Lawler, and Hollywood, 2004).

El direccionament a nivell de transferència del transgen es pot assolir a través de l'addició al vector de lligands que reconeixin receptors específics de teixit (Wickham, 2003). *Kraaij et al.* van demostrar un increment de la infecció *in vitro* de les cèl·lules de càncer de pròstata PC-346C i LNCaP d'un vector adenoviral deficient en replicació modificat químicament amb un anticòs biespecífic contra PSMA respecte al vector sense modificar. El fet que aquest vector modificat infectés amb una menor eficiència que el vector no modificat a línies cel·lulars d'altres tipus de tumors indicava una infecció específica a pròstata a través de PSMA (Kraaij et al., 2005).

*Justificació del treball  
i objectius*



En el nostre laboratori s'havia treballat en l'alliberament de drogues terapèutiques a cèl·lules tumorals. Concretament s'han realitzat treballs basats en l'estudi de nanopartícules de quitosan com a portadores de la forma activa de la Doxorubicina a cèl·lules tumorals en cultiu (Janes et al., 2001) i en el direccionament específic a cèl·lules tumorals -en aquest cas de liposomes- emprant lligands específics derivats de la laminina (Lopez-Barcons et al., 2004) i de la transferrina (Lopez-Barcons et al., 2005). En aquest moment ens vam plantejar aplicar l'experiència prèvia del laboratori en el direccionament específic a cèl·lules tumorals emprant teràpia gènica enlloc de drogues terapèutiques.

La teràpia gènica s'ha proposat com una alternativa als tractaments convencionals del càncer amb la finalitat d'assolir un efecte antitumoral (Mabjeesh, Zhong, and Simons, 2002; Mazhar and Waxman, 2004). Degut a què el càncer de pròstata és el càncer majoritàriament diagnosticat en homes adults i la segona causa de mort, després del càncer de pulmó (Mabjeesh, Zhong, and Simons, 2002; MacRae et al., 2006; Mazhar and Waxman, 2004) i a què els tractaments convencionals -com la prostatectomia radical, radioteràpia i braquiteràpia (MacRae et al., 2006)- tan sols funcionen en la malaltia localitzada (Mazhar and Waxman, 2004), vam escollir un model de càncer de pròstata metastàtic. En el cas del càncer de pròstata, la major part d'estudis de teràpia gènica en fase preclínica i clínica es basen en la injecció intratumoral del vector terapèutic (MacRae et al., 2006), fet que limita la teràpia als tumors localitzats (Wickham, 2000). Per tal d'arribar a la malaltia disseminada, que és el principal problema dels malalts de càncer de pròstata, seria necessària l'administració sistèmica del vector terapèutic i per tant el direccionament específic d'aquest (Mizuguchi and Hayakawa, 2004). Però la principal limitació d'aquesta aproximació és la cerca de lligands específics i d'elevada afinitat per a les cèl·lules diana (Wickham, 2000).

El cribratge de llibreries de *Phage Display* presenta un gran potencial en la identificació de pèptids amb capacitat de dirigir drogues o vectors terapèutics a cèl·lules tumorals (White et al., 2005). Seqüències peptídiques seleccionades amb les llibreries de *Phage display* han servit per dirigir drogues terapèutiques (Arap, Pasqualini, and Ruoslahti, 1998), vectors virals (Bockmann, Drosten, and Putzer, 2005; Nicklin et al., 2003; Nicklin et al., 2001; Nicklin et al., 2004; Romanczuk et al., 1999) i vectors no virals (Jost et al., 2001; Li et al., 2005; Moffatt, Wiehle, and Cristiano, 2005) a les seves cèl·lules diana demostrant la funcionalitat d'aquesta estratègia.

Per això, els objectius d'aquest treball són:

- 1.** Identificació de seqüències peptídiques específiques pel reconeixement de les cèl·lules metastàtiques de càncer de pròstata PC3MM2. Cribratge de la llibreria de *Phage Display* emprant aquestes cèl·lules.
- 2.** Estudi de l'especificitat de les seqüències peptídiques a les cèl·lules PC3MM2 i a altres línies cel·lulars (tant d'origen tumoral com no).
- 3.** Inserció de les seqüències escollides a l'HI loop de la fibra de l'Ad5 per a l'estudi de la seva funcionalitat com a lligands específics per al direccionament de vectors terapèutics.
- 4.** Estudi de la infectivitat *in vitro* dels adenovirus recombinants obtinguts emprant línies tumorals d'origen prostàtic i d'altres orígens.
- 5.** Estudi de la infectivitat *in vivo* dels adenovirus recombinants obtinguts emprant un model animal ortotòpic de càncer de pròstata.

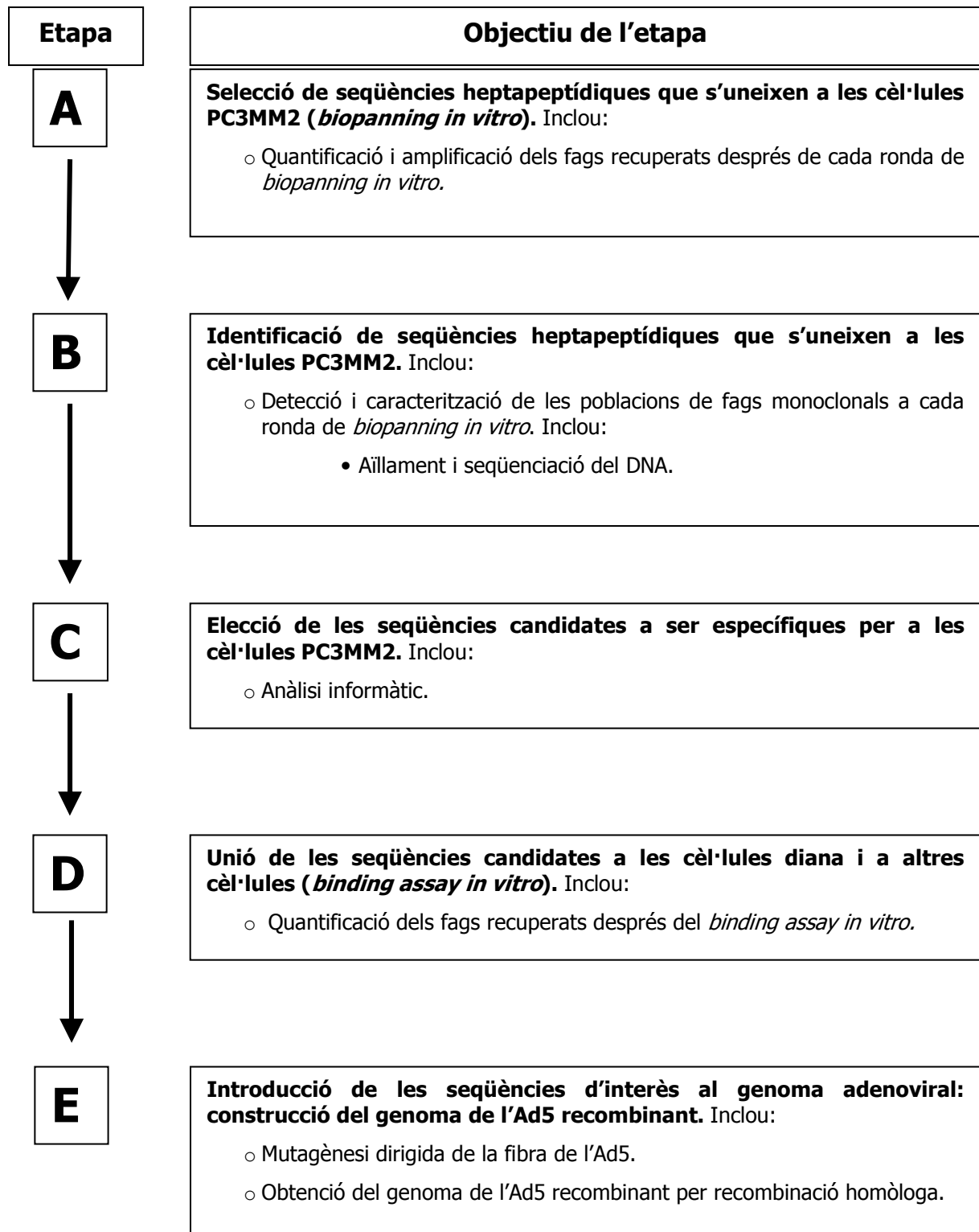


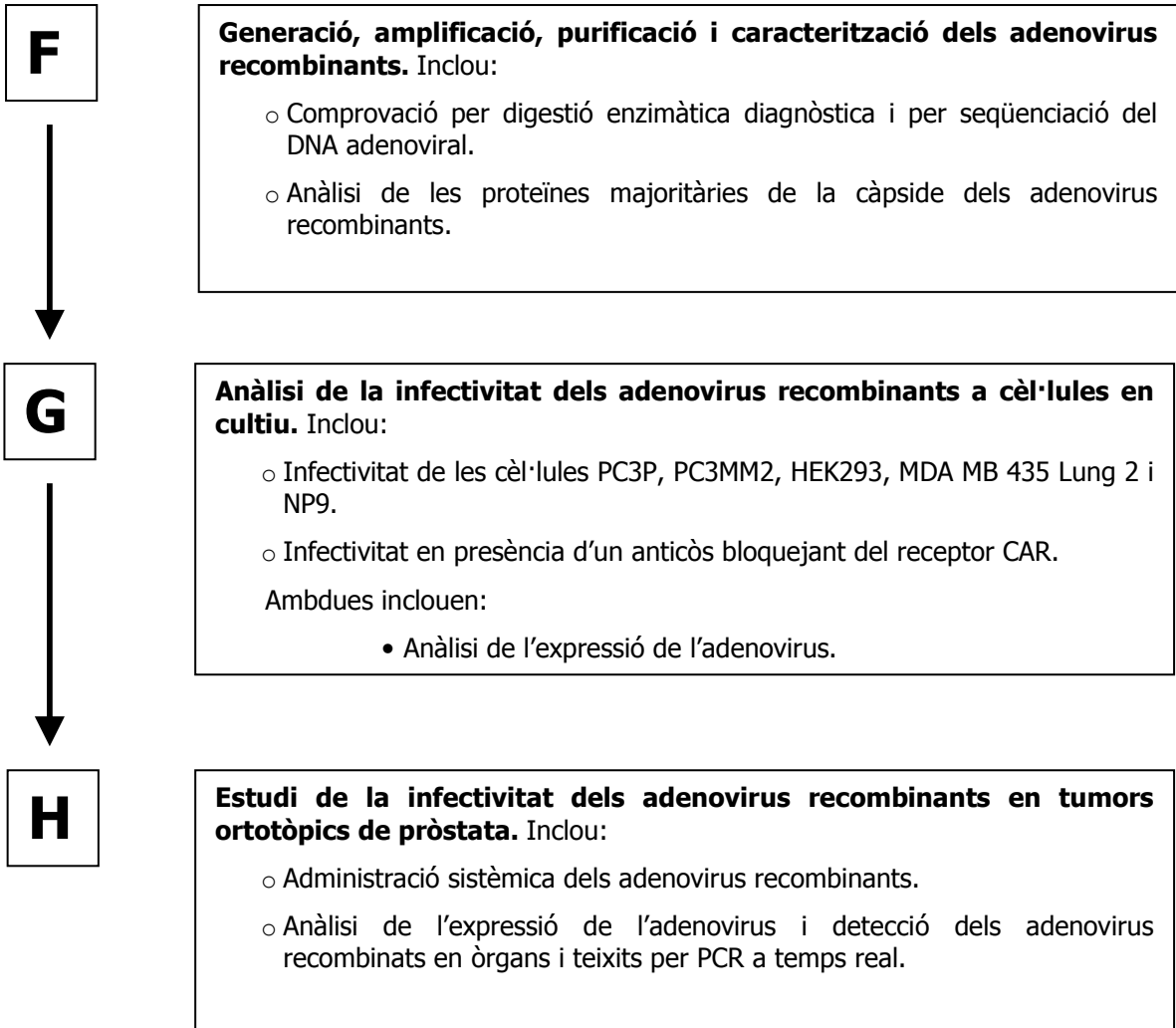
# Materials i Mètodes



## 1.- ETAPES EXPERIMENTALS DEL PRESENT TREBALL.

A continuació es mostra un esquema representant les etapes més importants realitzades en aquest treball per a la selecció de seqüències heptapeptídiques reconeixedores de les cèl·lules PC3MM2 i la construcció de vectors adenovirals expressant aquestes seqüències a l'HI loop de la fibra de l'adenovirus:

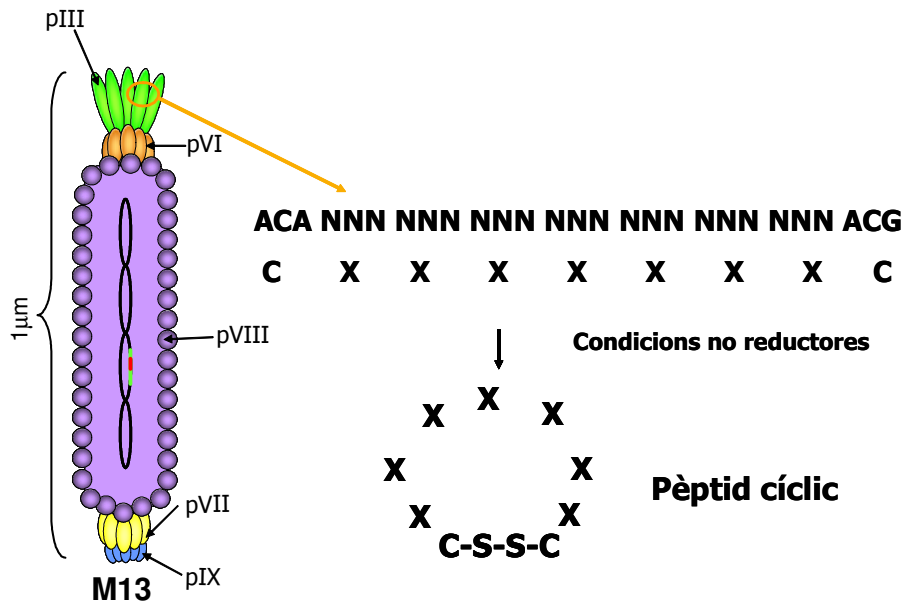




En els següents apartats s'explica la metodologia emprada específicament en cadascuna de les etapes. La metodologia general es detalla a l'apartat 16 (metodologia addicional emprada).

## 2.- CRIBRATGE DE LA LLIBRERIA DE *PHAGE DISPLAY* (*BIOPANNING IN VITRO*).

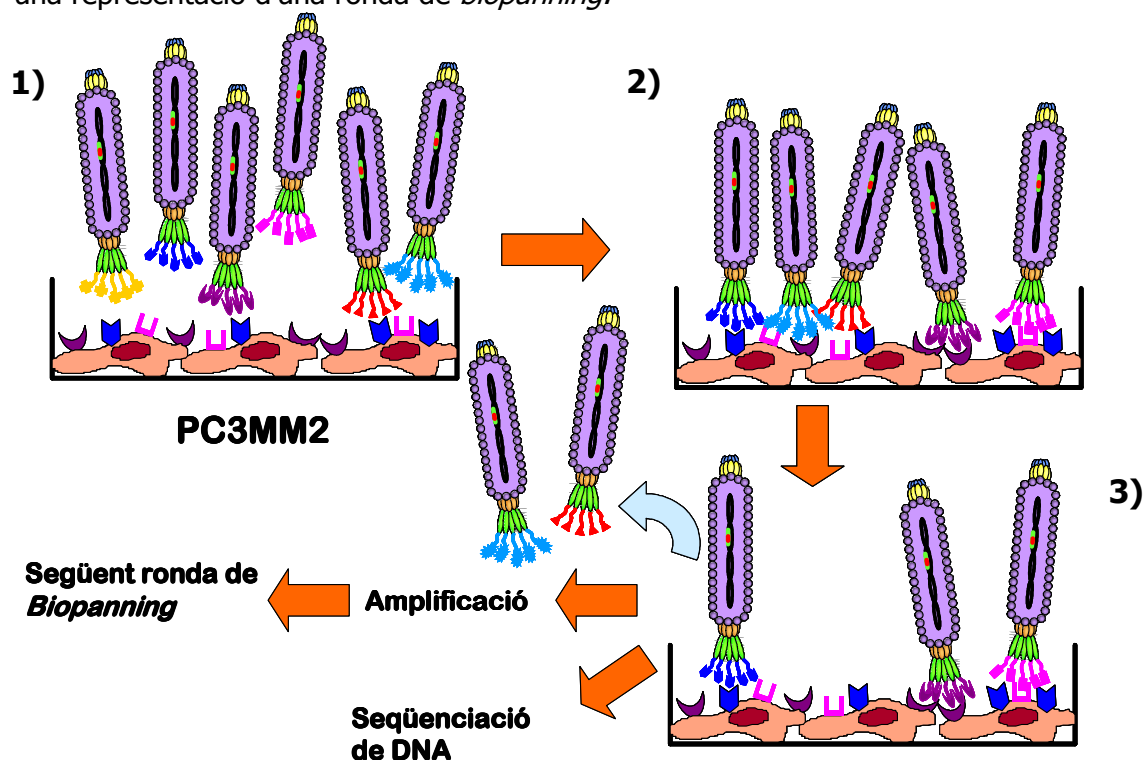
En aquest treball es va utilitzar la llibreria d'heptapèptids de *Phage Display* Ph.D.-C7C (New England Biolabs Inc., Beverly, MA, EEUU) on els heptapèptids es troben expressats a l'extrem N-terminal de la proteïna pIII de la càpside del fag M13. Els pèptids, flanquejats per dues cisteïnes (Cys), adopten una conformació cíclica deguda als ponts disulfurs que es formen entre ambdós residus terminals (figura M.1). La llibreria utilitzada conté  $3,7 \cdot 10^9$  clons independents, mostrant totes les possibles seqüències de set residus ( $1,28 \cdot 10^9$ ).



**Figura M.1.- Representació esquemàtica d'un fag de la llibreria Ph.D.-C7C.** Els heptapèptids es troben expressats a l'extrem N-terminal de la proteïna pIII de la càpside del fag M13 flanquejats per dues Cys. Els heptapèptids, en condicions no reductores, adopten una conformació cíclica deguda als ponts disulfur que es formen entre el dos residus de Cys. En la figura s'indiquen les proteïnes estructurals de la càpside del fag M13 (pIII, pVI, pVII, pVIII i pIX).

El cribratge de la llibreria de fags es va fer per *biopanning in vitro* (on la selecció dels fags de la llibreria es realitza per incubació d'aquests a les cèl·lules diana en cultiu). Va consistir en la incubació de  $2 \cdot 10^{11}$  *pfu* (*plaque forming units*) de la llibreria sobre les cèl·lules PC3MM2. Després de varis rentats, els fags recuperats units a les cèl·lules es van titular i amplificar (apartat 3). Aquests fags es van fer servir en posteriors seleccions. Concretament, es van realitzar quatre rondes de *biopanning*: la primera va consistir en una selecció de fags sobre les cèl·lules PC3MM2, la segona va consistir en una selecció negativa sobre la línia PC3P seguida d'una selecció positiva sobre les PC3MM2. Tant la tercera com la quarta ronda van ésser dues seleccions positives sobre les cèl·lules PC3MM2. El procediment seguit per cada ronda de *biopanning* es descriu amb més detall a continuació:

Per a cada assaig o ronda es van sembrar per triplicat  $3 \cdot 10^5$  cèl·lules PC3MM2, procedents d'un cultiu exponencial, sobre una superfície de  $10\text{cm}^2$  (Nunc., Dinamarca) en un volum de medi d'1ml. A la confluència del 80% es va afegir  $2 \cdot 10^{11}$  *pfu* (10 $\mu\text{l}$  de la llibreria inicial en el cas de la primera ronda) en un volum total d'1ml. La incubació es va fer durant 1 hora a  $4^\circ\text{C}$  en agitació suau. Es va fer en presència de DMEM-BSA per evitar la internalització dels fags a les cèl·lules i així recuperar els fags que interaccionessin amb proteïnes de la superfície cel·lular. Els cultius es van rentar 4 vegades amb PBS-BSA a  $4^\circ\text{C}$  (5 minuts per rentat en agitació suau) eliminant així els fags no units a les cèl·lules. Mitjançant un tractament amb pH àcid (1ml 0,2M Gly pH 2,2) es van eliminar els fags units a la superfície de les cèl·lules amb baixa afinitat, i posteriorment es va neutralitzar el pH del cultiu amb 200 $\mu\text{l}$  Tris-HCl 1M pH8. Per a recuperar els fags units amb alta afinitat a les cèl·lules es va utilitzar 1ml 30mM Tris-HCl 1 mM EDTA pH8, amb el qual es van tractar les cèl·lules durant 1 hora a  $4^\circ\text{C}$  (això és el que anomenem "eluits" de cada ronda). En la figura M.2 es mostra una representació d'una ronda de *biopanning*.



**Figura M.2.- Representació esquemàtica d'una ronda de *biopanning*.** (1)  $2 \cdot 10^{11}$  *pfu* de la llibreria inicial de fags o dels amplificats de les rondes anteriors es van incubar 1 hora a  $4^\circ\text{C}$  amb les cèl·lules PC3MM2 ( $3 \cdot 10^5$  cèl·lules PC3MM2 sobre una superfície de  $10\text{cm}^2$ ). (2) Amb una sèrie de rentats i posterior tractament àcid es van eliminar els fags no units o units dèbilment a les cèl·lules. (3) Finalment, es van recollir els fags units amb alta afinitat. Aquest eluït es va titular i amplificar per a continuar amb les següents rondes de *biopanning*. De les calbes de fags obtingudes se'n va extreure el DNA per a la identificació de la seqüència peptídica associada al fag.

Per a la segona ronda de *biopanning* es va seguir el mateix procediment descrit, emprant  $2 \cdot 10^{10}$  *pfu* dels fags recuperats de la primera ronda i posteriorment amplificats per a la incubació amb les cèl·lules PC3P. Atès que amb aquesta segona ronda volíem eliminar les seqüències peptídiques reconeixedores de la línia parental PC3P, per a la posterior selecció positiva sobre les PC3MM2 es va utilitzar el sobrenedant resultant de la incubació amb les cèl·lules PC3P, eliminant així els fags que s'unien a la superfície cel·lular de la línia parental.

El procediment descrit en aquest apartat ha estat emprat en l'etapa A (apartat 1).

### 3.- CARACTERITZACIÓ I MANIPULACIÓ DELS FAGS.

La titulació o determinació del nombre de *pfu/ml* (unitats formadores de plaques/ml) de qualsevol suspensió de fags es va fer valorant el nombre de calbes o àrees de lisi bacteriana que apareixien en un cultiu bacterià en agar. El nombre de calbes és referit al nombre de *pfu*.

Es va iniciar un creixement bacterià (10ml de medi LB) d'*E.coli* ER2738 i es va incubar a 37°C en agitació a 230rpm fins a assolir un creixement exponencial. Aquest es va infectar amb 10µl de les suspensions de fags. El cultiu bacterià infectat amb les suspensions de fags es va transferir a l'*Agarose top/XGal/IPTG* i es va abocar a plaques de LB-Agar. Les plaques es van incubar 18 hores a 37°C i es van comptar les calbes de fags blaves (atès que els fags de la llibreria contenen el gen *lacZα*) degudes a la lisi bacteriana per part dels fags. La titulació de les mostres es féu mitjançant l'avaluació de la infectivitat de tres dilucions de cadascuna.

Per tal d'obtenir un nombre prou elevat de fags (*pfu*) i realitzar la següent ronda de *biopanning*, els fags es van amplificar mitjançant la infecció i posterior creixement d'un cultiu bacterià. El procediment es descriu a continuació:

El volum d'elut a amplificar es va utilitzar per a infectar un cultiu bacterià d'*E.coli* ER2738 (20 ml). Aquest es va incubar 4,5 hores a 37°C, produint-se el creixement del cultiu bacterià i per tant l'amplificació dels fags. La recuperació dels fags amplificats es va realitzar per centrifugació dues vegades consecutives (10 minuts a 4°C a 10000rpm), precipitació dels fags presents al sobrenedant amb PEG/NaCl (3ml), durant 18 hores a 4°C i posterior centrifugació (15 minuts a 10000rpm a 4°C). El *pellet* obtingut es va resuspendre amb TBS (1ml) i es van eliminar les cèl·lules bacterianes residuals per centrifugació. Per tal de disminuir el volum final en què es trobaven els fags amplificats, es precipità novament amb PEG/NaCl però aquesta vegada durant 1 hora a 4°C i el *pellet* de fags es va resuspendre en

PBS (200µl). La matèria insoluble es va eliminar completament per centrifugació. Per quantificar el nombre de fags, es va procedir a titular-lo tal com s'ha descrit anteriorment.

La caracterització dels fags va consistir en l'anàlisi del DNA, per això es van amplificar els fags partint de les calbes del cultiu bacterià, tal i com s'ha explicat anteriorment. Per a l'aïllament del DNA, els fags amplificats es van centrifugar i precipitar amb PEG/NaCl. El *pellet* de fags es va resuspendre en 100µl de *Iodide Buffer* per tal de destruir la càpside del fag i el DNA del fag es va precipitar afegint 250µl d'etanol absolut (incubant 10 minuts a TA). El DNA es va rentar amb 100µl d'etanol 70% (v/v) i es va resuspendre en 30µl de tampó TE.

Per a la criopreservació de les poblacions de fags, es van amplificar els fags partint de les calbes del cultiu bacterià, tal i com s'ha explicat anteriorment. Es va centrifugar per a descartar els debris cel·lulars i el sobrenedant es va diluir 1:1 (v:v) amb Glicerol 99,5%. Es van mantenir a -20°C.

Els procediments descrits en aquest apartat s'han utilitzat en les etapes A, B i D (apartat 1).

#### **4.- BINDING ASSAY IN VITRO.**

La comparació de les eficiències d'unió dels diferents fags a les diferents línies cel·lulars es va realitzar per la incubació de les poblacions de fags monoclonals a les cèl·lules d'interès en cultiu, en el que anomenen *binding assay*. En aquest assaig el procediment és similar a l'emprat en el *biopanning in vitro*, però es diferencia en què les cèl·lules s'incuben amb  $5 \cdot 10^7$  *pfu* de les poblacions de fags monoclonals en lloc de  $2 \cdot 10^{11}$  *pfu* de la llibreria de fags, ja que els fags ja han estat prèviament seleccionats per la unió i reconeixement de les cèl·lules diana. En aquest cas també es van utilitzar  $3 \cdot 10^5$  cèl·lules en una superfície de 10cm<sup>2</sup> (Nunc.) i es van incubar amb les poblacions de fags monoclonals seguint el mateix procediment que en el *biopanning in vitro* (apartat 1). Les eficiències d'unió es van calcular com la relació entre les *pfu* obtingudes després de l'assaig i les *pfu* incubades a l'inici de l'assaig. Tots els assajos es van fer per triplicat i com a mínim, en dos experiments diferents.

Aquest procediment s'ha utilitzat en l'etapa D (apartat 1).



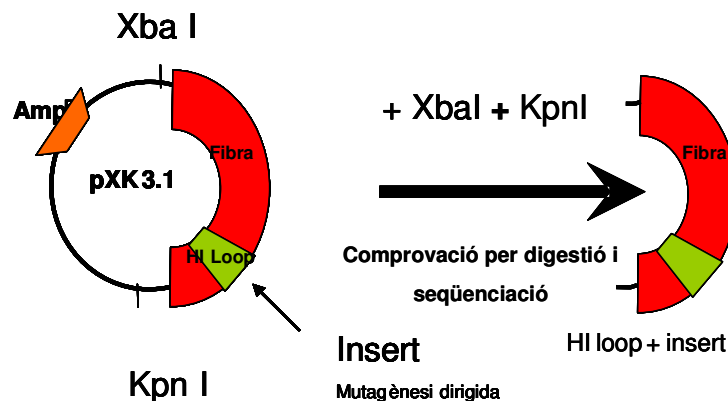
## 5.- MUTAGÈNESI DIRIGIDA.

Les seqüències es van introduir a l'HI loop de la fibra de l'Ad5 entre els residus treonina-546 i prolina-547 (figura M.3) (Krasnykh et al., 1998). La introducció de les seqüències es va realitzar mitjançant mutagènesi dirigida emprant els oligonucleòtids *forward* i *reverse* dissenyats específicament per a cada seqüència (taula M.1).



**Figura M.3.- Esquema de la incorporació de les seqüències a l'HI loop.** Adaptat de (Krasnykh et al., 1998).

El plasmidi pXK3.1 (figura M.4), que presenta el gen de la fibra de l'Ad5 flanquejat per les dianes de restricció XbaI i KpnI (Belousova et al., 2002), es va emprar com a DNA motlle. Aquest plasmidi va ser cedit pel Dr. Alemany (ICO, IDIBELL, Barcelona, Espanya).



**Figura M.4.- Representació esquemàtica de la incorporació de les seqüències peptídiques a l'HI loop de la fibra de l'Ad5 mitjançant mutagènesi dirigida del gen de la fibra.**

Per tal de facilitar la identificació dels clons positius, els oligonucleòtids es van dissenyar de manera que cadascun contingués la seqüència consens d'un enzim de restricció diferent en cada cas (taula M.1). Es va obtenir un patró de fragments de digestió específic en cada cas i diferent que l'obtingut en el cas del plasmidi pXK3.1 sense cap seqüència incorporada a l'HI loop. En la taula M.1 es mostren els oligonucleòtids *forward* i *reverse* dissenyats

específicament per a cada seqüència, amb la diana de restricció i el corresponent enzim de restricció indicats.

Seqüència peptídica	Oligonucleòtids específics <sup>1</sup>		Enzim de restricció <sup>2</sup>
	Nom	Seqüència	
CTPQNTTMC	<b>CTPQfor</b> <b>CTPQrev</b>	5'CAGGAGACACAAC <b>TGTACACCTCAGAATACGACGAT</b> <b>GTGCCCAAGTGCATACTC</b> 3' 3'GTCCTCTGTGTTGA <b>ACATGTGGAGTCTTATGCTGCTA</b> <b>CACGGGTTACGTATGAG</b> 5'	BsrGI
CYPSRSPLC	<b>CYPSfor</b> <b>CYPSrev</b>	5'CAGGAGACACAAC <b>TGTTATCCGTCGCGAAGCCCGTT</b> <b>GTGCCCAAGTGCATACTC</b> 3' 3'GTCCTCTGTGTTGA <b>ACAATAGGCAGCGCTTCGGGCA</b> <b>ACACGGGTTACGTATGAG</b> 5'	NruI
CPLHQRPC	<b>CPLHfor</b> <b>CPLHrev</b>	5'CAGGAGACACAAC <b>TGTCCTCTTCATCAGAGGCCTAT</b> <b>GTGCCCAAGTGCATACTC</b> 3' 3'GTCCTCTGTGTTGA <b>ACAGGAGAAGTAGTCTCCGGAT</b> <b>ACACGGGTTACGTATGAG</b> 5'	StuI
CFPPMFYDC	<b>CFPPfor</b> <b>CFPPrev</b>	5'CAGGAGACACA <b>ACATGTTTTCTCCTATGTTTTATGAT</b> <b>TGCCCAAGTGCATACTC</b> 3' 3'GTCCTCTGTGTT <b>GTACAAAAGGAGGATACAAAATACT</b> <b>AACGGGTTACGTATGAG</b> 5'	AflIII

<sup>1</sup>Oligonucleòtids d'Invitrogen, Life Technologies.<sup>2</sup>Els enzims de restricció han estat subministrats per NEB (*New England Biolabs Inc., Beverly, MA, EEUU*).

**Taula M.1.- Oligonucleòtids emprats per a la introducció de les seqüències CTPQNTTMC, CYPSRSPLC, CPLHQRPC i CFPPMFYDC a l'HI loop de la fibra de l'Ad5 mitjançant mutagènesi dirigida del gen de la fibra.** La seqüència nucleotídica marcada en negreta correspon a la seqüència introduïda. S'ha subratllat la seqüència enzimàtica consens dels enzims de restricció corresponents.

La tècnica de la mutagènesi dirigida consisteix en la introducció de canvis en la seqüència nucleotídica del DNA motlle emprant oligonucleòtids dissenyats específicament. Es tracta d'una PCR utilitzant una Taq polimerasa d'alta fidelitat i amb la capacitat d'amplificar fragments de molta llargada, per això es va utilitzar per a la introducció de les seqüències peptídiques seleccionades a l'HI loop de la fibra de l'Ad5 emprant com a DNA motlle el plasmidi pXK3.1. La mescla de PCR va ésser la següent:

Components	Concentració final
Tampó 10X <sup>1</sup>	1X
dNTPs	2,5mM
MgCl <sub>2</sub>	0,45mM
Oligonucleòtid <sup>2</sup> <i>forward</i>	2,5ng/μl
Oligonucleòtid <i>reverse</i>	2,5ng/μl
Pfu Turbo-DNA polimerasa	0,05U/μl
DNA motlle	0,2ng/μl
H <sub>2</sub> O	fins a 50 μl

<sup>1</sup> Tampó subministrat juntament amb la Taq Pfu Turbo (Stratagene, La Jolla, CA, EEUU): Tris-HCl 200mM (pH 8,8), MgSO<sub>4</sub> 20mM, KCl 100mM, Tritó X-100 1% i BSA 1mg/ml. <sup>2</sup> Oligonucleòtids d'Invitrogen, Life Technologies.

La reacció es va dur a terme amb el cicle de temps i temperatures: 1) 5 minuts a 95°C; 2) 30 segons a 95°C; 3) 1 minut a 50°C; 4) 12 minuts a 68°C; 5) x 18 vegades des de 2); 6) 12 minuts 68°C.

Amb la finalitat d'eliminar el DNA motlle i seleccionar el DNA sintetitzat *de novo* a la PCR amb les seqüències peptídiques introduïdes a l'HI loop, el producte de PCR es va tractar amb l'enzim de restricció DpnI (Roche, Mannheim, Alemanya), utilitzant el tampó subministrat pel fabricant durant 2 hores a 37°C. Aquest enzim reconeix la diana 5'Gm<sup>6</sup>ATC3' essent específic per DNA metilat i semimetilat i per tant digereix el DNA motlle, però no el DNA sintetitzat per la Taq polimerasa. Per tal de recuperar el DNA amb les seqüències peptídiques introduïdes a l'HI loop de la fibra, el producte resultant de la digestió amb DpnI es va transformar en *E.coli* DH5α (apartat 16.1) i es va sembrar en plaques de LB-Ampicilina atès que volíem seleccionar les colònies que havien incorporat el DNA. Amb la finalitat de determinar si el DNA que havien incorporat les colònies presentava la inserció de les seqüències peptídiques a l'HI loop de la fibra, se'n va obtenir el DNA plasmídic (apartat 16.2) i es va digerir (apartat 16.6) emprant els enzims de restricció indicats en la taula M.1.

El patró de digestió obtingut i visualitzat en un gel d'agarosa a l'1% ens Tris Acetat-EDTA (TAE) ens va permetre seleccionar el DNA amb les seqüències introduïdes a l'HI loop. Es va comprovar per seqüenciació seguint el procediment descrit en l'apartat 16.7.

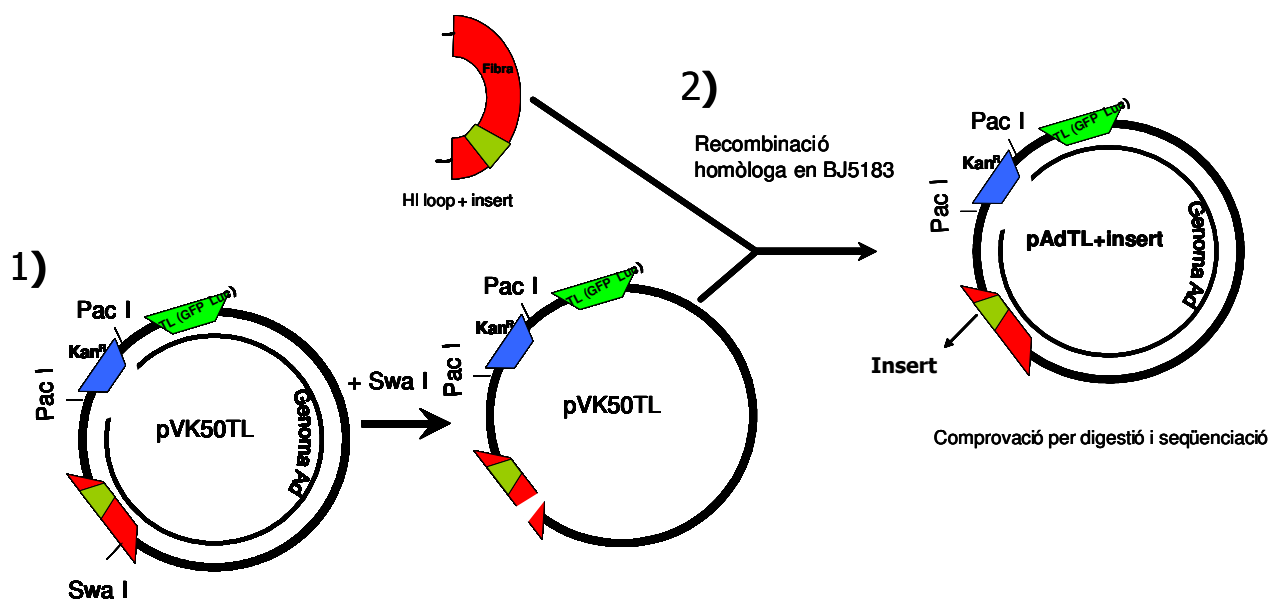
Una vegada comprovada la incorporació de les seqüències, el DNA es va digerir amb els enzims de restricció XbaI i KpnI, les dianes dels quals es troben flanquejant el gen de la fibra de l'Ad5. Els fragments de digestió es van visualitzar en un gel d'agarosa preparat a

l'1,5% ens Tris Acetat-EDTA (TAE). El fragment de 3,1Kb corresponent al gen de la fibra de l'Ad5 es va purificar a partir del gel (apartat 16.3).

El procediment descrit en aquest apartat s'ha emprat en l'etapa E (apartat 1).

## 6.- RECOMBINACIÓ HOMÒLOGA.

El genoma complet de l'Ad5 amb les fibres modificades es va obtenir per recombinació homòloga. La recombinació homòloga consisteix en l'intercanvi de fragments de DNA entre un donant (en el nostre cas, el gen de la fibra amb les seqüències incorporades purificat) i un receptor (en el nostre cas el plasmidi pVK50TL). El plasmidi pVK50TL -(Bayo-Puxan et al., 2006), cedit pel Dr. Alemany (ICO, IDIBELL, Barcelona)- conté el genoma complet de l'Ad5, però presenta una diana única *SwaI* dins el gen de la fibra (que impossibilita la generació de virus viables a partir d'aquest). La recombinació homòloga es va realitzar emprant bacteries *Rec A* positives *E.coli* BJ5183. El DNA resultant de la recombinació homòloga presentarà el genoma complet de l'Ad5 amb el gen de la fibra amb les seqüències incorporades a l'HI loop i sense la diana de restricció *SwaI*. A continuació es descriu amb més detall el procediment:



**Figura M.5.- Representació esquemàtica de la recombinació homòloga per a l'obtenció del genoma de l'Ad5 amb les seqüències incorporades a l'HI loop del gen de la fibra.** El genoma de l'adenovirus recombinant es va obtenir per recombinació homòloga en bacteries *E.coli* BJ5183 del gen de la fibra modificat i el genoma complet de l'Ad5 linealitzat amb *SwaI*.

Per la recombinació homòloga el plasmidi pVK50TL es va linealitzar amb *SwaI* (figura M.5 1)) emprant el tampó proporcionat per la casa comercial durant 2 hores a 25°C i es va purificar (apartat 16.3). El producte resultant juntament amb el gen de la fibra de l'Ad5 amb

les seqüències incorporades es va introduir (apartat 16.1) en bacteries *E.coli* BJ5183 (*Rec A* positives). Per a la transformació es va usar una relació 1:10 pVK50TL+SwaI:gen fibra amb les seqüències incorporades. Els bacteris es van sembrar en plaques de LB-Kanamicina (figura M.5 2)) que es van incubar 18h a 37°C.

Totes les colònies bacterianes resistents a Kanamicina es van repicar per obtenir-ne el DNA plasmídic (apartat 16.2). Aquest va ser analitzat per PCR per determinar si contenien l'insert (apartat 16.5).

El DNA provinent de les colònies positives es va introduir (apartat 16.1) en bacteries *E.coli* DH5 $\alpha$  i es van sembrar en plaques de LB-Kanamicina. De les colònies resultants se'n va obtenir el DNA plasmídic (apartat 16.2) i es va comprovar la inserció de les seqüències per digestió (apartat 16.6) i seqüenciació (apartat 16.7).

Els quatre vectors adenovirals construïts en aquest treball deriven de l'adenovirus humà tipus 5 (Ad5). Són deficientes en replicació, ja que presenten la unitat de transcripció E1A del seu genoma substituïda pels gens de la luciferasa (*luc*) i de la proteïna verda fluorescent (GFP) sota el control del promotor del Citomegalovirus (CMV). L'Ad5 amb les fibres sense modificar (AdTL) havia estat descrit prèviament com a AdGFPluc (Alemany and Curiel, 2001). Degut a què aquests vectors no es repliquen, ha estat necessari per a la seva generació l'ús de les cèl·lules empaquetadores de virus HEK293 que complementen en *trans* aquesta funció E1A (tal i com es comenta en l'apartat 15).

El procediment descrit en aquest apartat s'ha emprat en l'etapa E (apartat 1).

## **7.- GENERACIÓ DELS ADENOVIRUS RECOMBINANTS.**

Per a la generació dels adenovirus modificats, es van emprar cèl·lules HEK293. Aquestes cèl·lules complementen en *trans* la regió E1A del genoma de l'adenovirus. En transfectar aquestes cèl·lules amb el genoma adenoviral, la replicació del DNA viral i la transcripció de les proteïnes de la càpsida s'activa. El DNA viral fruit de la replicació s'encapsida, per donar lloc a la progènie viral. Aquesta s'allibera al medi extracel·lular infectant les cèl·lules veïnes. A continuació es descriu amb detall el procediment emprat per la generació dels adenovirus recombinants a partir dels genomes virals recombinants obtinguts (apartat 6):

Previ a la transfecció i mitjançant digestió enzimàtica amb PacI del vector pVK50TL recombinant, es va alliberar el genoma viral recombinant de la construcció plasmídica.

Aquest DNA viral es va purificar amb 1 Volum de fenol:cloroform i precipitació del DNA amb 2 volums d'EtOH al 2% acetat sòdic (p/v) i es va mantenir a -20°C fins al moment de la transfecció.

Per a la transfecció dels genomes virals recombinants a les cèl·lules HEK293 es va emprar el mètode del fosfat de calci. Breument, les cèl·lules HEK293 es van sembrar 24 hores abans de la transfecció per assolir una confluència del 60% en el moment de la transfecció (aproximadament unes  $6 \cdot 10^5$  cèl·lules en una superfície de  $10\text{cm}^2$ ). La mescla de transfecció utilitzada va ésser la següent: 19,5µl de  $\text{CaCl}_2$  2M, 3µg de DNA viral (digerit amb PacI i purificat, com ja s'ha dit) fins a un volum final de 162µl. Aquesta mescla es va barrejar, i se li va afegir un volum igual de solució salina HBS 2X. Es va incubar 15 minuts a TA abans d'afegir-la a les cèl·lules HEK293. A les 16 hores es va canviar el medi de cultiu, prèvia confirmació de la presència dels precipitats.

La presència d'adenovirus recombinant es va observar de manera indirecta per canvis morfològics de les cèl·lules HEK293 transfectades (pèrdua d'adhesió del substrat, estat arrodonit i refringent). L'aparició d'aquests canvis morfològics s'anomena efecte citopàtic i es va observar entre els 6 i els 7 dies després de la transfecció a les cèl·lules HEK293. Transcorregut aquest temps, es van recollir les cèl·lules infectades juntament amb el medi. Per alliberar les partícules virals que es trobaven a l'interior de les cèl·lules, es van realitzar 3 cicles de congelació a -80°C i descongelació a 37°C.

El procediment descrit en aquest apartat s'ha utilitzat en l'etapa F (apartat 1).

## **8.- AMPLIFICACIÓ DELS ADENOVIRUS RECOMBINANTS.**

L'amplificació dels adenovirus consisteix en la propagació del vector viral emprant, en cada pas d'amplificació, un major nombre de cèl·lules que en el pas anterior i, per tant, permet l'obtenció de lisats amb una major quantitat de partícules virals. Per a amplificar els adenovirus recombinants es van utilitzar les mateixes cèl·lules usades per a la seva generació, és a dir, les cèl·lules HEK293 (sempre al 80% de confluència). En condicions normals de propagació, el sobrenedant pot infectar 5 plaques de la mateixa mida de la qual prové i el lisat cel·lular en pot infectar 20.

Es van utilitzar 500µl del lisat procedent de la generació dels adenovirus recombinants (apartat 7) per a infectar cèl·lules HEK293 sembrades en una placa de superfície  $56\text{cm}^2$ . Després d'una incubació de 36 a 48 hores, a 37°C al 5%  $\text{CO}_2$ , l'efecte citopàtic es va fer

evident en el 95-100% de les cèl·lules, de les quals, entre el 10-20% de les cèl·lules es trobaven ja desenganxades. En aquest moment es va recollir i es va obtenir el lisat tal i com s'ha indicat en l'apartat 7. Aquest lisat (concretament 1ml) es va utilitzar per a infectar cèl·lules HEK293 sembrades en una placa de 140cm<sup>2</sup> i aquest a 30 plaques de 140cm<sup>2</sup>. El sobrenedant es va centrifugar en tubs de 50ml, tipus falcon, durant 5 minuts a 1250rpm. El sobrenedant es va guardar a -80°C per a posteriors infeccions. Els pellets cel·lulars es van ajuntar en un mateix tub tipus falcon i es van guardar congelats a -80°C en un volum proporcional de sobrenedant fins al moment de la purificació de l'adenovirus.

El procediment descrit en aquest apartat s'ha utilitzat en l'etapa F (apartat 1).

### **9.- PURIFICACIÓ DE PARTÍCULES VIRALS.**

La purificació de les partícules virals es va realitzar mitjançant el mètode estàndard d'ultracentrifugació en gradients de Clorur de Cesi (Graham and Prevec, 1995). Mitjançant un gradient discontinu de Clorur de Cesi es van separar les partícules virals de les restes cel·lulars, ja que les partícules virals es concentren en el gradient de densitat 1,32g/ml. A continuació i mitjançant un gradient continu de Clorur de Cesi, es van separar les partícules virals de les càpsides buides. El procediment amb més detall es descriu a continuació:

Les partícules virals es van alliberar de l'interior de la cèl·lula realitzant tres cicles de congelació i descongelació dels pellets cel·lulars. La suspensió es va centrifugar en tubs de 50ml, tipus falcon, durant 5 minuts a 1250rpm per a precipitar les restes cel·lulars. El sobrenedant serà el que anomenem extracte cel·lular clarificat (CEC, *Cell Extract Clarified*) i contenia els adenovirus a purificar. A continuació es van preparar els gradients discontinus de densitat en els tubs de la ultracentrífuga (Beckman coulter) afegint 0,5ml de la solució de Clorur de Cesi d'una densitat de 1,5g/ml, seguida de 2,5ml de la solució a 1,35g/ml de Clorur de Cesi i aquesta de 2,5ml de la solució a 1,25g/ml de clorur de cesi (aquestes dues es van afegir amb molta cura, fent lliscar les solucions per les parets del tub i apropant-se tot el possible a la superfície). Seguidament, es va afegir la suspensió viral (CEC), fins a un volum final de 12,5ml per tub. Els tubs es van centrifugar durant 1 hora a 10°C i 35000rpm (rotor SW41, Beckman). En aquestes condicions les partícules virals se separen de les restes cel·lulars i es concentren en el punt del gradient de densitat corresponent a 1,32g/ml, formant-se una banda blanquinosa. Es van recuperar les bandes de virus amb pipeta, es van mesclar amb la solució 1,35g/ml de Clorur de Cesi i es van sotmetre a una segona ultracentrifugació, en aquest cas de gradient continu, durant 16 hores a 10°C a 35000rpm obtenint una banda blanquinosa que es correspon a l'adenovirus. La banda es va retirar

amb una pipeta i per tal d'eliminar el Clorur de Cesi, es va sotmetre a diàlisi enfront de 500ml del tampó PBS<sup>++</sup> a 4°C en agitació durant 2 hores complementat amb glicerol (*UltraPure Glycerol*, Invitrogen life Technologies). La diàlisi es va fer a una concentració final del 10% (v/v), per conservar el virus al·liquotat a -80°C.

El seguiment de la qualitat dels adenovirus recombinants, pel que fa a les seqüències inserides, es va fer per digestió enzimàtica (apartat 16.6) i seqüenciació (apartat 16.7). A la taula M.2 es mostra un resum dels enzims de restricció emprats per a la comprovació dels diferents DNAs virals, la temperatura de digestió i el patró de digestió obtingut.

Adenovirus recombinant	Enzim de restricció <sup>1</sup>	Temperatura	Patró de digestió Ad recombinant (pb)	Patró de digestió Ad sense modificar (pb)
<b>AdTLCTPQ</b>	BsrGI	37°C	11576, 6654, 5736, <b>3646</b> , <b>3289</b> , 2776, 2696, 554, 195	11576, <b>6935</b> , 6654, 5736, 2776, 2696, 554, 195
<b>AdTLCYPS</b>	NruI	37°C	<b>10830</b> , 7451, 6163, 4283, 3613, <b>3277</b> , 1419, 81	<b>14107</b> , 7451, 6163, 4283, 3613, 1419, 19
<b>AdTLCPLH</b>	StuI	37°C	<b>6916</b> , 9786, 5273, 3821, 3693, 3271, 3213, 1552, 1335, <b>739</b>	<b>7655</b> , 9786, 5273, 3821, 3693, 3271, 3213, 1552, 1335

<sup>1</sup>Els enzims de restricció han estat subministrats per NEB (*New England Biolabs Inc., Beverly, MA, EEUU*).

**Taula M.2.- Enzims de restricció emprats per a la comprovació del genoma viral dels adenovirus recombinants.** S'indica l'enzim de restricció emprat per cada adenovirus recombinant, la temperatura de la digestió i el patró de digestió obtingut tant en el cas de l'adenovirus recombinant com en el cas de l'adenovirus amb les fibres sense modificar. En negreta es marquen les bandes diferencials que ens indiquen la incorporació de les seqüències peptídiques a l'HI loop.

El procediment descrit en aquest apartat s'ha utilitzat en l'etapa F (apartat 1).

## 10.- ASSAJOS D'INFECTIVITAT *IN VITRO*.

Per a analitzar la infectivitat *in vitro* dels adenovirus recombinants, les cèl·lules en cultiu es van incubar amb diferents dilucions de les suspensions virals a analitzar ( $10^1$  a  $10^4$  pv/ml). Per això, es van sembrar  $3 \cdot 10^4$  cèl·lules en cadascun dels pous de plaques de 96 pous en un volum de 0,1ml de medi amb 10% de SBF. A les 24 hores, les cèl·lules es van incubar per triplicat amb 0,1ml de les dilucions virals preparades prèviament ( $10^1$  a  $10^4$  pv/ml). Les cèl·lules es van mantenir en contacte amb les dilucions virals durant dues hores a TA, passat aquest temps el medi es canvià per medi complet al 10% de SBF. A continuació, es van mantenir a 37°C fins a les 24h en el cas de les cèl·lules HEK293 i 48h en el cas de la resta de cèl·lules. Transcorregut aquest temps, el medi de cultiu es va retirar i es van afegir 50µl per pou del tampó especial de lisi cel·lular RLB 1X (*Reporter Lysis Buffer*, Promega). Les cèl·lules es van lisar mitjançant congelació/descongelació (-80°C/TA). Les cèl·lules



lisades es van recollir i centrifugar durant 5 minuts a 6.500rpm a 4°C. El sobrenedant (que és l'extracte cel·lular) es va recuperar i se'n realitzà la mesura de l'activitat luciferasa (apartat 16.10) i de la concentració de proteïna (apartat 16.11). Els resultats, doncs, s'expressen en RLU (*Relative Light Units*) per µg de proteïna.

Pel que fa als experiments de bloqueig del receptor CAR, es va realitzar un procediment similar al comentat. En aquest cas, el nombre de cèl·lules sembrades va ser 15.000 cèl·lules/pou que es van incubar amb 500pv/cèl·lula. Previ a la incubació amb les suspensions virals, les cèl·lules es van incubar 2 hores a 4°C amb una dilució 1:1 de l'anticòs anti-CAR (RmcB, ATCC, CRL-2379) o de la IgG inespecífica (DAKO), mantenint el volum final del pou a 0,1ml. A continuació es van afegir 500pv/cèl que es van incubar durant 1 hora a TA. Després de 18 hores a 37°C, les cèl·lules es van recollir seguint el procediment comentat anteriorment.

Els procediments descrits en aquest apartat s'han utilitzat en l'etapa G (apartat 1).

### **11.- ASSAJOS D'INFECTIVITAT *IN VIVO*.**

Per a analitzar la infectivitat *in vivo* dels adenovirus recombinants, es van administrar  $5 \times 10^{10}$  pv/ratolí. L'administració es va fer amb agulles d'insulina de 29G en un volum màxim de 0,2ml en PBS. La injecció es va fer sempre per qualsevol de les dues venes laterals de la cua del ratolí.

Als 5 dies de l'administració sistèmica, es van sacrificar els animals i se'n van extreure els diferents teixits i òrgans, que es van conservar a -80°C. Dels òrgans i teixits congelats se'n va fer una pols fina amb una mà de morter de ceràmica sostinguda en un bany de nitrogen líquid, es va afegir el tampó de lisi CCLR (*Cell Culture Lysis Reagent*, Promega) a raó d'1ml de CCLR per cada 100mg de pols tissular. La mescla es va barrejar i centrifugar durant 5 minuts a 6500rpm. El sobrenedant és l'extracte tissular del qual se'n va quantificar l'activitat luciferasa (apartat 16.10) i la concentració de proteïna (apartat 16.11). Els resultats s'expressen en RLU, normalitzats per mg de proteïna.

El procediment descrit en aquest apartat s'ha utilitzat en l'etapa H (apartat 1).

### **12.- ANÀLISI PER PCR A TEMPS REAL.**

L'anàlisi de l'acumulació del genoma viral a les mostres de fetge i de tumor es va realitzar per PCR a temps real. L'extracció de DNA del fetge i del tumor es va realitzar emprant el

mètode estàndard de fenol:cloroform. Per la PCR quantitativa a temps real es va utilitzar el sistema Lightcycler® (Roche, Mannheim, Alemanya). La PCR es va fer en presència de 50ng de DNA de les mostres a analitzar. Els resultats van ser extrapolats a partir d'una recta patró emprant mostres de DNA obtingudes de ratolins -als quals no se'ls havia injectat sistèmicament cap Ad- que es van contaminar amb diferents dilucions d'AdTL ( $10^8$ pv a  $10^1$  pv). Es van emprar dos oligonucleòtids flanquejant el punt d'inserció de les seqüències, obtenint un producte de PCR de 127pb en el cas dels adenovirus recombinants i de 100pb en el cas de l'Ad5 amb les fibres intactes. La mescla de reacció i les condicions de la PCR van esser les següents:

<b>oligonucleòtids</b> <sup>1</sup> : <i>forward</i> 5' GGAGACAAAACCTAAACCTGT 3'	
<i>reverse</i> 5' CCCATGAAAATGACATAG 3'	
<b>mescla de reacció:</b> H <sub>2</sub> O	6,4µl
MgCl <sub>2</sub>	1,2µl
<i>forward</i> 10µM	0,2µl
<i>reverse</i> 10µM	0,2µl
SYBR Green I	1µl
DNA (50ng)	1µl

<sup>1</sup>Oligonucleòtids d'Invitrogen, Life Technologies.

La reacció es va dur a terme amb el cicle de temps i temperatures: 1) 10 minuts a 95°C; 2) 5 segons a 95°C; 3) 10 segons a 55°C; 4) 6 segons a 72°C; 5) x 45vegades des de 2).

Per tal de normalitzar la quantitat de DNA, es van emprar els oligonucleòtids de 18S en totes les mostres analitzades. La mescla de reacció va esser la mateixa, utilitzant els oligonucleòtids específics per a 18S *forward* 5' GCGAAAGCATTGCAAGAA 3' i *reverse* 5' CATCACAGACCTGTTATTGC 3'. La reacció es va dur a terme amb el cicle de temps i temperatures: 1) 10 minuts a 95°C; 2) 5 segons a 95°C; 3) 10 segons a 58°C; 4) 18 segons a 72°C; 5) x 45vegades des de 2).

El procediment descrit en aquest apartat s'ha utilitzat en l'etapa H (apartat 1).

### 13.- ANÀLISI PER CITOMETRIA DE FLUX (FACS).

Es va emprar el citòmetre de flux o FACS (*Flow Assessed Cell Sorter*; FC500-MPL, Beckman Coulter) per la detecció d'antígens de membrana de cèl·lules prèviament tenyides amb anticossos específics conjugats a fluorocroms.

Es va partir de cèl·lules cultivades *in vitro* a una confluència del 80% per a una expressió òptima de les proteïnes de membrana. Per no malmetre les proteïnes de membrana les cèl·lules es van desenganxar suaument de la placa amb EDTA 0,1mM (GIBCO, Grand Island, NY, EEUU). Les cèl·lules es van recol·lectar per centrifugació (5 minuts a 1500rpm a 4°C), i es van resuspendre en PBS. D'aquesta suspensió cel·lular, se'n van separar  $10^6$  cèl·lules per cadascuna de les tincions i es van resuspendre en PBS-albúmina a raó de 0,1ml per mostra durant 1 hora a 4°C. Després de 2 rentats amb 0,5ml de PBS<sup>++</sup>, les cèl·lules es van incubar amb els anticossos primaris corresponents: anti-CAR (sobrenedant hibridoma RmcB ATCC, CRL-2379, dilució 1/5), anti-integrines  $\alpha_v$  (sobrenedant hibridoma L230 ATCC, HB-8448, dilució 1/5) o anti-IgG (control negatiu, DAKO, dilució 1/5) en un volum final de 0,1ml en PBS-albúmina. A continuació i després de 2 nous rentats amb PBS<sup>++</sup>, es va procedir a la incubació amb l'anticòs secundari IgG-FITC (Goat anti-mouse Alexa Fluor 488; dilució final 1/300). Totes les incubacions es van realitzar en agitació orbital durant 1 hora a 4°C. Després de 2 nous rentats de les suspensions cel·lulars amb PBS-albúmina es va realitzar l'anàlisi de les mostres al citòmetre (FC500-MPL, Beckman Coulter) en el Serveis Científicotècnics de la UB (Bellvitge, Barcelona, Espanya).

El procediment descrit en aquest apartat s'ha utilitzat en l'etapa G (apartat 1).

#### **14.- INOCULACIÓ ORTOTÒPICA DE CÈL·LULES TUMORALS.**

En aquest treball s'ha emprat la soca de ratolins atímics Balb C/nude. La manipulació i l'establiment dels animals s'ha realitzat d'acord amb les recomanacions de la federació FELASA (*Federation of European Laboratory Animal Science Associations*) per al correcte tractament i ús dels animals de laboratori sota l'aprovació del comitè ètic d'experimentació animal de l'Institut de Recerca Oncològica-IDIBELL.

Les cèl·lules PC3MM2 es van preparar a raó de  $1 \cdot 10^6$  cèl·lules en 50µl de medi sense sèrum, seguint el protocol habitual de tripsinització i de comptatge. Els ratolins es van anestesiari per sedació amb aubertine (Sigma, St. louis, MO, EEUU) per injecció intraperitoneal. Un cop oberta la cavitat abdominal i localitzada la pròstata, es van injectar  $1 \cdot 10^6$  cèl·lules a la pròstata emprant agulles d'insulina de 30G. 4 setmanes després de la injecció, els ratolins presentaven tumor i símptomes de caquèxia.

El procediment descrit en aquest apartat s'ha utilitzat en l'etapa H (apartat 1).

## 15.- LÍNIES CEL·LULARS I CULTIU CEL·LULAR.

En aquest treball s'han emprat diferents línies i variants cel·lulars indicades a continuació:

- Dues línies cel·lulars derivades de càncer de pròstata de procedència humana, concretament, PC3P i LNCaP i les corresponents variants metastàtiques, PC3MM2 i LNCaPLN3 respectivament, seleccionades *in vivo* a partir de les primeres (totes elles cedides pel Dr. Fidler, MD Anderson, Cancer Center, Houston, Tx, EEUU). Les PC3 no presenten receptors d'andrògens funcionals, mentre que les LNCaP expressen aquests receptors i són sensibles a l'estimulació d'andrògens *in vitro* (Lee, Shevrin, and Kozlowski, 1993). En la primera part del treball, tant la línia cel·lular PC3P com la seva variant metastàtica PC3MM2, es van utilitzar pel cribratge de la llibreria de *Phage Display* Ph.D.-C7C (New England Biolabs Inc., Beverly, MA ,EEUU) i per a estudiar l'eficiència d'unió de les seqüències peptídiques seleccionades a aquestes cèl·lules (com també es va fer en les cèl·lules LNCaP i LNCaPLN3) i, per tant, l'especificitat d'aquestes seqüències. En la segona part d'aquest treball, les cèl·lules PC3P i PC3MM2 es van utilitzar per a estudiar la infectivitat dels adenovirus recombinants construïts.

- La línia MDA MB 435 Lung 2 de procedència humana derivada càncer de mama (Price et al., 1990), que *in vivo* desenvolupa metàstasis espontànies al pulmó. Aquesta línia cel·lular es va utilitzar per a estudiar l'eficiència d'unió de les seqüències peptídiques seleccionades a aquestes cèl·lules i la infectivitat dels adenovirus recombinants construïts.

- La línia NP9 de procedència humana derivada d'un adenocarcinoma de pàncrees (Reyes et al., 1996) cedida pel Dr. A. Villanueva (ICO, IDIBELL, Barcelona, Espanya). Aquesta línia cel·lular va ser obtinguda de metàstasis humanes peritoneals implantades en el pàncrees de ratolins atímics i es va utilitzar per a estudiar l'eficiència d'unió de les seqüències peptídiques seleccionades a aquestes cèl·lules i la infectivitat dels adenovirus recombinants construïts.

- La línia cel·lular epitelial MDCK (*Madin Darvy Canine Kidney*) derivada d'epiteli simple de ronyó de gos i cedida per la Dra. Cano (CSIC-UAM, Madrid, Espanya). Aquesta línia cel·lular es va utilitzar per a estudiar l'eficiència d'unió de les seqüències peptídiques seleccionades a cèl·lules epitelials.

- Cultius primaris HUVEC (*Human umbilical vein endothelial cells*) cedides per la Dra. Castellarnau (UB, Dept. Biologia Cel·lular, Barcelona, Espanya). Aquesta línia cel·lular es va

utilitzar per a estudiar l'eficiència d'unió de les seqüències peptídiques seleccionades a cèl·lules endotelials.

- Cultius primaris d'hepatòcits murins soca C57/BL6 obtinguts directament de fetge de ratolí (en col·laboració amb el Dr. Alemany, ICO, IDIBELL, Barcelona, Espanya) i que es van utilitzar per a estudiar l'eficiència d'unió de les seqüències peptídiques seleccionades a hepatòcits.

- Les cèl·lules HEK293 cedides pel laboratori del Dr. Alemany (ICO, IDIBELL, Barcelona, Espanya). Aquestes són cèl·lules de ronyó embrionari humà que van ésser transformades amb fragments de DNA de l'Ad5, concretament amb un fragment de 4,5 Kb de l'extrem esquerre del genoma viral incloent el gen E1A (Graham et al., 1977). El producte del gen E1A de la cèl·lula HEK293 permet la replicació dels adenovirus deficients en replicació (mancats d'aquesta regió) com és el cas de tots el adenovirus d'aquest treball. Aquestes cèl·lules s'han utilitzat per a la generació i amplificació dels adenovirus recombinants obtinguts en aquest treball i per a l'estudi de la infectivitat d'aquests.

Les línies epitelials van créixer ancorades al substrat (plàstic) en medi DMEM:F-12 (1:1) (GIBCO, Grand Island, NY, EEUU), complementat amb piruvat sòdic 1mM, L-glutamina 2mM i 10% (v/v) sèrum boví fetal inactivat (SBF) (GIBCO, Grand Island, NY, EEUU). Per les HUVEC es va utilitzar medi M199, complementat amb 25mM HEPES i 20% (v/v) sèrum boví fetal inactivat (GIBCO, Grand Island, NY, EEUU), heparina (100µg/ml) i 30µg/ml d' ECGS (factor de creixement endotelial, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EEUU) i van créixer sobre una matriu de gelatina al 2% (p/v) per facilitar l'ancoratge cel·lular.

Les cèl·lules van créixer en monocapes adherides a la superfície interna de flascons o plaques de plàstic que es van incubar a 37°C sota una atmosfera saturada d'humitat i enriquida amb un 5% (v/v) de CO<sub>2</sub> en aire. Els subcultius es van obtenir en la fase exponencial del cultiu (dos cops per setmana) mitjançant una breu exposició de la monocapa prèviament rentada amb PBS a 37°C amb 0,25% tripsina/0,02% EDTA (p/v) i la separació de les cèl·lules per centrifugació 10 minuts a 1000rpm. Per a la quantificació de cèl·lules viables es va utilitzar el colorant d'exclusió *Trypan blue* (0,4%) i es van comptar les cèl·lules en una cambra de Neubauer.

Totes les línies emprades en aquest treball van ser testades per la presència de micoplasma (PCR Venor GeM, Minerva Biolabs, Berlín, Alemanya) seguint les instruccions del fabricant i van ser trobades lliures de micoplasma.

### **15.1.- Criopreservació de les línies cel·lulars.**

Per tal de criopreservar els estocs de les diferents línies cel·lulars, es van preparar les suspensions cel·lulars de cultius exponencials a raó de  $2 \cdot 10^6$  cèl·lules/ml de medi de congelació i es van dispensar en vials criogènics (Nunc., Dinamarca), els quals es van congelar baixant gradualment la temperatura en un contenidor especial (NALGENE Cryo 1°C Freezing Container) que es mantenia 4 hores a  $-80^{\circ}\text{C}$ . A continuació, els vials es van transferir a contenidors de nitrogen líquid ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) pel seu emmagatzemament. El medi de congelació consistia en el medi de cultiu propi de la línia cel·lular complementat amb un 20% (v/v) de SBF inactivat i un 10% (v/v) de dimetil sulfòxid (DMSO) com a crioprotector (atès que el procés de congelació malmet les cèl·lules a causa de la formació de cristalls intracel·lulars i de la pressió osmòtica). La descongelació dels vials es va fer sempre de manera ràpida en un bany maria a  $37^{\circ}\text{C}$  i en agitació. El medi de congelació es va bescanviar per medi de cultiu mitjançant dilució 1:10, centrifugació i posterior posada en marxa del cultiu en les condicions esmentades prèviament.

### **15.2.- Aïllament i cultiu d'hepatòcits murins.**

Per tal d'aïllar els hepatòcits de ratolí es va utilitzar el mètode de la doble perfusió del fetge de ratolins C57/BL6 amb col·lagenasa descrit per *Grompe et al.* (Grompe et al., 1992). Breument, aquest consisteix en, amb l'animal anestesiats, muntar un circuit entre les vies d'entrada i sortida del fetge per on es fan circular les solucions amb col·lagenasa (produint-se la segregació dels hepatòcits). El procediment amb detall es descriu a continuació:

Es va muntar un sistema de tubs que consistia en un dipòsit per a les solucions, una clau de pas per regular el flux de les solucions a perfondre i un catèter a l'extrem del tub per canular la via d'entrada al fetge, la vena cava inferior. Abans de res, es va rentar el sistema de tubs amb etanol al 70% (v/v) i després amb PBS. A continuació es va omplir el sistema de tubs amb la solució 1 que prèviament s'havia temperat a  $37^{\circ}\text{C}$ . El ratolí va ser anestesiats amb aubertine (Sigma, St. Louis, MO, EEUU) i es va immobilitzar. Es va rentar la superfície del ratolí amb etanol al 70% i es va procedir a realitzar una obertura abdominal amb cura de no malmetre la cavitat toràcica. Així es va localitzar i deixar a la vista: la vena cava inferior, la vena porta i la vena cava superior. Es va canular la vena cava inferior amb el catèter (22G), i es va obrir la clau de pas del sistema de tubs per tal de deixar passar la solució 1 fins al catèter. Es va tallar la vena porta superior, es va obrir la cavitat toràcica i es va tancar la circulació en el seu pas per la vena cava superior emprant un clamp. En aquest moment es va obrir la clau de pas (mantenint un flux de pas de 5ml per minut). Durant

aquests procés es va observar l'emblanquiment del fetge. Després de 3 i 4 minuts de perfusió de la solució 1, aquesta es va canviar per la solució 2 i es va deixar perfonent entre 3 i 4 minuts més. A continuació es va canviar per la solució 3, la qual contenia la col·lagenasa (St. Louis, MO, EEUU), obtenint-se als 9 minuts un fetge amb aparença d'un sac de cèl·lules soltes. En aquest moment, es va retirar el catèter, es va tallar la bufeta de la fels i amb cura es va retirar el fetge a una placa de petri. Amb l'ajuda d'unes pinces es va anar sacsejant el fetge per a facilitar la sortida dels hepatòcits que es va mantenir en medi de cultiu DMEM:F12 al 20% (v/v) de SBF inactivat i complementat amb antibiòtics penicil·lina i estreptomicina -100U/ml i 100µg/ml, respectivament, en una proporció 1:100 (GIBCO, Grand Island, NY, EEUU)-. La suspensió d'hepatòcits es va filtrar amb una malla de 88µm per tal de retenir les estructures tissulars, permetent el pas dels hepatòcits, que es van recollir en un tub de 50ml, tipus falcon. La suspensió cel·lular es va centrifugar (2 minuts a 300g) i es va obtenir un pellet amb els hepatòcits i per sobre d'aquests els glòbuls vermells formant una banda. Per aspiració es va retirar el medi i els glòbuls vermells. Els hepatòcits es van resuspendre en medi fresc i se'n va prendre una alíquota pel comptatge i la determinació de la viabilitat cel·lular. Es va realitzar una darrera centrifugació en les mateixes condicions i, coneixent el nombre d'hepatòcits totals, es van resuprendre en el medi de cultiu a una concentració de  $2,5 \cdot 10^5$  hepatòcits/ml.

Per a una millor adherència dels hepatòcits, es van sembrar en plaques de cultiu prèviament tractades amb col·lagen. Els hepatòcits es van mantenir en les mateixes condicions de cultiu que la resta de les línies cel·lulars, és a dir, en un incubador a 37°C i en una atmosfera humidificada al 5% en CO<sub>2</sub>. A les 16 hores de la sembra, els hepatòcits adherits van adoptar una morfologia d'aparença semblant als ous ferrats.

## **16.- METODOLOGIA ADDICIONAL EMPRADA.**

### **16.1.- Obtenció i transformació de bacteries químicament competents.**

Per a l'obtenció de bacteries químicament competents (mètode Nujima) es van inocular 250ml de LB amb 2,5ml d'un precultiu bacterià (18 hores a 37°C en agitació) i es va incubar a 37 °C en agitació fins que el cultiu va assolir una DO a 600nm de 0,6. El cultiu es va refredar 10 minuts i es va centrifugar a 2500g durant 10 minuts a 4°C. El pellet es va resuspendre en 84ml de TB i es va incubar 10 minuts a 4°C. A continuació es va centrifugar a 4500rpm 10 minuts a 4°C i es va resuspendre el pellet en 20ml de TB i DMSO al 7%. Se'n van fer alíquotes que es van mantenir a -80°C.

Per a la transformació de bactèries competents es van afegir 3µl de DNA a transformar a 100µl de bacteris competents i es va incubar 30 minuts a 4°C. A continuació es va realitzar un xoc tèrmic per a desestructurar la membrana bacteriana (45 segons a 42°C i 2 minuts en gel). Seguidament es va afegir 1ml de LB i es va incubar 1 hora a 37°C en agitació, dels quals se'n van sembrar 200µl en plaques de LB-Agar amb l'antibiòtic corresponent.

El procediment descrit en aquest apartat s'ha utilitzat en l'etapa E (apartat 1).

### **16.2.- Obtenció de DNA plasmídic.**

Per a l'obtenció de DNA plasmídic (50µl) es va emprar el kit *GFX Micro Plasmid Prep Kit* (Amersham Biosciences, Little Chalfont Buckinghamshire, Regne Unit) seguint el procediment indicat pel fabricant. Per a l'obtenció de majors quantitats de DNA plasmídic (300µl), es va emprar el kit *QIAfilter Plasmid Maxi Kit* (Qiagen GmbH, Hilden, Alemanya) seguint el procediment indicat pel fabricant.

El procediment descrit en aquest apartat s'ha utilitzat en l'etapa E (apartat 1).

### **16.3.- Purificació de DNA plasmídic.**

La purificació de DNA plasmídic es va realitzar emprant el kit *GFX PCR DNA and Gel band purification Kit* (Amersham Biosciences, Little Chalfont Buckinghamshire, Regne Unit) seguint el procediment indicat pel fabricant.

El procediment descrit en aquest apartat s'ha utilitzat en l'etapa E (apartat 1).

### **16.4.- Obtenció de DNA adenoviral.**

#### a) Obtenció de DNA adenoviral a partir del sobrenedant de cèl·lules infectades.

Es va partir de 340µl del sobrenedant de cèl·lules HEK293 infectades als quals se'ls va afegir 16µl EDTA 0.5M pH 8.0 (20mM final), 20µl SDS 10% (0.5% final), 8µl proteïnasa K 10mg/ml (0.2µg/µl final) i es va incubar 2 hores a 56°C. Seguidament, després d'inactivar la proteïnasa K amb un tractament de 10 minuts a 90°C, es va procedir a l'extracció del DNA pel mètode estàndard de fenol:cloroform. El pellet de DNA es va dissoldre en 25µl d'aigua bidestil·lada. Per amplificar la regió d'interès per PCR se'n van usar 5µl.

Per aquest procediment s'obté molt poca quantitat de DNA i es fa servir quan no és possible obtenir el DNA a partir de les cèl·lules infectades ni del virus purificat, concretament en la generació dels adenovirus recombinants, abans de continuar amb l'amplificació d'aquests.



**b) Obtenció de DNA de l'adenovirus a partir de cèl·lules infectades (Mètode HIRT'S).**

Les cèl·lules HEK293 es van sembrar i infectar tal i com s'explica a l'apartat 7. Quan l'efecte citopàtic va ser complet, es va recollir les cèl·lules infectades i el sobrenedant i es va centrifugar 5 minuts a 1250rpm. El pellet cel·lular es va rentar amb 1,5ml de PBS i es va centrifugar 5 minuts a 6000rpm. A continuació, es va dissoldre el pellet cel·lular en 350µl d'aigua bidestil·lada, als quals se'ls van afegir 350µl de la solució HIRT's 2X i es va incubar a 56°C durant 1 hora. Per tal de precipitar el DNA cel·lular, es van afegir 200µl de NaCl 5M (concentració final 1M) i es va incubar a 4°C entre 8 i 16 hores. El DNA cel·lular es va descartar mitjançant una centrifugació de 30 minuts a 13000rpm a 4°C, recuperant el sobrenedant clar. A aquest se li va afegir *RNAasa* a una concentració final de 100µg/µl, que es va incubar a 37°C durant 1 hora. L'extracció del DNA viral es va realitzar per fenol:cloroform i es va precipitar amb etanol al 2% en acetat sòdic (p/v). El DNA es va dissoldre en 25µl d'aigua bidestil·lada o TE pH 8.0 per a la seqüenciació (apartat 16.7).

Atès que aquest mètode permet l'obtenció de la quantitat de DNA suficient per a fer-ne una anàlisi de restricció i de seqüenciació i no és necessari disposar del vector purificat, es va utilitzar en els primers passos de l'amplificació dels adenovirus recombinants (etapa F, apartat 1).

**c) Obtenció de DNA de l'adenovirus a partir del virus purificat.**

A partir de  $2 \times 10^{10}$ pv, que es corresponen a 1µg de DNA, se'ls va afegir la mescla següent: EDTA pH 8,0 (16µl 0.5M), SDS (20µl 10%), Proteïnasa k (8µl, 10mg/ml) i TE pH 8,0 fins a un volum final de 400µl. La mescla es va incubar a 56°C durant 2 hores. Després de la inactivació de la proteïnasa K (10 minuts a 90°C), es va deixar temperar, obtenint el DNA viral per extracció amb fenol:cloroform i posterior precipitació amb etanol al 2% en acetat sòdic (p/v). El *pellet* de DNA viral es va dissoldre en 25µl d'aigua bidestil·lada o TE pH 8,0 per a la seqüenciació.

Aquest procediment s'ha emprat per a comprovar la identitat de tots els adenovirus que han estat purificats en aquest treball i s'ha utilitzat en l'etapa F (apartat 1).

**16.5.- Anàlisi per PCR.**

El DNA plasmídic obtingut de les colònies resultants de la recombinació homòloga es van analitzar per PCR per determinar si contenien l'ínter. Per a això es van utilitzar dos oligonucleòtids flanquejant el punt d'inserció de les seqüències. La seqüència dels oligonucleòtids i la mescla de reacció de la PCR es mostren a continuació:

<b>oligonucleòtids</b> <sup>1</sup> : <i>forward</i> 5' GGAGACAAAACCTAAACCTGT 3'	
<i>reverse</i> 5' CCCATGAAAATGACATAG 3'	
<b>mescla de reacció:</b> T10X <sup>2</sup>	2,5µl
dNTPs 1mM	2,5µl
<i>forward</i> 100µM	0,25µl
<i>reverse</i> 100µM	0,25µl
Taq polimerasa <sup>3</sup>	0,15µl
DNA	2,5µl
H <sub>2</sub> O	16,85µl

<sup>1</sup>Oligonucleòtids d'Invitrogen, Life Technologies. <sup>2</sup>Tampó subministrat juntament amb la Taq polimerasa (Roche, Mannheim, Alemanya): Tris-HCl 100mM, MgCl<sub>2</sub> 15mM, KCl 500mM. <sup>3</sup>Roche, Mannheim, Alemanya.

La reacció es va dur a terme amb el cicle de temps i temperatures: 1) 5 minuts a 95°C; 2) 30 segons a 95°C; 3) 1 minut a 55°C; 4) 1 minut a 72°C; 5) x 30 vegades des de 2); 6) 5 minuts 72°C.

El procediment descrit en aquest apartat s'ha utilitzat en l'etapa E (apartat 1).

### 16.6.- Digestió enzimàtica.

Tant el DNA plasmídic provinent de les colònies resultants de la mutagènesi dirigida i de la recombinació homòloga com el DNA viral, es va digerir emprant 1 unitat d'enzim de restricció, el tampó adient a l'enzim proporcionat per la mateixa casa comercial 10X i aigua bidestil·lada (en un volum final de 40µl). Per a la majoria dels enzims de restricció la reacció de digestió es va realitzar durant 2 hores a 37 °C.

El procediment descrit en aquest apartat s'ha utilitzat en les etapes E i F (apartat 1).

### 16.7.- Seqüenciació de DNA.

Els DNAs es van seqüenciar de forma automàtica (*ABI PRISM 377 DNA Sequencer*) emprant els oligonucleòtids indicats en la taula M.3 i el kit *ABI PRISM® Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction v2.0* (Applied Biosystems).

Mostra a seqüenciar	Seqüència oligonucleòtid
DNA dels fags	5'- <sup>OH</sup> CCC TCA TAG TTA GCG TAA CG-3'
Plasmidis pXK3.1 recombinants	5' GGAGACAAAACCTAAACCTGT 3'
Plasmidis pVK50TL recombinants	5' GGAGACAAAACCTAAACCTGT 3'
DNA adenoviral	5' GGAGACAAAACCTAAACCTGT 3'

**Taula M.3.- Seqüència dels oligonucleòtids emprats per a la comprovació per seqüenciació automàtica dels DNAs generats en aquest treball.**

La mescla de reacció de seqüenciació contenia: 2µl de Big Dye; 3µl oligonucleòtid 0,1pmol/µl; 3µl H<sub>2</sub>O bidestil·lada i el DNA a seqüenciar. La reacció es va dur a terme en un termociclador PTC<sup>TM</sup>-100 (MJ Research Inc.) i amb el cicle de temps i temperatures: 1) 3 minuts a 94°C; 2) 30 segons a 94°C; 3) 15 segons a 50°C; 4) 4 minuts a 60°C; 5) x 27 vegades des de 2); 6) 4 minuts 60°C.

Per a la purificació del producte de la reacció de seqüenciació es van utilitzar les columnes AutoSeq<sup>TM</sup> G-50 (Amersham Pharmacia Biotech Inc) seguint el procediment recomanat pel fabricant. El producte purificat es va seqüenciar (Servei de seqüenciació de l'IRO, *ABI PRISM 377 DNA Sequencer*).

El procediment descrit en aquest apartat s'ha utilitzat en les etapes B,E i F (apartat 1).

### **16.8.- Càlcul del nombre de partícules virals.**

La titulació del nombre de les partícules virals per ml<sup>-1</sup> es va realitzar pel mètode espectrofotomètric (Maizel, White, and Scharff, 1968), a partir de la mesura de la quantitat de DNA viral (absorbància a 260nm). La ràtio entre l'absorbància de la mostra a 260nm i 280nm ens dóna idea del grau de contaminació de la mostra, que en condicions òptimes ha d'estar al voltant d'1,4.

El DNA viral es va alliberar de les càpsides mesclant 5µl de la suspensió viral amb 95µl del tampó de lisi i es va incubar durant 5 minuts a 56°C. A continuació es va mesurar l'absorbància de la mostra a les longituds d'ona de 260nm i 280nm. El càlcul de partícules virals/ml es va realitzar considerant que 1 DO a 260nm equival a 1,1x10<sup>12</sup> partícules virals.

El procediment descrit en aquest apartat s'ha utilitzat en l'etapa F (apartat 1).

### **16.9.- Electroforesi de proteïnes.**

Per comprovar que els adenovirus recombinants havien incorporat correctament les fibres modificades a la càpside, es va comparar el perfil proteic dels adenovirus recombinants amb els de l'Ad5 amb les fibres intactes (Mahanivong et al., 2006). Per a això es van desnaturalitzar les proteïnes adenovirals de 8x10<sup>9</sup> partícules virals purificades (5 minuts a 95°C) i es van separar electroforèticament en un gel d'acrilamida-SDS al 8% (2 hores a 100V). Com a control de pes molecular es va utilitzar el marcador de pes molecular *Pre-stained SDS-Page standards* (BioRad laboratories). Per a la visualització de les proteïnes es va realitzar una tinció amb nitrat de plata (al 0,2% p/v) i un revelat amb carbonat (Sambrook and Russell, 1991).

El procediment descrit en aquest apartat s'ha utilitzat en l'etapa F (apartat 1).

#### **16.10.- Mesura de l'activitat de gens reporters.**

La infectivitat en els assajos *in vitro* i *in vivo* s'ha determinat mesurant l'activitat de la luciferasa dels extractes cel·lulars i tissulars amb el kit comercial *Luciferasa Assay System* (Promega Inc, Madison, WI, EEUU).

Per la mesura de l'activitat luciferasa, es van mesclar 8µl de l'extracte cel·lular o tissular amb 20µl del substrat LAR (*Luciferasa Assay Reagent*, Promega) a TA per a una òptima quantificació de l'activitat luciferasa. La mesura es realitzà en un luminòmetre (Berthold Junior, Berthold) durant 10 segons.

El procediment descrit en aquest apartat s'ha utilitzat en les etapes G i H (apartat 1).

#### **16.11.- Quantificació de proteïna.**

Per normalitzar les mesures de la bioluminiscència dels extractes cel·lulars i tissulars obtinguts en els assajos d'infectivitat *in vitro* i *in vivo*, es va quantificar la concentració de la proteïna.

En el cas dels assajos d'infectivitat *in vitro*, la quantificació de la concentració de proteïna de l'extracte cel·lular es determinà pel mètode Bradford (Bradford, 1976) fent ús del kit comercial *Bio-Rad Protein Assay* (BioRad, Alemanya), ja que aquest no interfereix amb els detergents presents en el tampó de lisi RLB. 5µl de la mostra es van mesclar amb 50µl de reactiu de Bradford. Després de 5 minuts a TA, es va quantificar per lectura en un espectrofotòmetre a una longitud d'ona de 595nm.

En el cas dels assajos d'infectivitat *in vivo*, la quantificació de proteïna es va determinar emprant el BCA Protein Assay Kit (Pierce). Aquest reactiu no té interferències amb el tampó de lisi usat. 10µl d'una dilució 1/10 de l'extracte tissular es van mesclar amb el reactiu BCA (30 minuts a 37°C). Transcorregut aquest temps, es va quantificar per lectura en un espectrofotòmetre a una longitud d'ona de 540nm.

En ambdós casos, la quantitat de proteïna present en l'extracte es va obtenir extrapolant les absorbàncies obtingudes en una recta patró. Aquesta recta patró es va construir a partir de les absorbàncies determinades per diferents solucions patró d'albumina sèrica bovina (BSA). Les mostres es van analitzar per duplicat.

Els procediments descrits en aquest apartat s'han utilitzat en les etapes G i H (apartat 1).

## 17.- ANÀLISI INFORMÀTIC DE LES SEQÜÈNCIES PEPTÍDIQUES.

Les seqüències d'aminoàcids dels heptapeptids dels fags seleccionats van ser obtingudes a partir de la traducció de la seqüència de nucleòtids corresponent mitjançant el programa informàtic DNA2PRO7 (<http://relic.bio.anl.gov/programs.aspx>) dissenyat específicament per aquesta finalitat (Mandava et al., 2004). L'anàlisi informàtic de les seqüències es va realitzar mitjançant el programa informàtic Clustal W 1.83 (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) que va alinear les seqüències peptídiques i aquest alineament va ser analitzat mitjançant el programa informàtic Treeview 1.6.5 que ens forma diagrames de relació en forma d'arbre de les seqüències prèviament alineades. Amb la finalitat de conèixer si aquestes seqüències presentaven homologies amb proteïnes cel·lulars, es van introduir i enfrontar a la base de dades del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

Els procediments descrits en aquest apartat s'han utilitzat en les etapes B i C (apartat 1).

## 18.- COMPOSICIÓ DE LES SOLUCIONS EMPRADES.

- **Agarose top/XGal/IPTG:** 1g MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O i 7g d'agarosa per 1L LB amb XGal 50 mg/ml (53,3µl/10ml d'*Agarose top*; Sigma, St. Louis, MO, EEUU) i IPTG 100mM (139,5µl/10 ml *Agarose top*).
- **DMEM-BSA:** DMEM, 1%BSA.
- **HBS 2X:** NaCl 274mM, HEPES 50mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.5mM en H<sub>2</sub>O pH ajustat a 6,95 amb NaOH.
- **Iodide Buffer :** 10mM Tris-HCl pH8; 1mM EDTA; 4M NaI.
- **LB:** 10g de Bactotripton, 5g d'extracte de llevat i 5g de NaCl per L.
- **LB-Agar:** 15g agar/L LB.
- **PBS:** 137mM NaCl, 2,7mM KCl, 4,7mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1,4mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.
- **PBS-albúmina:** PBS<sup>++</sup>, 1 % d'albúmina sèrica bovina, 5% sèrum fetal boví.
- **PBS-BSA:** PBS, 1%BSA.
- **PEG/NaCl:** 20% (p/v) polietilen-glicol-8000; 2,5M NaCl.
- **Solució HIRT's 2X:** 10mM Tris pH 8.0, 20mM EDTA, 1.2% SDS i 200µg/ml de proteïnasa K).
- **Solució 1 per a l'aïllament d'hepatòcits murins:** 1mM Hepes pH 7.4, 0.5mM EGTA, i HBSS fins a 100ml, GIBCO, Grand Island, NY, EEUU.
- **Solució 2 per a l'aïllament d'hepatòcits murins:** 1mM Hepes pH 7.4, 1mM ClCa<sub>2</sub>, 0,5mM MgCl<sub>2</sub> i HBSS fins a 100ml.

- **Solució 3 per a l'aïllament d'hepatòcits murins:** 0.5mg/ml col·lagenasa en solució 2.
- **Tampó de lisi:** Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM, 0.1% SDS, pH 8.0.
- **Tampó de càrrega:** 50% de glicerol; 5% SDS; 0.5% blau de bromofenol; 5%  $\beta$ -mercaptoetanol en Tris 630mM pH 6.8)
- **TB:** 3g de PIPES, 2,2g de  $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 18,6g de KCl, 10,9g de  $\text{MgCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , pH ajustat a 6,7 per L.
- **TBS:** 50mM Tris-HCl; 150mM NaCl.
- **TE:** 10mM Tris-HCl pH 8; 1mM EDTA.

*Resultats*





## **1.- IDENTIFICACIÓ DE SEQÜÈNCIES PEPTÍDIQUES ESPECÍFIQUES PER A CÈL·LULES METASTÀSIQUES DE CÀNCER DE PRÒSTATA.**

### **1.1.- Cribratge i selecció de fags que s'uneixen específicament a cèl·lules PC3MM2.**

El principal objectiu d'aquest treball és el direccionament del vector adenoviral a cèl·lules metastàtiques de càncer de pròstata mitjançant el reconeixement específic de seqüències peptídiques.

En el desenvolupament experimental vam treballar amb les cèl·lules PC3MM2 de càncer de pròstata. Aquesta variant cel·lular fou seleccionada a partir de la línia parental PC3P derivada d'un carcinoma prostàtic humà, manté les característiques d'hormonoindependència als andrògens i desenvolupa metàstasis espontànies quan s'inocula ortotòpicament a ratolins immunodeprimits (Pettaway et al., 1996).

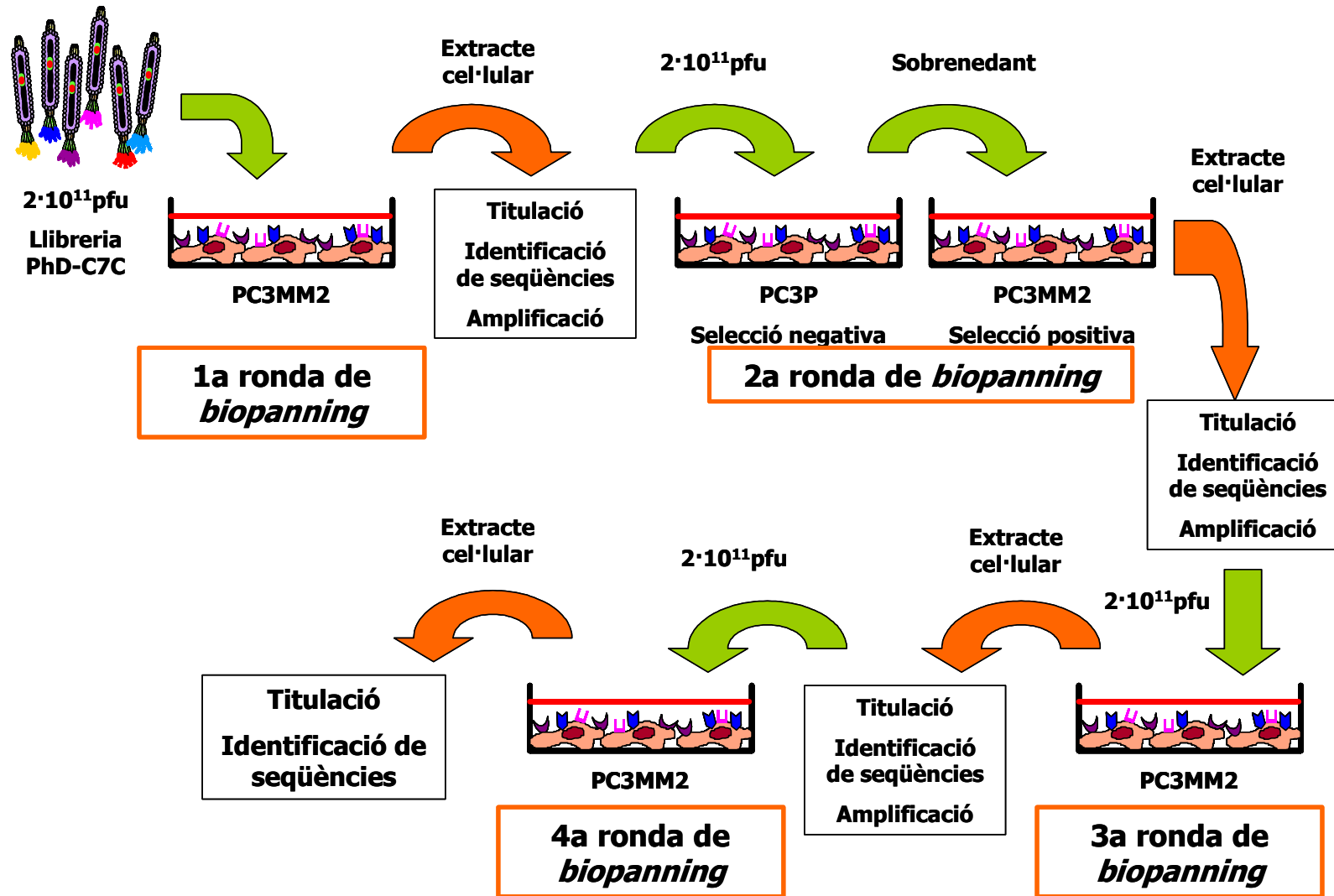
Per seleccionar la seqüència més adient pel reconeixement de les nostres dianes cel·lulars vam emprar una llibreria de pèptids que conté  $3,7 \cdot 10^9$  seqüències peptídiques de 7 aminoàcids (*Phage Display Ph.D.-C7C™*, New England Biolabs Inc., Beverly, MA, USA). En aquest tipus de llibreries combinatòries de *Phage Display*, les seqüències arbitràries són expressades com a proteïna de fusió de la proteïna pIII de la càpside de fags filamentosos com M13, esdevenint aquests, vehicles d'expressió que mantenen la seva capacitat de replicar i portadors de la seqüència nucleotídica que codifica per les seqüències peptídiques (Smith and Petrenko, 1997; Willats, 2002). Concretament, la llibreria emprada en aquest treball conté  $3,7 \cdot 10^9$  clons de fags que en total expressen totes les possibles seqüències de 7 aminoàcids ( $1,28 \cdot 10^9$  seqüències). En els extrems dels heptapèptids hi trobem dues cisteïnes (Cys), fet que els dona una conformació cíclica deguda als ponts disulfur que es formen sota condicions no reductores entre ambdós residus terminals. Precisament per aquestes característiques vam escollir aquest tipus de llibreria, ja que els pèptids cíclics presenten més avantatges que els lineals afavorint les interaccions proteïna-pèptid, facilitant la interacció amb les proteïnes de la superfície cel·lular (Bockmann, Drosten, and Putzer, 2005; Bockmann et al., 2005; Essler and Ruoslahti, 2002; Jager et al., 2007; Robinson et al., 2005).

La selecció de seqüències peptídiques que reconeguin motius concrets de proteïnes de la superfície cel·lular, la realitzarem mitjançant cribratge de la llibreria de fags sobre les cèl·lules en cultiu (Smothers, Henikoff, and Carter, 2002), tal com es descriu a Materials i Mètodes (apartat 2). Per aquest procediment -que en anglès s'anomena *whole-cell panning*

o *biopanning*, el que vam seleccionar van ser els fags que de manera específica havien interaccionat amb dianes de la superfície cel·lular. Aquesta estratègia ha estat emprada prèviament per la identificació de seqüències peptídiques que interaccionen amb cèl·lules endotelials (Giordano et al., 2001; Nicklin et al., 2000) o cèl·lules tumorals de melanoma (Kim et al., 2006), de tiroides (Bockmann, Drosten, and Putzer, 2005), de pròstata (Romanov, Durand, and Petrenko, 2001), de mama (Robinson and Rosenzweig, 2006), de còlon (Rasmussen et al., 2002; Zhang et al., 2007) o de carcinoma hepatocel·lular (Shimizu et al., 2007) entre d'altres.

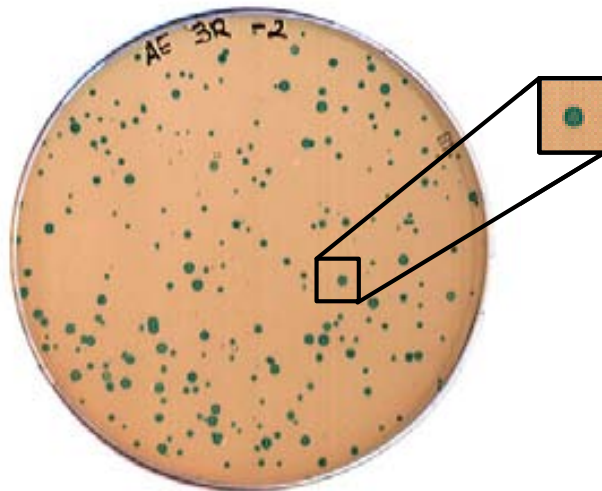
El primer pas fou la selecció dels fags de la llibreria i per això es van incubar ( $2 \cdot 10^{11}$  pfu) sobre les monocapes de les cèl·lules PC3MM2 en cultiu. Mitjançant una sèrie de rentats vam eliminar els fags que no s'havien unit a la superfície cel·lular i vam recuperar els fags ancorats a les cèl·lules. Aquests fags es van amplificar a través de la infecció del bacteri hoste del fag (*E.coli* soca ER2738) i van ser emprats novament en un nou *biopanning* sobre les cèl·lules de pròstata en cultiu. Aquesta sèrie de procediments de selecció i recuperació dels fags és el que anomenem "ronda".

En aquest treball, vam fer quatre rondes successives de *biopanning in vitro* alternant les cèl·lules diana (com s'indica a Materials i Mètodes apartat 2), amb la finalitat d'obtenir un enriquiment selectiu del repertori de fags portadors de seqüències reconeixedores de les cèl·lules metastàtiques i no pas de les poc metastàtiques (figura R.1).



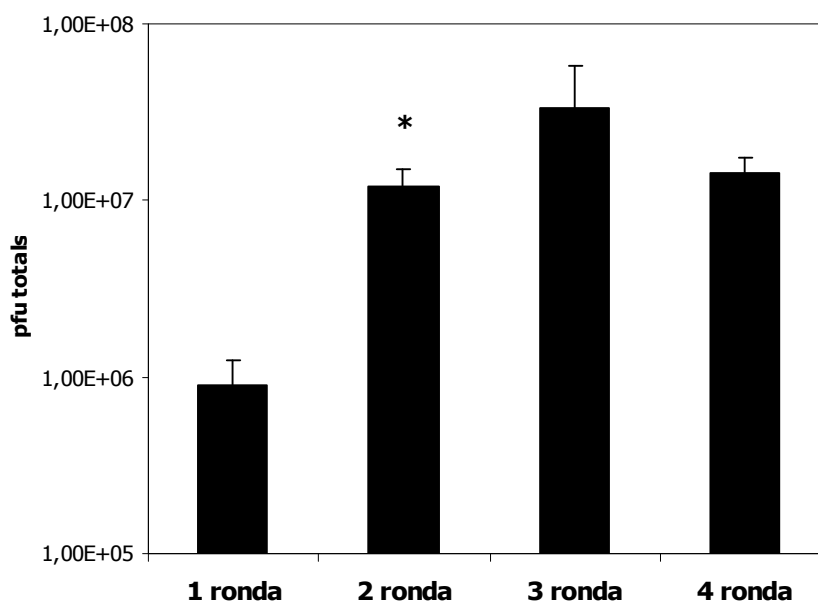
**Figura R.1.- Representació esquemàtica del cribratge de la llibreria de *Phage Display* Ph.D.-C7C.** Aquest va consistir en una primera selecció positiva de fags capaços d'unir-se a la superfície de les cèl·lules metastàtiques PC3MM2, a continuació una selecció negativa sobre la línia parental PC3P (poc metastàtica) seguida d'una positiva sobre PC3MM2, per acabar amb dues noves i successives seleccions positives de seqüències reconeixedores de la variant metastàtica PC3MM2. Després de cada ronda de *biopanning* els extractes cel·lulars es van titular i amplificar per a seguir amb les rondes de *biopanning* següents.

Així doncs, va consistir en una primera selecció sobre les cèl·lules metastàtiques PC3MM2, a continuació, una selecció negativa sobre la línia parental PC3P (poc metastàtica) seguida d'una positiva sobre les cèl·lules PC3MM2, per acabar amb dues noves i successives seleccions positives sobre la variant metastàtica PC3MM2. En tots els casos, les rondes de *biopanning* consistiren en la incubació de  $2 \cdot 10^{11}$  *pfu* (de la llibreria inicial o dels amplificats de la ronda anterior) amb les cèl·lules durant 1 hora i es va realitzar a 4°C per tal d'evitar la internalització dels fags, atès que la nostra finalitat era la identificació de seqüències reconeixedores de la superfície cel·lular. Cada ronda es va realitzar per triplicat i es va contar el número de calbes que els fags havien generat sobre els bacteris hostes de la placa d'agar (*E.coli* soca ER2738). La presència de calbes fou revelada pels sustractes XGal i IPTG inclosos a l'agar, atès que els fags de la llibreria expressen el gen *lacZ $\alpha$* . En la figura R.2 es mostra una fotografia d'una placa de titulació de fags. Cadascuna de les calbes representa una població monoclonal de fags portadors de la mateixa seqüència peptídica a la càpside.



**Figura R.2.- Fotografia típica d'una placa de LB agar de titulació.** Es van inocular 10 $\mu$ l de l'elució de fags de la tercera ronda de *biopanning* prèviament incubats amb 200 $\mu$ l d'un cultiu exponencial d'*E.coli* soca ER2738 i després de la incubació es van contar les calbes blaves corresponents als fags seleccionats. El requadre mostra una ampliació de la placa que conté una calba aïllada.

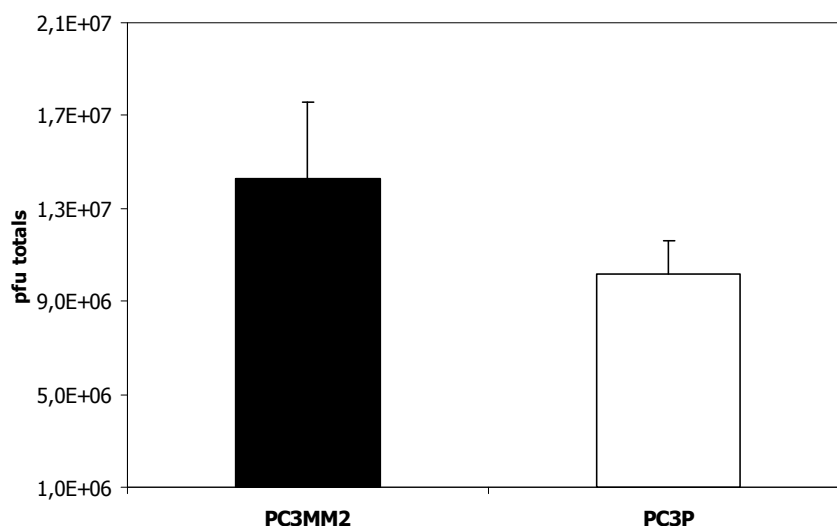
En la figura R.3 es mostra el resultat obtingut després de cada ronda de *biopanning*. El nombre de calbes de cada ronda s'indica com a *pfu* (*plaque forming units*). De les  $2 \cdot 10^{11}$  *pfu* incubades inicialment a la primera ronda, se'n van recuperar  $9,05 \cdot 10^5 \pm 3,27 \cdot 10^5$  *pfu*. Així doncs, l'eficiència d'unió (relació entre les *pfus* recuperades i les *pfus* de partida) del pool de fags de la llibreria a les cèl·lules PC3MM2 va ser de  $4,53 \cdot 10^{-6} \pm 1,63 \cdot 10^{-6}$ .



**Figura R.3. - Representació del nombre de fags de la llibreria Ph.D.-C7C recuperats en cadascuna de les rondes de *biopanning* sobre les cèl·lules PC3MM2.** Les barres del diagrama indiquen el nombre i l'error típic de fags recuperats (pfu) després de cada ronda de *biopanning* sobre les cèl·lules PC3MM2. Els assajos es van fer per triplicat incubant en cada cas  $2 \cdot 10^{11}$  pfu. El símbol \* indica diferència estadísticament significativa respecte el nombre de fags recuperats en la ronda anterior ( $p \leq 0,02$ ).

Com es pot veure en la figura R.3, a la segona ronda es va recuperar un nombre de fags significativament superior ( $1,21 \cdot 10^7$  pfu  $\pm 2,94 \cdot 10^6$ ;  $p \leq 0,02$ ) respecte als de la primera ronda ( $9,07 \cdot 10^5$  pfu  $\pm 3,27 \cdot 10^5$ ) corresponent a un augment de 13 vegades respecte a l'anterior, suggerint un possible enriquiment en fags reconeguts per les cèl·lules diana. En canvi, aquest possible enriquiment no fou tan espectacular entre la segona i la tercera ronda ( $3,32 \cdot 10^7 \pm 2,47 \cdot 10^7$  pfu) que va representar un augment de 2,7 vegades. Seguint aquesta tendència, en la quarta ronda el nombre de fags recuperats va ser inferior al de la tercera ronda ( $1,43 \cdot 10^7$  pfu  $\pm 3,3 \cdot 10^6$ ), suggerint-nos que la realització de rondes posteriors ja no resultaria en un augment del nombre de fags reconeguts per les cèl·lules PC3MM2.

Per analitzar si la població de fags seleccionats sobre les cèl·lules metastàtiques era reconeguda per les de la línia parental, vam realitzar en paral·lel una quarta ronda de *biopanning* sobre les cèl·lules PC3P (figura R.4). La titulació obtinguda en aquest cas ( $1,02 \cdot 10^7$  pfu  $\pm 1,45 \cdot 10^6$ ) va ser inferior (malgrat no ser significativa) que la de les PC3MM2 ( $1,43 \cdot 10^7$  pfu  $\pm 3,3 \cdot 10^6$ ) (figura R.4), recolzant l'estratègia de selecció que havíem fet servir.



**Figura R.4.- Representació del nombre de fags recuperats en la quarta ronda de *biopanning* sobre les cèl·lules PC3MM2 i PC3P.** Les barres del diagrama indiquen el nombre i l'error típic de fags recuperats (*pfu*) després de la quarta ronda de *biopanning* sobre les cèl·lules PC3MM2 i PC3P. Els assajos es van fer per triplicat incubant en cada cas  $2 \cdot 10^{11}$  *pfu*.

## 1.2.- Identificació i anàlisi de les seqüències peptídiques reconegudes per les cèl·lules.

Per identificar els fags recuperats a les respectives rondes de *biopanning* sobre les PC3MM2, vam seleccionar aleatòriament 90 calbes procedents de les quatre rondes i vam procedir a seqüenciar el DNA. Cadascuna de les calbes seleccionades rebé un número aleatori i correlatiu per llur posterior identificació. Concretament, de la primera ronda es van recuperar 15 calbes, 5 de cada triplicat (seqüències peptídiques de la 1 a la 15). De la segona ronda se'n van recuperar el mateix número i també 5 de cada triplicat (seqüències de la 16 a la 30). En el cas de la tercera (de la seqüència 31 a la 60) i quarta ronda (de la seqüència 61 a la 90) se'n van recuperar 10 de cada triplicat.

Les calbes es van recuperar de les plaques de titulació que no en tinguessin més de 100 assegurant-nos així que cada calba contindria una població monoclonal de fags. Se'n va isolar el DNA de cadascuna d'elles i per PCR es va amplificar la seqüència de DNA codificant de l'heptapeptid de la càpside del fag per seqüenciar-la. La reacció prèvia es féu amb l'encebador -96gIII ( $5' \text{-}^{\text{OH}}\text{CCC TCA TAG TTA GCG TAA CG-3}'$ ) corresponent a l'extrem N-terminal de la proteïna pIII del fag i utilitzant el *Big Dye<sup>TM</sup> Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction v2.0* (*Perkin Elmer Biosystems, Foster City, CA, EEUU*) (apartat 16.7 de Materials i Mètodes). La seqüenciació es va fer automàticament (*ABI PRISM 377 DNA Sequencer, Servei de seqüenciació de l'IRO*)

Les seqüències d'aminoàcids dels heptapeptids dels nostres fags seleccionats van ser obtingudes a partir de la traducció de la seqüència de nucleòtids mitjançant el programa

informàtic DNA2PRO7 (<http://relic.bio.anl.gov/programs.aspx>) dissenyat específicament per a aquesta finalitat (Mandava et al., 2004). En la taula R.1 es mostra una relació de les seqüències peptídiques obtingudes de les 90 calbes analitzades indicant el número aleatori que se'ls va assignar, classificades segons la ronda de selecció i el triplicat d'on van ser obtingudes.

	Primer triplicat		Segon triplicat		Tercer triplicat	
	Núm. calba	Seqüència peptídica	Núm. calba	Seqüència peptídica	Núm. calba	Seqüència peptídica
<b>Primera ronda de selecció</b>	1	CRSPSATIC	6	CTPSGAGIC	11	CESLPMIYC
	2	CLSPQTTNC	7	CMPTHNQQC	12	CHTPKFPGC
	3	CSGLLMYLC	8	CPIFTTHQC	13	CARNNTNQC
	4	CVMLNSWVC	9	CSPLVPRAC	14	CTPQNTTMC
	5	CWHPTLPTC	10	CLYSSGLAC	15	CPLFPSSSC
<b>Segona ronda de selecció</b>	16	CNLSRQMC	21	CVSLAYVRC	26	CPWQMPLDC
	17	CMTPGARLC	22	CEGSPNMC	27	CSGLLTQRC
	18	CYSPKAHAC	23	CPLTHPHLC	28	CAPTETSHC
	19	CHPLTANNC	24	CPEPEANC	29	CTTPSSPTC
	20	CKSPSTTC	25	CSQTLKSRC	30	CNLSNSKC
<b>Tercera ronda de selecció</b>	31	CQAWNKTTC	41	CSPARFSSC	51	CYPSRSPLC
	32	CTNNSVVHC	42	CNTASTALC	52	CSKHTPFSC
	33	CNHHRGITC	43	CLLPKHPMC	53	CYSGPHSPC
	34	CEHKWYKGC	44	CLDLTSLVC	54	CLRWHPMLC
	35	CSPWEAPQC	45	CAPHLRPMC	55	CSTPIALAC
	36	CQRAAAPHC	46	CSTLPWKTC	56	CFPSQMKSC
	37	CSETPPYTC	47	CTLAPTAWC	57	CQPLHPQPC
	38	CNSQLYQHC	48	CESPMVLMC	58	CTPSGAGIC
	39	CQGWHRIPC	49	CSGLLPALC	59	CPLAQRPMC
	40	n.d.	50	CPLHQRPMC	60	CHSLNEHYC
<b>Quarta ronda de selecció</b>	61	CTYPWQPAC	71	CAPHLRPMC	81	CFPPMFYDC
	62	CRTSTSLAC	72	CDLPMHPMC	82	CPLQQRPMC
	63	CQSTNRPSC	73	CAPHLRPMC	83	CFPPMFYDC
	64	CPTLMKLVC	74	CNYRNAMIC	84	CPLSQRPMC
	65	CPLSQRPMC	75	CDLPMHPMC	85	CAPHLRPMC
	66	CNKNNTHTC	76	CPLHQRPMC	86	CPMHQRPMC
	67	CLLFPRLLC	77	CERSHMRSC	87	CPPKDRPMC
	68	CPLSQRPMC	78	CDTNSSAKC	88	CPLAQRPMC
	69	CLPPMFYDC	79	CPLHQRPMC	89	CWPDRSRAC
	70	CPLDQRPMC	80	CPLHQRPMC	90	CFPPMFYDC

**Taula R.1.- Relació de seqüències peptídiques obtingudes de les quatre rondes sobre les PC3MM2.**

Les seqüències peptídiques es troben classificades segons la ronda de selecció i el triplicat de la ronda d'on van ser recuperades. El Núm. de calba indica el número aleatori que es va assignar a la calba. Està marcat com a n.d. (no determinat) el cas on no fou possible obtenir la seqüència emprant els procediments descrits.

De les 90 calbes recuperades, es van identificar 81 seqüències peptídiques diferents i 8 repetides. Només una de les calbes no va poder ser identificada, ja que la qualitat del DNA obtingut no fou prou bona per seqüenciar-lo. Pel que fa a les repeticions, ni a la primera ni a la segona ronda vam trobar-ne, però sí algunes similituds en la seqüència d'aminoàcids, que, de fet, també es mantingueren en rondes posteriors (taula R.1).

En el cas de la primera ronda, les seqüències número 2 (CLSPQ**TTNC**), 8 (CPIF**TT**HQC) i 14 (CTPQ**NTTMC**), cadascuna recuperada d'un triplicat diferent, presentaven 2 residus de Treonina (T) en posicions 6-7 o bé 5-6. La seqüència 29 (C**TT**PSPTC) recuperada de la segona ronda en el tercer triplicat també presentava aquesta característica, però en cap de les altres seqüències obtingudes en les rondes posteriors es va tornar a repetir aquesta característica. Les seqüències número 6 (C**TP**SGAGIC), 12 (CH**TP**KFPGC) i 14 (C**TP**QNTTMC) obtingudes a la primera ronda -les dues últimes del mateix triplicat- presentaven un residu de Treonina (T) seguit d'un de Prolina (P), com les seqüències 17 (CM**TP**GARLC) i 29 (C**TT**PSPTC) de la segona ronda primer triplicat i tercer triplicat respectivament i les seqüències 37 (CSE**TP**PYTC), 52 (CSKH**TP**FSC), 55 (C**ST**PIALAC) i 58 (C**TP**SGAGIC) de la tercera ronda primer i tercer triplicat. Cap de les seqüències obtingudes de la quarta ronda presentava aquests residus. La seqüència 2 (C**LSP**QTTNC) de la primera ronda primer triplicat i la seqüència 16 (CN**LSP**RQMC) de la segona ronda primer triplicat definien un possible motiu peptídic de tres residus (**LSP**) que no tornava a aparèixer sencer a cap de les seqüències obtingudes, però sí en part (**SP**) en 2 seqüències de la segona ronda primer triplicat, la 18 (CY**SP**KAHAC) i la 20 (CK**SP**PSTTC), i en 5 seqüències de la tercera ronda: la 35 (C**SP**WEAPQC) del primer triplicat, la 41 (C**SP**ARFSSC) i la 48 (CE**SP**MVLMC) del segon triplicat i la 51 (CYP**SRSP**LC) i 53 (CYS**GP**H**SP**C) del tercer triplicat. La seqüència 1 (C**RS**PSATIC) de la primera ronda primer triplicat i la seqüència 51 (CYP**SRSP**LC) de la tercera ronda tercer triplicat presentaven el possible motiu peptídic **RSP** que apareixia en part en dues seqüències de la quarta ronda: la 77 (CER**SHMR**SC) i la 89 (CWP**DRSR**AC) del segon triplicat i tercer triplicat respectivament.

A la tercera ronda vam trobar tres seqüències amb el possible motiu **RPM** al seu extrem C-terminal. Concretament, la seqüència 45 (CAPLH**RPM**C), la seqüència 50 (CPLH**QRPM**C) i la seqüència 59 (CPLA**QRPM**C) de la tercera ronda corresponents al segon i tercer triplicat respectivament. A més a més, la seqüència 50 (CPLH**QRPM**C) i la 59 (CPLA**QRPM**C) tan sols es diferenciaven en l'aminoàcid de la quarta posició, suggerint un possible motiu peptídic **PLXQRPM** (on X equivaldria a qualsevol aminoàcid). Els motius d'aquestes tres seqüències peptídiques ens tornen a aparèixer a les obtingudes de la quarta ronda. Concretament, les seqüències 71, 73 (del segon triplicat) i 85 (del tercer triplicat), que com s'indica presenten la seqüència CAPLH**RPM**C obtinguda en la tercera ronda (seqüència número 45). Curiosament, la seqüència CPLA**QRPM**C va aparèixer a la seqüència número 88 de la quarta ronda i la seqüència CPLH**QRPM**C la vam trobar 3 vegades a la quarta ronda (seqüències número 76, 79 i 80). Cal destacar que en la quarta ronda hi trobem tres noves seqüències que es poden agrupar dins del possible motiu peptídic definit anteriorment



(**PLXQRPM**). Aquestes són: la seqüència **CPLSQRPMC** (detectada a les seqüències 65 i 68 i 84 de la quarta ronda, la **CPLDQRPMC** (corresponent a la seqüència 70 de la quarta ronda) i la seqüència **CPLQQRPMC** (corresponent a la 82 de la quarta ronda). Per últim, assenyalar que la seqüència 69 (**CLPPMFYDC**) i les seqüències 81, 83 i 90 (**CFPPMFYDC**) de la quarta ronda corresponen al motiu peptídic **XPPMFYD** (que no havíem detectat prèviament) i que vam trobar repetida dues vegades la seqüència **CDLPMHPMC** (seqüències 72 i 75).

Per tal d'analitzar si les seqüències reconegudes per les cèl·lules metastàtiques podrien també ser reconegudes per les parentals, vam escollir 30 calbes de fags de la quarta ronda sobre la línia parental PC3P. La seqüenciació del DNA de cadascuna d'elles i l'obtenció de les seqüències peptídiques es va realitzar seguint el procediment comentat anteriorment. En la taula R.2 es mostren els resultats de totes elles.

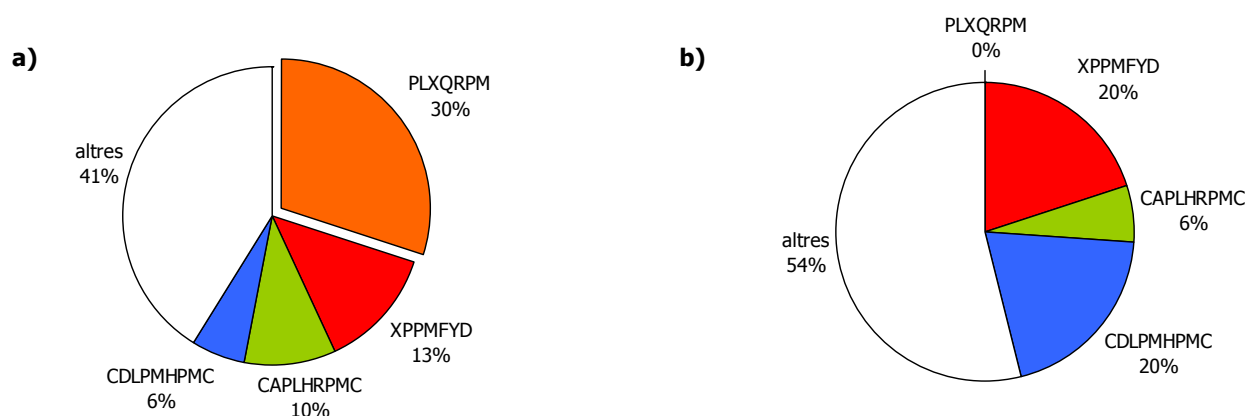
	Primer triplicat		Segon triplicat		Tercer triplicat	
	Núm. calba	Seqüència peptídica	Núm. calba	Seqüència peptídica	Núm. calba	Seqüència peptídica
<b>Quarta ronda de selecció PC3P</b>	91	CMSTANLSC	101	CDLPMHPMC	111	CSWLPPRLC
	92	n.d	102	CDLPMHPMC	112	n.d
	93	CDFQSQDLC	103	CSNFPTPHC	113	CFPPMFYDC
	94	CDLPMHPMC	104	CAPHLRPMC	114	CFPPMFYDC
	95	CHKTRLISC	105	CPPHQRPCM	115	CFPPMFYDC
	96	CLASPLPHC	106	CAPHLRPMC	116	CFPPMFYDC
	97	CDKTKTHGC	107	n.d	117	CHETNGFQC
	98	CDLPMHPMC	108	CPHITHRSC	118	CFPPMFYDC
	99	CISRTVPAC	109	CDLMPHMC	119	C ANERPMC
	100	CDLPMHPMC	110	CPPHQRPCM	120	CFPPMFYDC

**Taula R.2.- Relació de seqüències peptídiques obtingudes de la quarta ronda sobre les PC3P.** Les seqüències peptídiques es troben classificades segons la ronda de selecció i el triplicat de la ronda d'on van ser recuperades. El Núm. de calba indica el número aleatori que es va assignar a la calba. Estan marcats com a n.d. (no determinat) els casos on no fou possible obtenir la seqüència emprant els procediments descrits.

Curiosament, la seqüència **CDLPMHPMC** la vam trobar en 6 calbes diferents (seqüències 94, 98, 100, 101, 102 i 109 de la taula R.2) coincidint amb les seqüències número 72 i 75 detectades sobre les cèl·lules PC3MM2 de la taula R.1, suggerint que el motiu de reconeixement estava present tant a les metastàtiques com a les parentals. La seqüència **CAPHLRPMC** que en el cas de les PC3MM2 ens apareixia en el segon i tercer triplicat de la quarta ronda de selecció (seqüències 71,73 i 85 taula R.1), la vam trobar dues vegades en el segon triplicat de la quarta ronda sobre la línia parental PC3P (seqüències 104 i 106 taula R.2). Una altra coincidència és la seqüència **CFPPMFYDC**, que en el cas de les PC3MM2 la vam trobar a les seqüències 81, 83 i 90 (taula R.1), i en el cas de les PC3P la vam trobar en 6 de les 10 seqüències obtingudes del tercer triplicat (seqüències 113, 114, 115, 116, 118 i

120 taula R.2). Per últim, comentar que la seqüència CPPHQRPC (seqüències 110 i 105 taula R.2) presenta una important similitud amb les seqüències CPMHQRPC i CPLHQRPC (corresponents a les seqüències 86, 50, 76, 70 i 80 de taula R.1). Contràriament, cap de les seqüències obtingudes de la quarta ronda sobre les PC3P tenia similitud amb el motiu peptídic **PLXQRPM**, definit en el cribratge dels fags sobre les cèl·lules PC3MM2

En la figura R.5 es representa la freqüència de les seqüències peptídiques majoritàries detectades en la quarta ronda de selecció sobre les PC3MM2 (figura R.5 a)) i PC3P (figura R.5 b)).



**Figura R.5.- Distribució de les freqüències de les seqüències peptídiques majoritàries seleccionades a través del cribratge de la llibreria de *Phage display* Ph.D.-C7C sobre la variant metastàtica PC3MM2.** La proporció de cadascuna d'elles correspon a la quarta ronda de selecció sobre les PC3MM2 (a)) i les PC3P(b)).

Pel que fa a la similitud de les seqüències corresponents al cribratge sobre les cèl·lules PC3MM2, ens cridà l'atenció el motiu peptídic **PLXQRPM**, on s'hi agrupen 5 seqüències peptídiques diferents (CPLSQRPMC, CPLDQRPMC, CPLHQRPC, CPLAQRPMC i CPLQQRPMC) (taula R.1), detectat en el 30% de les seqüències peptídiques analitzades (9 de 30) (figura R.5 a)). Amb menys freqüència (13%) vam detectar el motiu peptídic **XPPMFYD** (relacionat amb les seqüències CLPPMFYDC i CFPPMFYDC (figura R.5 a)) que el vam detectar amb una freqüència del 20% en el cas de les cèl·lules PC3P (figura R.5 b)).

Les seqüències peptídiques obtingudes de la quarta ronda sobre la variant metastàtica PC3MM2 (seqüències 61 a 90 taula R.1) es van analitzar mitjançant el programa informàtic Clustal W 1.83 (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>). Aquest programa calcula les semblances entre les seqüències i les alinea col·locant-les de manera que les seqüències peptídiques més similars es trobin properes, mostrant les diferències i identitats entre elles. El resultat de l'alineament de les 30 seqüències peptídiques no va demostrar residus idèntics,

substitucions conservatives o semiconservatives que es trobessin en les 30 seqüències peptídiques obtingudes (figura R.6).

```

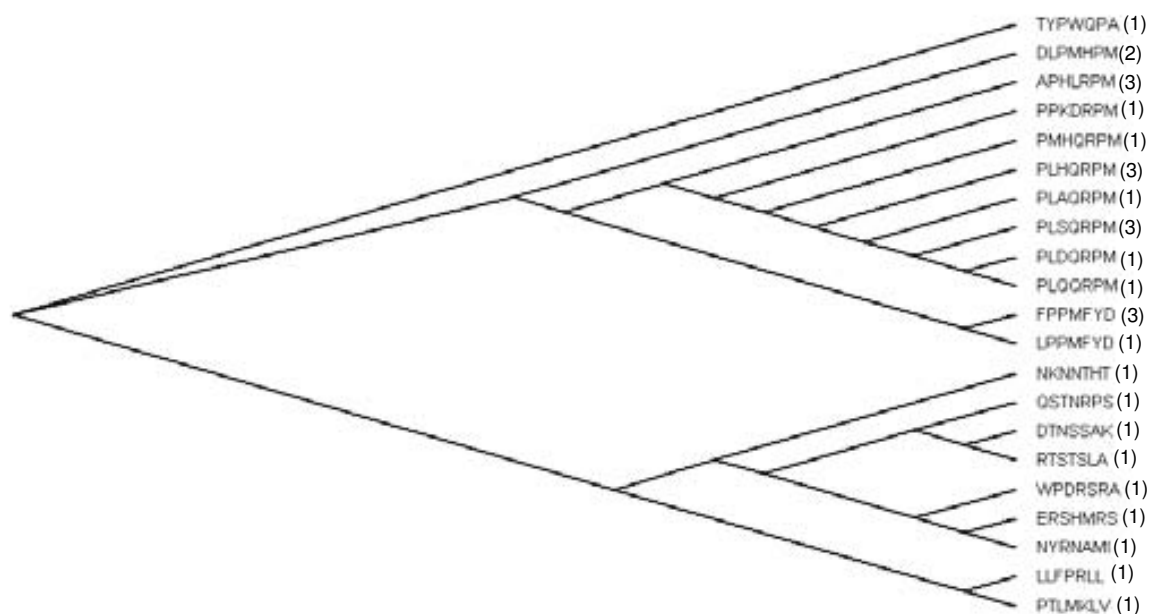
-DLPMHPM
-DLPMHPM
-APHLRPM
-APHLRPM
-APHLRPM
-PPKDRPM
-PLSQRPM
-PLSQRPM
-PLSQRPM
-PLDQRPM
-PLAQRPM
-PLQQRPM
-PLHQRPM
-PLHQRPM
-PLHQRPM
-FPMHQRPM
FPPMFYD-
FPPMFYD-
FPPMFYD-
LPPMFYD-
WPDRSRA-
-QSTNRPS
ERSHMRS-
-NYRNAMI
-LLFPRL
-PTLMKLV
-RTSTSLA
-DINSSAK
-TYPWQPA
-NKNNHT

```

**Figura R.6.- Alineament per Clustal W 1.83 de les seqüències potencialment específiques pel reconeixement de les cèl·lules PC3MM2.** Les 30 seqüències peptídiques obtingudes de la quarta ronda sobre les cèl·lules PC3MM2 van ser analitzades mitjançant el programa informàtic Clustal W 1.83 (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>). Mitjançant un codi de colors ens mostra les semblances entre les seqüències peptídiques a nivell de tipus d'aminoàcid: vermell, hidrofòbic; verd, neutre i polar; rosa, bàsic i blau, acídic.

Les similituds entre les seqüències s'analitzà bioinformàticament mitjançant el programa Treeview 1.6.5. (Page, 1996) (figura R.7). Aquest ens associà les seqüències en forma d'arbre, separant-nos en branques les diferents famílies de pèptids segons la posició i la identitat de l'aminoàcid. Vam obtenir un arbre de tres branques amb una branca minoritària, contenint tan sols una de les seqüències (seqüència 61, taula R.1); una segona branca, contenint 9 de les 30 seqüències analitzades (seqüències 61,63,78,62,89,77,74,67 i 64 taula R.1) i una tercera branca majoritària contenint les 20 seqüències peptídiques restants. Aquesta branca majoritària es divideix en 3 subbranques, dues minoritàries i una majoritària. En una de les subbranques hi trobem la seqüència CDLPMHPMC que la vam trobar dues vegades (seqüències 72 i 75, taula R.1) representant el 6% de les seqüències analitzades (figura R.5 a)) i en l'altra subbranca les seqüències agrupades dins del possible motiu peptídic **XPPMFYD** i que representava el 13% de les seqüències analitzades (figura R.5 a)): la seqüència CLPPMFYDC (seqüència 69, taula R.1) i la seqüència CFPPMFYDC que la vam trobar tres vegades repetida (seqüències 81, 83 i 90, taula R.1). És en la subbranca majoritària on hi trobem les seqüències peptídiques agrupades dins del possible motiu

peptídic **PLXQRPM** i que representaven el 30% de les seqüències obtingudes (figura R.5 a)). Aquestes són la seqüència CPLAQRPMC (seqüència 88, taula R.1), la seqüència CPLDQRPMC (seqüència 70, taula R.1), la seqüència CPLQQRPMC (seqüència 82, taula R.1), la seqüència CPLHQRPMC que la vam trobar tres vegades repetida (seqüències 76, 79 i 80, taula R.1) i la seqüència CPLSQRPMC que la vam trobar tres vegades repetida (seqüències 65, 68 i 84, taula R.1). En aquesta sub branca també hi trobem la seqüència CPPKDRPMC (seqüència 87, taula R.1), la seqüència CPMHQRPMC (seqüència 86, taula R.1) i la seqüència CAPLHRPMC que la vam trobar tres vegades repetida (seqüències 71, 73 i 85, taula R.1) representant un 10% de les seqüències analitzades (figura R.5 a)).



**Figura R.7.- Diagrama de relació de les seqüències peptídiques potencialment específiques per la unió/reconeixement de les cèl·lules PC3MM2.** Mitjançant el programa informàtic Treeview 1.6.5. (Page, 1996) s'han analitzat les diferents seqüències peptídiques, obtingudes de la quarta ronda sobre les cèl·lules PC3MM2. Els números entre parèntesi indiquen les vegades que es va trobar cadascuna de les seqüències analitzades.

### 1.3.- Elecció de seqüències peptídiques específiques per a la unió a les cèl·lules PC3MM2.

Amb la informació obtinguda fins ara vam triar cinc seqüències de la sub branca majoritària del diagrama en forma d'arbre (figura R.7). Concretament, la seqüència CAPLHRPMC, la seqüència CDLPMHPMC, la seqüència CFPPMFYDC (representant majoritari del possible motiu peptídic **XPPMFYD**) i dos representants del possible motiu peptídic **PLXQRPM**: la seqüència CPLHQRPMC i la seqüència CPLSQRPMC. La seqüència peptídica CYPSSLPC, obtinguda en la tercera ronda de selecció (seqüència 51, taula R.1), va ser escollida per la seva semblança amb un pèptid prèviament trobat en el nostre laboratori a través d'una estratègia alternativa i per a una finalitat semblant (dades no mostrades). La seqüència

peptídica CTPQNTTMC va ser escollida com a control negatiu ja que es va trobar en la primera ronda de selecció (taula R.1) i no es va tornar a trobar en rondes posteriors.

Ens vam preguntar si les seqüències peptídiques escollides presentaven homologia amb regions concretes de proteïnes localitzades a la superfície cel·lular (Romanov, Durand, and Petrenko, 2001). Per això, les seqüències peptídiques escollides com a potencialment específiques per a les cèl·lules PC3MM2 (sense les Cys flanquejants) es van enfrontar a la base de dades del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). En tots els casos es va obtenir homologia amb proteïnes secretades o bé en la regió extracel·lular de diferents proteïnes cel·lulars de membrana. A la taula R.3 es mostren els resultats de la identitat en com a mínim 4 dels 7 aminoàcids, representant una homologia del 57%.

Seqüència peptídica	Alineament seqüència peptídica/seqüència proteïnes humanes	Número d'accés Swiss-prot	Nom de la proteïna humana amb homologia	Regió de la proteïna amb homologia
<b>TPQNTTM</b>	<b>TPQNTTM</b> TPHNTKT	P48745	NOV ( <i>Nephroblastoma Overexpressed gene protein</i> ) homòleg	regió compresa entre els aminoàcids 302-308, dins del domini CtCK de la proteïna (264-338).
	<b>TPQNTTM</b> KPQGTTV	Q8N474	sFRP1 ( <i>Secreted Frizzled-related protein</i> )	regió compresa entre els aminoàcids 179-185, entre els dominis FZ i NTR de la proteïna (53-169 i 186-306).
	<b>TPQNTTM</b> VPQNTSV	Q8NFT8	DNER ( <i>Delta and Notch-like epidermal growth factor related receptor</i> )	regió compresa entre els aminoàcids 220-226, a la regió extracel·lular de la proteïna (35-640).
	<b>TPQNTTM</b> PPQNLTM	Q9Y336	SIGL9 ( <i>Sialic acid-binding Ig-like lectin 9</i> )	regió compresa entre els aminoàcids 235-241, dins el domini <i>Ig-like C2 type 2</i> de la proteïna (236-336).
<b>APLHRPM</b>	<b>APLHRPM</b> APLPRPG	O75638	CATG2 ( <i>Cancer/Testis antigen related 2</i> )	regió compresa entre els aminoàcids 114-120 de la proteïna.
	<b>APLHRPM</b> QLLHRPQ	P49746	TSP3 (Trombospondina-3)	regió compresa entre els aminoàcids 880-886, dins el domini <i>Thrombospondin type-1 C-terminal</i> de la proteïna (720-956).
	<b>APLHRPM</b> SRLHRPQ	P13942	COAB2 (cadena col·lagen tipus IX $\alpha$ 2)	regió compresa entre els aminoàcids 253-258 de la proteïna.
	<b>APLHRPM</b> KVVHRPM	O96014	WNT11 (Wnt-11)	regió compresa entre els aminoàcids 246-252 de la proteïna.

Seqüència peptídica	Alineament seqüència peptídica/seqüència proteïnes humanes	Número d'accés Swiss-prot	Nom de la proteïna humana amb homologia	Regió de la proteïna amb homologia
<b>YPSRSPL</b>	<b>YPSRSPL</b> <b>YPSRTQF</b>	P25940	CO5A3 (Cadena de col·lagen tipus V $\alpha$ 3)	regió compresa entre els aminoàcids 360-366 de la proteïna.
	<b>YPSRSPL</b> <b>YPAQSPL</b>	Q9ULZ9	MMP17 ( <i>Matrix Metalloproteinase 17</i> )	regió compresa entre els aminoàcids 468-474, dins el domini <i>hemopexin-like</i> de la proteïna (332-529).
	<b>YPSRSPL</b> <b>YPNASPL</b>	Q9GZV9	FGF23 ( <i>Fibroblast Growth factor 23</i> )	regió compresa entre els aminoàcids 25-31, a l'extrem N-terminal de la proteïna.
	<b>YPSRSPL</b> <b>YPERTPL</b>	P13765	2DOB ( <i>HLA class II histocompatibility antigen, DO beta chain</i> )	regió compresa entre els aminoàcids 128-134, dins el domini <i>Ig-like</i> de la proteïna (123-213).
<b>PLSQRPM</b>	<b>PLSQRPM</b> <b>PLSQRPS</b>	Q9UNA0	ADAMTS-5 ( <i>A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 5</i> )	regió compresa entre els aminoàcids 914-920, dins el domini <i>Thrombospondin type-1 2</i> de la proteïna (875-929).
	<b>PLSQRPM</b> <b>GLSQRPK</b>	P62706	FBS1 (Fibrosina-1)	regió compresa entre els aminoàcids 71-77, dins la regió de la proteïna que estimula el creixement dels fibroblasts <i>in vitro</i> (69-104).
	<b>PLSQRPM</b> <b>PLGQRCL</b>	Q9Y219	JAG-2 (Jagged-2)	regió compresa entre els aminoàcids 925-931, dins el domini <i>von Willebrand Factor type C</i> de la proteïna (870-944).
	<b>PLSQRPM</b> <b>RLSHRPK</b>	P07996	TSP1 (Trombospondina-1)	regió compresa entre els aminoàcids 1111-1117, dins el domini <i>Thrombospondin type-1 C-terminal</i> de la proteïna (951-1170).
	<b>PLSQRPM</b> <b>WLSERPCK</b>	P25391	LAMA1(subunitat $\alpha$ 1 de la laminina)	regió compresa entre els aminoàcids 2674-2680 de la proteïna.

Seqüència peptídica	Alineament seqüència peptídica/seqüència proteïnes humanes	Número d'accés Swiss-prot	Nom de la proteïna humana amb homologia	Regió de la proteïna amb homologia
<b>DLPMHMP</b>	<b>DLPMHPM DI PMNPM</b>	P01008	ANT3 (Antitrombina III)	regió compresa entre els aminoàcids 46-52 de la proteïna.
	<b>DLPMHPM DVMHTM</b>	P25391	LAMA1(subunitat $\alpha$ 1 de la laminina)	regió compresa entre els aminoàcids 1854-1859 de la proteïna.
	<b>DLPMHPM FLPMLPM</b>	O95750	FGF19 ( <i>Fibroblast Growth factor</i> 19)	regió compresa entre els aminoàcids 165-171 de la proteïna.
<b>PLHQRPM</b>	<b>PLHQRPM PLSQRPS</b>	Q9UNA0	ADAMTS-5 ( <i>A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs</i> 5)	regió compresa entre els aminoàcids 914-920, dins el domini <i>Thrombospondin type-1 2</i> de la proteïna (875-929).
	<b>PLHQRPM PLGQRCL</b>	Q9Y219	JAG-2 (Jagged-2)	regió compresa entre els aminoàcids 925-931, dins el domini <i>von Willebrand Factor type C</i> de la proteïna (870-944).
	<b>PLHQRPM PLHQQES</b>	P08648	ITA5 (Integrina $\alpha$ 5)	regió compresa entre els aminoàcids 925-931 de la proteïna, dins la regió extracel·lular de la proteïna (42-995).
	<b>PLHQRPM PAHQPPM PAHQSPM</b>	Q9HCU0	CD248 (Endosialina)	regions compreses entre els aminoàcids 510-516 i 526-532 de la proteïna, ambdues dins la regió extracel·lular de la proteïna (18-687).
	<b>PLHQRPM LHHQRPK</b>	P13612	ITA4 (Integrina $\alpha$ 4)	regió compresa entre els aminoàcids 973-979 de la proteïna, dins la regió extracel·lular de la proteïna (41-983).



Seqüència peptídica	Alineament seqüència peptídica/seqüència proteïnes humanes	Número d'accés Swiss-prot	Nom de la proteïna humana amb homologia	Regió de la proteïna amb homologia
<b>FPPMFYD</b>	<b>FPPMFYD</b> <b>FPAMFNP</b>	P08648	ITA5 (Integrina $\alpha$ 5)	regió compresa entre els aminoàcids 502-508 de la proteïna, dins la regió extracel·lular de la proteïna (42-995).
	<b>FPPMFYD</b> <b>SPPRMYF</b>	P13612	ITA4 (Integrina $\alpha$ 4)	regió compresa entre els aminoàcids 535-541 de la proteïna, dins la regió extracel·lular de la proteïna (41-983).
	<b>FPPMFYD</b> <b>FPPMSTP</b>	Q8WXI7	MUC16 (Mucina-16)	regió compresa entre els aminoàcids 1489-1495 de la proteïna, dins la regió extracel·lular de la proteïna (1-22096).
	<b>FPPMFYD</b> <b>FPRMFSD</b>	P78325	ADAM 8 ( <i>A disintegrin and metalloproteinase 8</i> )	regió compresa entre els aminoàcids 372-378 de la proteïna, dins la regió extracel·lular de la proteïna (17-665).
	<b>FPPMFYD</b> <b>EPPMFLA</b>	P55287	CAD11 (Cadherina-11)	regió compresa entre els aminoàcids 379-385 de la proteïna, dins el domini <i>Cadherin 3</i> de la proteïna (269-383).

**Taula R.3.- Homologia de les seqüències TPQNTTM, APLHRPM, YPSRSPL, PLSQRPM, DLPMHPM, PLHQRPM i FPPMFYD amb proteïnes humanes cel·lulars.**

Les seqüències peptídiques sense les Cys flanquejants es van enfrontar a la base de dades del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). La taula mostra les proteïnes amb què les nostres seqüències peptídiques presentaven homologia en com a mínim 4 aminoàcids. A la primera columna hi trobem la seqüència peptídica candidata, a la segona columna l'alineament entre la seqüència peptídica candidata i la seqüència de la proteïna humana, a la tercera columna el número d'accés Swiss-prot de la proteïna humana amb homologia amb la seqüència peptídica, a la quarta columna el nom de la proteïna humana i a la cinquena columna la regió de la proteïna humana amb homologia amb la seqüència peptídica candidata. Els aminoàcids que difereixen entre les dues seqüències no estan marcats en negreta.

La seqüència peptídica TPQNTTM presenta homologia amb NOV (*Nephroblastoma Overexpressed gene protein*), concretament en la regió compresa entre els aminoàcids 302 i 308 que es troba dins el domini CtCK de la proteïna (*C-terminal Cystine Knot*). Aquesta proteïna, que s'ha trobat sobreexpressada en tumors Wilms de tipus estroma, és secretada i participa en la regulació del creixement cel·lular. Aquesta seqüència també presenta homologia amb sFRP1 (*Secreted Frizzled-related protein*) en la regió compresa entre els aminoàcids 179 i 185. Aquest actua com a modulador de la senyalització via Wnt i pot induir una resposta angiogènica *in vivo*. En el cas del DNER (*Delta and Notch-like Epidermal growth factor related Receptor*) que és un activador de la via de senyalització NOTCH1, la seqüència TPQNTTM presenta homologia dins la regió extracel·lular de la proteïna, concretament en la regió compresa entre els aminoàcids 220-226. A més a més, aquesta seqüència també presenta homologia amb la regió compresa entre els aminoàcids 235 i 241 (dins el domini *Ig-like C2 type 2*) de SIGL9 (*Sialic acid-binding Ig-like Lectin 9*) que és una molècula d'adhesió putativa que media la unió cel·lular dependent d'àcids siàlics.

En el cas de la seqüència APLHRPM, s'ha trobat homologia amb una proteïna sobreexpressada en tumors de pròstata, la CATG2 (*Cancer/Testis antigen related 2*)/LAGE-1 i concretament en la regió compresa entre els aminoàcids 114 i 120. També presenta homologia amb el domini *Thrombospondin type-1 C-terminal* de la Trombospondina-3 entre els aminoàcids 880 i 886. Aquesta és una glicoproteïna que media interaccions cèl·lula-cèl·lula i cèl·lula-matriu. Altres proteïnes amb qui la seqüència APLHRPM presenta homologia són Wnt-11 i COAB2 (cadena col·lagen tipus IX  $\alpha 2$ ). En el cas de Wnt-11, que és un lligand per la família de receptors *Frizzled*, la regió amb homologia és la compresa entre aminoàcids 246 i 252. En el cas de COAB2, la regió que presenta homologia amb la seqüència es troba entre els aminoàcids 253 i 258.

La seqüència YPSRSPL presenta homologia amb COA5A3 (cadena  $\alpha 3$  de col·lagen tipus V), que és un component minoritari del teixit connectiu, en la regió compresa entre els aminoàcids 360 i 366. Aquesta seqüència també presenta homologia amb la regió compresa entre els aminoàcids 468 i 474 de l'endopeptidasa MMP17 (concretament dins el domini *hemopexin-like*). Aquesta endopeptidasa s'ha trobat implicada en l'activació de precursors de factors de creixement associats a membrana o mediadors inflamatoris (com TNF- $\alpha$ ) i en la progressió tumoral. La regió compresa entre els aminoàcids 25 i 31 de FGF23 també presenta homologia amb aquesta seqüència peptídica. Una altra proteïna amb qui presenta homologia la seqüència YPSRSPL és HLA-DOB, proteïna de membrana que pertany a la

família de presentadors d'antígens *MHC-class II*, dins el domini *Ig-like* i concretament en la regió compresa entre els aminoàcids 128 i 134.

La seqüència PLSQRPM presenta homologia amb la desintegrina ADAMTS-5, que participa en el *turnover* de l'agrecà (proteoglicà del cartílag), concretament en un dels dominis TSP-1 (importants per a la interacció de la proteïna amb la matriu extracel·lular) de la proteïna entre els aminoàcids 914-920. Aquesta seqüència també presenta homologia amb la FBS1 (Fibrosina-1), concretament en la regió que estimula el creixement de fibroblasts *in vitro* (aminoàcids 72-77). En el cas de JAG-2 (Jagged-2), proteïna de membrana que actua com a lligand de Notch, la regió amb homologia és la compresa entre els aminoàcids 925 i 931 que es troba dins el domini VWFC-2 de la proteïna (implicat en la formació de complexos proteics). La regió compresa entre els aminoàcids 1111-1117 del domini TSP C-terminal de la Trombospondina-1 (glicoproteïna adhesiva que s'uneix a fibrinogen, fibronectina, laminina, col·lagen V i integrines  $\alpha_v\beta_1$ ,  $\alpha_v\beta_3$  i  $\alpha_{IIb}\beta_3$ ) també presenta homologia amb aquesta seqüència. A més a més, s'ha trobat homologia amb una de les subunitats de la laminina 1 i 3, la subunitat  $\alpha_1$ , en la regió compresa entre els aminoàcids 2674 i 2680.

En el cas de la seqüència DLPMHPM, s'ha trobat homologia en la regió compresa entre els aminoàcids 46 i 52 de l'antitrombina III. També s'ha trobat homologia amb la subunitat  $\alpha_1$  de la laminina 1 i 3 entre els aminoàcids 1854-1859 de la proteïna. Una altra proteïna amb qui s'ha trobat homologia és FGF19, lligand específic de FGFR4, en la regió compresa entre els aminoàcids 165-171.

La seqüència PLHQRPM també presenta homologia amb ADAMTS-5 i JAG-2 (Jagged-2) en les mateixes regions que en el cas de la seqüència PLSQRPM. A més a més, la seqüència PLHQRPM presenta homologia amb CD248 (Endosialina), entre els aminoàcids 510-516 i 526-532, que s'expressa en les cèl·lules endotelials tumorals i no en les normals, participant en l'angiogènesi del tumor. Aquesta seqüència també presenta homologia amb la regió extracel·lular de dues subunitats d'integrines, l' $\alpha_4$  (regió compresa entre els aminoàcids 973-979) i l' $\alpha_5$  (regió compresa entre els aminoàcids 925-931).

La seqüència FPPMFYD també presenta homologia amb les subunitats d'integrines  $\alpha_4$  i  $\alpha_5$  com la seqüència PLHQRPM, però en regions diferents. Concretament, en el primer cas la regió amb homologia és la compresa entre els residus 535-541 i en el segon cas entre 502 i 508. A més a més, aquesta seqüència presenta homologia amb la regió compresa entre els aminoàcids 1489-1495 de la Mucina-16 (que s'ha trobat sobreexpressada en tumors ovàrics),

amb la regió extracel·lular d'ADAM 8 (entre els aminoàcids 372-379) i amb una regió localitzada dins un dels 5 dominis Cadherina de la Cadherina-11 (entre els aminoàcids 379-385).

#### **1.4.- Estudi de les eficiències d'unió de fags portadors de les seqüències peptídiques escollides.**

A continuació ens vam plantejar si les seqüències peptídiques escollides com a potencialment reconeixedores de la variant metastàtica PC3MM2 eren específiques per aquestes cèl·lules o podien reconèixer altres línies i variants cel·lulars. Per aquest motiu, es van mesurar les eficiències d'unió dels fags corresponents (portadors de les seqüències peptídiques seleccionades) a la superfície cel·lular de diferents línies i variants cel·lulars. Això ho vam fer mitjançant un assaig que anomenem *binding assay* que consisteix en la incubació dels fags ( $5 \cdot 10^{10}$  pfu) sobre les cèl·lules en cultiu. Mitjançant una sèrie de rentats s'eliminen els fags que no s'hagin unit a la superfície cel·lular i després es recuperen els fags ancorats a les cèl·lules per elució, tal i com s'indica a Materials i Mètodes (apartat 4).

Els fags utilitzats van ser el fag CTPQ (que presenta la seqüència CTPQNTTMC), el fag CAPLH (que presenta la seqüència CAPLHRPMC), el fag CYPS (que presenta la seqüència CYPSSRPLC), el fag CPLS (que presenta la seqüència CPLSQRPMC), el fag CPLH (que presenta la seqüència CPLHQRPC), el fag CDLP (que presenta la seqüència CDLPMHPMC) i el fag CFPP (que presenta la seqüència CFPPMFYDC). Juntament amb aquests es va utilitzar un fag sense insert per tal de conèixer la unió inespecífica del fag M13 per a cada tipus cel·lular.

Pel que fa a les cèl·lules, es van utilitzar vuit línies i variants cel·lulars diferents. Quatre d'aquestes eren línies i variants cel·lulars humanes de càncer de pròstata, concretament PC3MM2, PC3P, LNCaPLN3 i LNCaP. Amb l'ús d'aquestes línies i variants cel·lulars volíem esbrinar si aquestes seqüències eren específiques només de la línia cel·lular metastàtica per la qual havíem seleccionat o també podien reconèixer la seva línia parental o altres línies cel·lulars de càncer de pròstata com la LNCa (Pettaway et al., 1996) -tant la parental (LNCaP) com la seva variant metastàtica (LNCaPLN3)-, ja que existeix una elevada diversitat fenotípica de les línies i els tumors de pròstata de procedència humana. També vam utilitzar la línia humana de càncer de mama MDA MB 435 Lung 2 -altament metastàtica a pulmó en models experimentals, (Price et al., 1990)- i la línia humana de càncer de pàncrees NP9 obtinguda de metàstasis humanes peritoneals (Reyes et al., 1996) per comprovar si les

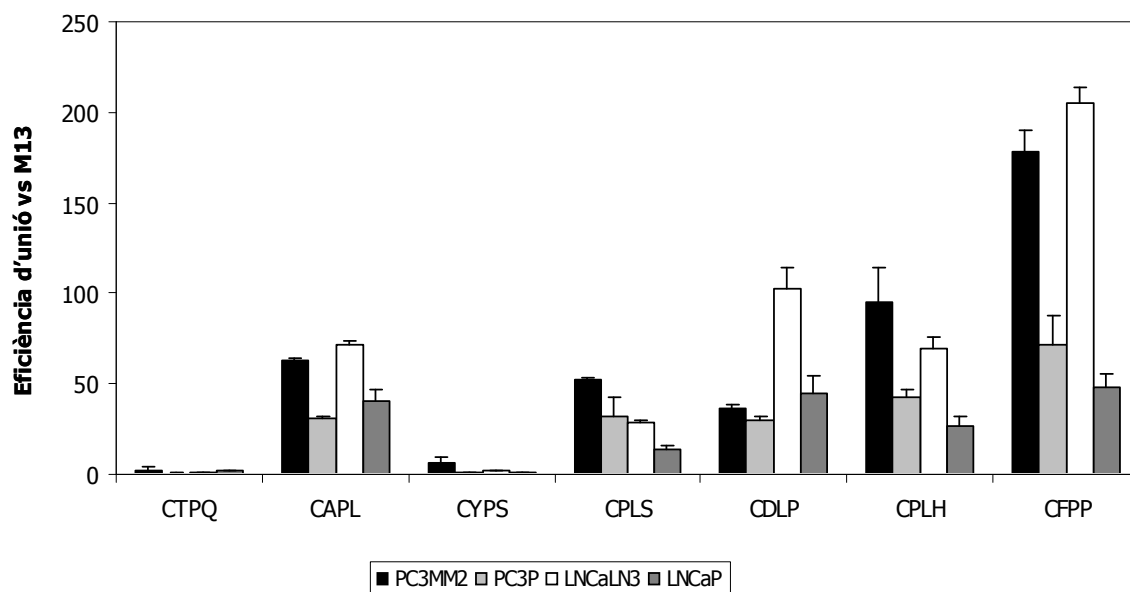
seqüències eren específiques per a altres línies metastàtiques que no fossin de pròstata. Com a línies no tumorals vam utilitzar la línia cel·lular MDCK, que no és humana sinó canina, però era el millor model epitelial de què disposàvem. També vam utilitzar hepatòcits murins (no disposàvem d'hepatòcits humans) per comprovar que aquestes seqüències peptídiques no reconeixien específicament aquest tipus cel·lular i finalment cultius primaris HUVEC (*Human umbilical vein endothelial cells*) com a representants del sistema vascular i microvascular.

En l'assaig de *binding assay* vam incubar  $5 \cdot 10^7$  *pfu* de les poblacions de fags homogènies amb els diferents tipus cel·lulars (apartat 4 de Materials i Mètodes). El nombre de fags específics recuperats en cada assaig es va titular (*pfu*) i es va calcular l'eficiència d'unió de cada fag a cada línia cel·lular (relació entre les *pfus* recuperades i les *pfus* de partida). En els següents apartats es mostren els resultats de les eficiències d'unió dels diferents fags relacionats amb les seqüències seleccionades a les diferents línies i variants cel·lulars comentades. Cal dir que en les representacions de les eficiències d'unió relatives a M13, l'escala dels eixos de coordenades varien segons els resultats obtinguts i que en el cas de la comparació de l'eficiència d'unió a les PC3MM2 amb l'obtinguda a les altres línies cel·lulars analitzades la representació és en escala logarítmica.

#### **1.4.1.- Eficiències d'unió a les línies i variants cel·lulars de càncer de pròstata.**

En la figura R.8 es mostren les eficiències d'unió dels fags CTPQ, CYPS, CAPL, CPLS, CPLH, CDPL i CFPP normalitzades ja per l'eficiència d'unió del fag M13 a les línies i variants de càncer de pròstata esmentades (PC3MM2 i LNCaPLN3 i sobre les seves línies parentals, PC3P i LNCaP respectivament).

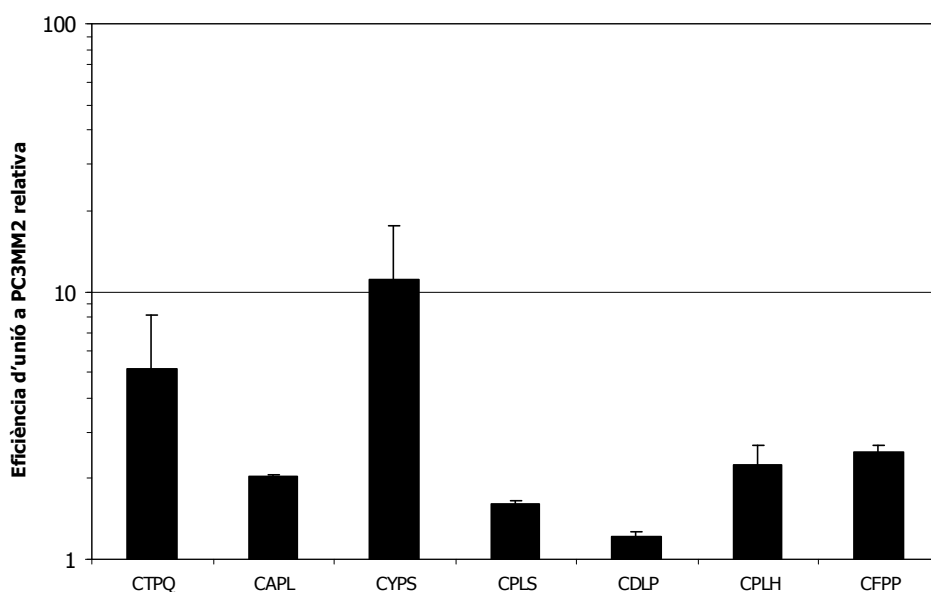
En tots els casos l'eficiència d'unió del fag M13 (que ens indica la unió inespecífica no deguda a la seqüència) va ser inferior a la dels fags portadors de les seqüències seleccionades, excepte en el cas de les cèl·lules PC3P, en què tant el fag CTPQ com el fag CYPS van presentar una eficiència d'unió inferior a la del fag M13. Les eficiències d'unió del fag CTPQ (que presenta la seqüència escollida com a control negatiu) i del fag CYPS a les quatre línies i variants cel·lulars són molt similars a la del fag M13, excepte en el cas del fag CYPS en les cèl·lules PC3MM2 on presenta una eficiència de 6 vegades la del fag M13. És important destacar que els altres fags analitzats presenten una eficiència d'unió superior a les variants metastàtiques que a les línies parentals utilitzades.



**Figura R.8.- Representació de les eficiències d'unió dels fags seleccionats a les línies i variants de càncer de pròstata.**  $5 \cdot 10^7$  *pfu* de poblacions homogènies dels fags portadors de les seqüències peptídiques candidates van ser incubades sobre les cèl·lules PC3MM2, PC3P, LNCaP i LNCaLN3. El diagrama de barres indica les eficiències d'unió de cada fag (calculada com la relació entre les *pfu* obtingudes després de l'assaig i les *pfu* incubades a l'inici de l'assaig) a cada línia cel·lular ja normalitzades per l'eficiència d'unió del fag M13. Es mostra la mitjana de tres experiments independents i el seu error estàndard.

El fag CFPP (figura R.8) és el que presenta una millor eficiència d'unió en les quatre línies i variants cel·lulars. Concretament, en el cas de les PC3MM2 presenta una eficiència de 179 vegades la del fag M13, en el cas de les PC3P aquesta és de 71 vegades, en el cas de les LNCaP és de 48 vegades i és en el cas de les LNCaLN3 on mostra una major eficiència, essent 208 vegades la del fag M13. El fag que presenta una major eficiència d'unió a les PC3MM2 (sobre les quals es va fer la selecció de les seqüències) respecte a les altres línies i variants cel·lulars de càncer de pròstata és el fag CPLH, ja que la seva eficiència d'unió a les PC3MM2 és 95 vegades la del fag M13, seguida per l'obtinguda en el cas de les LNCaLN3 (70 vegades la del fag M13). En el cas de les línies parentals aquest fag presenta una major eficiència d'unió a les PC3P (43 vegades la del fag M13) que a les LNCaP (27 vegades la del fag M13). El fag CAPL presenta una eficiència d'unió similar a les dues variants metastàsiques de càncer de pròstata PC3MM2 i LNCaLN3 (63 i 71 vegades la del fag M13) i superiors a la de les línies parentals PC3P i LNCaP (30 i 40 vegades la del fag M13 respectivament).

A continuació, s'han comparat les eficiències d'unió obtingudes de cadascun dels fags, normalitzades ja per la unió inespecífica del fag M13, sobre les cèl·lules PC3MM2 i PC3P (figura R.9).



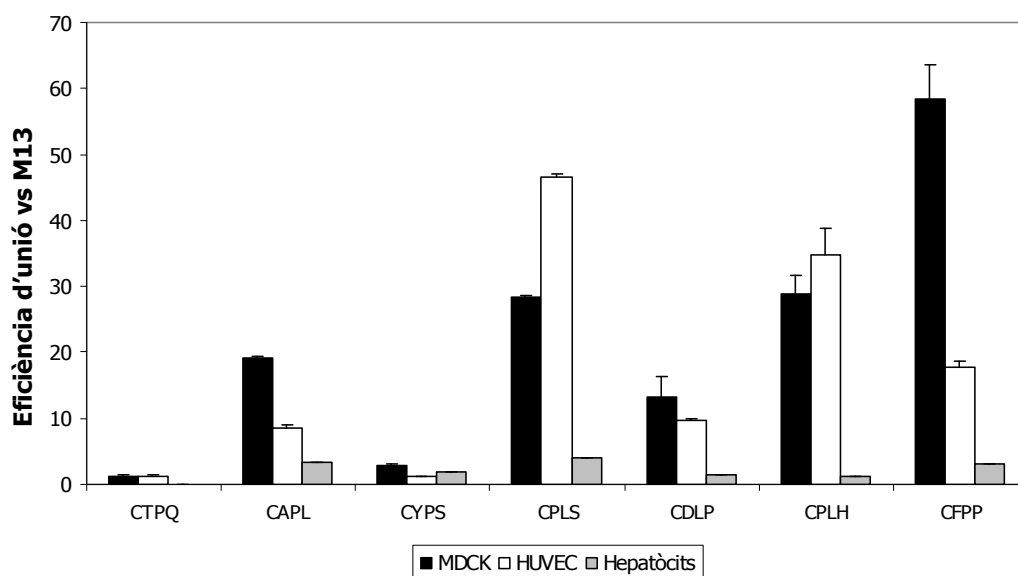
**Figura R.9.- Representació de la comparació de les eficiències d'unió dels fags seleccionats obtingudes sobre les cèl·lules PC3MM2 respecte les obtingudes sobre les cèl·lules PC3P.**  $5 \cdot 10^7$  *pfu* de poblacions homogènies dels fags portadors de les seqüències peptídiques candidates van ser incubades sobre les cèl·lules PC3MM2 i PC3P. El diagrama de barres indica la relació entre les eficiències d'unió de cada fag (calculada com la relació entre les *pfu* obtingudes després de l'assaig i les *pfu* incubades a l'inici de l'assaig) a les PC3MM2 respecte a l'obtinguda sobre les PC3P, ja normalitzades per l'eficiència d'unió del fag M13. Es mostra la mitjana de tres experiments independents i el seu error estàndard.

Els fags CPLS i CDLP presenten una eficiència d'unió similar a les dues línies cel·lulars (1,6 i 1,2 vegades a les PC3MM2 respecte a les PC3P respectivament). Les eficiències d'unió dels fags CAPL, CPLH i CFPP són de 2 vegades a les PC3MM2 respecte a les obtingudes en les PC3P. El fag CTPQ presenta una eficiència d'unió de 5 vegades sobre les PC3MM2 respecte les PC3P. És en el cas del fag CYPs on s'observa una major eficiència d'unió a les cèl·lules PC3MM2, concretament 11 vegades superior, respecte la seva línia parental PC3P.

#### **1.4.2.- Eficiències d'unió a línies cel·lulars no tumorals.**

Per tal de determinar si les seqüències peptídiques candidates podien també reconèixer proteïnes de la superfície de cèl·lules no tumorals, es van analitzar les eficiències d'unió dels fags relacionats amb les seqüències peptídiques seleccionades sobre les línies MDCK, HUVEC i hepatòcits murins (figura R.10). En els tres casos l'eficiència d'unió inespecífica donada pel fag M13 va ser inferior a les obtingudes pels fags seleccionats. El fag CTPQ presenta una eficiència d'unió similar a la del fag M13 a les cèl·lules MDCK i HUVEC, 1,2 vegades en ambdues línies cel·lulars. Cal comentar que aquesta dada no es va poder determinar pels hepatòcits murins. En el cas de les MDCK el fag que s'uneix amb una major eficiència és el fag CFPP (58 vegades més que el fag M13), seguit pels fags CPLS i CPLH (28 vegades més que el fag M13 en ambdós casos). En el cas de les HUVEC són aquests dos

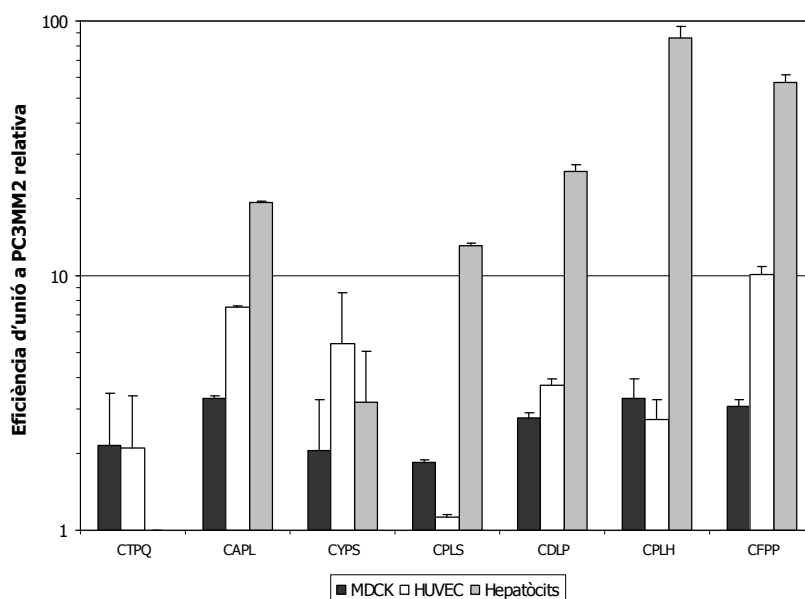
fags, CPLS i CPLH, els qui presenten una major eficiència d'unió (46 i 35 vegades més que el fag M13 respectivament). És en el cas dels hepatòcits murins on s'observen eficiències d'unió més baixes. Tant el fag CDLP com el fag CPLH presenten una eficiència d'unió similar a la del fag M13 (1,4 i 1,1 vegades respectivament). És el fag CPLS qui presenta una major eficiència d'unió essent tan sols 4 vegades la inespecífica, seguit pels fags CAPL i CFPP que presenten, respectivament, una eficiència d'unió 3,2 i 3,1 vegades la inespecífica.



**Figura R.10.- Representació de les eficiències d'unió dels fags seleccionats a les línies no tumorals.**  $5 \cdot 10^7$  pfu de poblacions homogènies dels fags portadors de les seqüències peptídiques candidates van ser incubades sobre les cèl·lules MDCK, HUVEC i hepatòcits murins. El diagrama de barres indica les eficiències d'unió de cada fag (calculada com la relació entre les pfu obtingudes després de l'assaig i les pfu incubades a l'inici de l'assaig) a cada línia cel·lular ja normalitzades per l'eficiència d'unió del fag M13. Es mostra la mitjana de tres experiments independents i el seu error estàndard.

Si comparem les eficiències d'unió dels fags sobre la variant metastàtica PC3MM2 respecte les obtingudes sobre les línies no tumorals (figura R.11), s'observa que en tots els casos els fags presenten una eficiència d'unió superior a les cèl·lules PC3MM2 que a les cèl·lules no tumorals. És en el cas del hepatòcits murins on s'observa una major eficiència d'unió dels fags seleccionats a les cèl·lules PC3MM2, destacant el fag CPLH, ja que s'uneix 85 vegades més a la variant metastàtica de càncer de pròstata que als hepatòcits murins. En el cas de les cèl·lules HUVEC destaca el fag CFPP -que s'uneix 10 vegades més a les cèl·lules PC3MM2- seguit pel fag CAPL -que presenta una eficiència d'unió 7,5 vegades superior a les cèl·lules PC3MM2 que a les cèl·lules HUVEC-. Les eficiències d'unió dels fags a les PC3MM2 comparades amb les obtingudes sobre les cèl·lules MDCK són entre 1,85 i 3,3 vegades superiors.

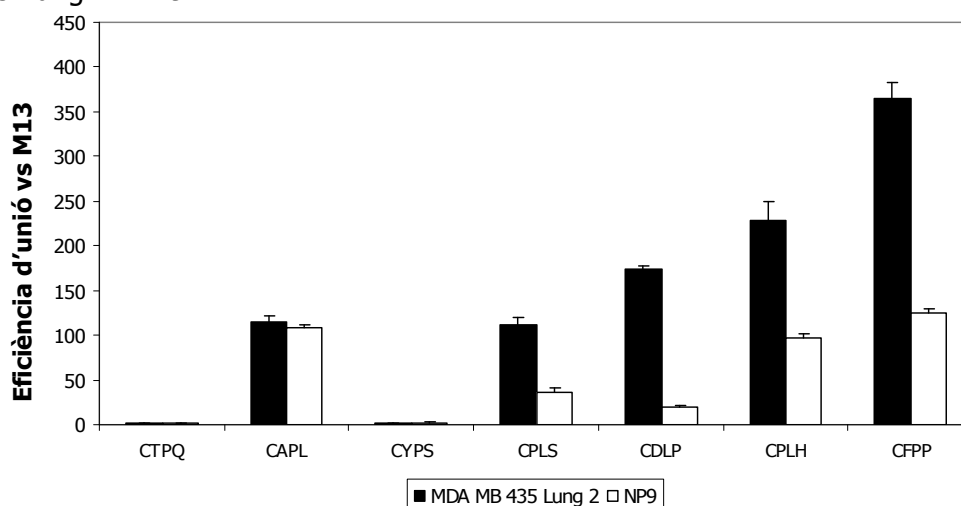




**Figura R.11.- Representació de la comparació de les eficiències d'unió dels fags seleccionats obtingudes sobre les cèl·lules PC3MM2 respecte les obtingudes sobre les cèl·lules no tumorals.**  $5 \cdot 10^7$  *pfu* de poblacions homogènies dels fags portadors de les seqüències peptídiques candidates van ser incubades sobre les cèl·lules PC3MM2, MDCK, HUVEC i hepatòcits murins. El diagrama de barres indica la relació entre les eficiències d'unió de cada fag (calculada com la relació entre les *pfu* obtingudes després de l'assaig i les *pfu* incubades a l'inici de l'assaig) a les PC3MM2 respecte a l'obtinguda sobre les MDCK (barres negres), HUVEC (barres blanques) i hepatòcits murins (barres grises), ja normalitzades per l'eficiència d'unió del fag M13. Es mostra la mitjana de tres experiments independents i el seu error estàndard.

#### 1.4.3.- Eficiències d'unió a altres línies cel·lulars tumorals humanes d'origen no prostàtic.

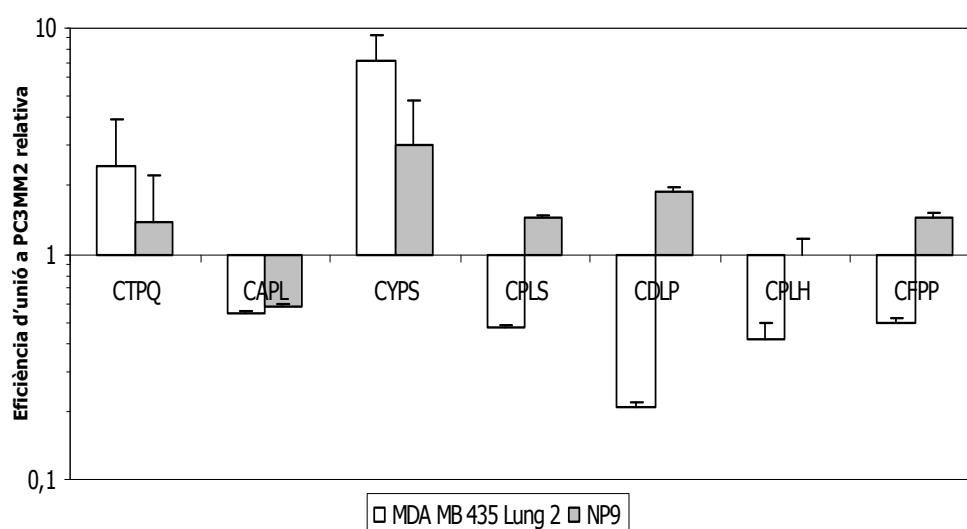
En la figura R.12 es mostren les eficiències d'unió dels fags CTPQ, CYPS, CAPL, CPLS, CPLH, CDPL i CFPP normalitzades ja per l'eficiència d'unió del fag M13 a les línies cel·lulars MDA MB 435 Lung 2 i NP9.



**Figura R.12.- Representació de les eficiències d'unió dels fags seleccionats a les línies tumorals d'origen no prostàtic.**  $5 \cdot 10^7$  *pfu* de poblacions homogènies dels fags portadors de les seqüències peptídiques candidates van ser incubades sobre les cèl·lules MDA MB 435 Lung 2 i NP9. El diagrama de barres indica les eficiències d'unió de cada fag (calculada com la relació entre les *pfu* obtingudes després de l'assaig i les *pfu* incubades a l'inici de l'assaig) a cada línia cel·lular ja normalitzades per l'eficiència d'unió del fag M13. Es mostra la mitjana de tres experiments independents i el seu error estàndard.

En ambdós casos, els fags CTPQ i CYPS presenten una eficiència d'unió similar a la inespecífica (1,07 i 0,83 vegades la del fag M13 en el cas de les MDA MB 435 Lung 2; 1,89 i 2 vegades la del fag M13 en el cas de les NP9). Excepte en el cas del fag CAPL, l'eficiència d'unió del qual és similar a les MDA MB 435 Lung 2 i a les NP9 (115 i 108 vegades la del fag M13 respectivament), els fags analitzats presenten una eficiència d'unió menor a la línia de càncer de pàncrees NP9 que a les cèl·lules MDA MB 435 Lung 2. Destaca el fag CFPP que s'uneix 365 i 125 vegades més que el fag M13 a les MDA MB 435 Lung 2 i a les NP9, respectivament.

Si comparem aquestes eficiències d'unió amb les obtingudes sobre les cèl·lules PC3MM2 (figura R.13) s'observa que els fags seleccionats presenten unes eficiències d'unió molt similars a les tres línies metastàtiques, destacant el fag CDLP que s'uneix 4 vegades més a les MDA MB 435 Lung 2 que a les PC3MM2 i el fag CYPS que s'uneix 7,2 i 3 vegades més a les PC3MM2 que a les MDA MB 435 Lung 2 i a les NP9 respectivament.



**Figura R.13.- Representació de la comparació de les eficiències d'unió dels fags seleccionats obtingudes sobre les cèl·lules PC3MM2 respecte les obtingudes sobre altres línies cel·lulars metastàtiques.**  $5 \cdot 10^7$  *pfu* de poblacions homogènies dels fags portadors de les seqüències peptídiques candidates van ser incubades sobre les cèl·lules PC3MM2, MDA MB 435 Lung 2 i NP9. El diagrama de barres indica la relació entre les eficiències d'unió de cada fag (calculada com la relació entre les *pfu* obtingudes després de l'assaig i les *pfu* incubades a l'inici de l'assaig) a les PC3MM2 respecte a l'obtinguda sobre les MDA MB 435 Lung 2 (barres blanques) i les NP9 (barres grises), ja normalitzades per l'eficiència d'unió del fag M13. Es mostra la mitjana de tres experiments independents i el seu error estàndard.

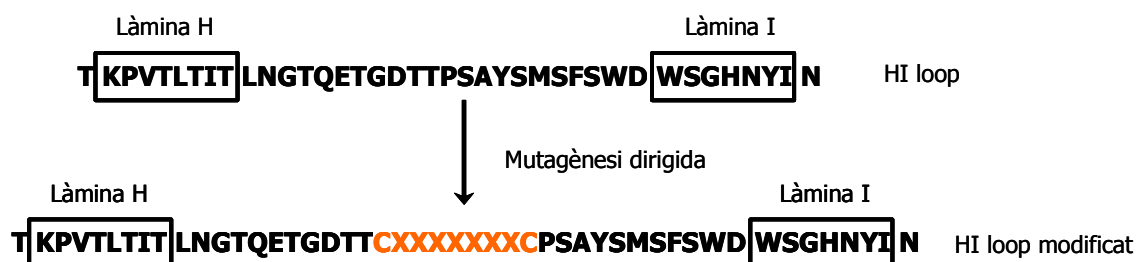
## **2.- DIRECCIONAMENT DE VECTORS ADENOVIRALS. INSERCIÓ DE LES SEQÜÈNCIES PEPTÍDIQUES ESCOLLIDES A L'HI LOOP DE LA FIBRA DE L'ADENOVIRUS 5.**

En la nostra opinió, l'ús de lligands específics que dirigissin la infecció dels vectors adenovirals a les cèl·lules i teixits diana augmentaria l'eficiència de la teràpia permetent l'ús de dosis menors de vector i disminuint així la toxicitat associada al vector (Mizuguchi and Hayakawa, 2004). En aquesta part del treball, hem volgut estudiar si les seqüències peptídiques escollides com a potencialment reconeixedores de les cèl·lules PC3MM2 podrien ser funcionals per a dirigir la infecció de vectors adenovirals a aquestes cèl·lules, tal i com s'ha descrit per altres seqüències seleccionades utilitzant altres línies cel·lulars (Dmitriev, Kashentseva, and Curiel, 2002; Kanerva et al., 2002; Kasono et al., 1999; Nicklin et al., 2003; Nicklin et al., 2001; Nicklin et al., 2004; Rein et al., 2004; Wu et al., 2002).

En el nostre disseny, de les seqüències peptídiques seleccionades a partir de la llibreria de fags se'n van escollir quatre pel direccionament de vectors adenovirals a cèl·lules metastàtiques de càncer de pròstata. La seqüència CTPQNTTMC va ser escollida com control negatiu, atès que aquesta seqüència es va trobar tan sols en la primera ronda de selecció de la llibreria de fags (taula R.1) i presentava unes eficiències d'unió baixes en totes les línies cel·lulars analitzades (apartat 1.4). La seqüència CYPERSPLC va ser escollida com a possible seqüència específica per a les PC3MM2, ja que presentava una eficiència d'unió 11 vegades superior a les cèl·lules PC3MM2 que a la seva línia parental PC3P (figura R.8). La seqüència CPLHQRPC va ser escollida com a representant del possible motiu peptídic PLXQRPM, que agrupava el 30% de les seqüències peptídiques obtingudes en la quarta ronda de selecció sobre les cèl·lules PC3MM2 (figura R.5 a)) i que va presentar una elevada eficiència d'unió a les diferents línies i variants cel·lulars tumorals utilitzades (apartat 1.4). Finalment, es va escollir la seqüència CFPPMFYDC com a representant del possible motiu peptídic XPPMFYD i que va presentar l'eficiència d'unió més elevada a les cèl·lules metastàtiques de càncer de pròstata analitzades (apartat 1.4.1).

### **2.1.- Disseny i construcció dels adenovirus recombinants.**

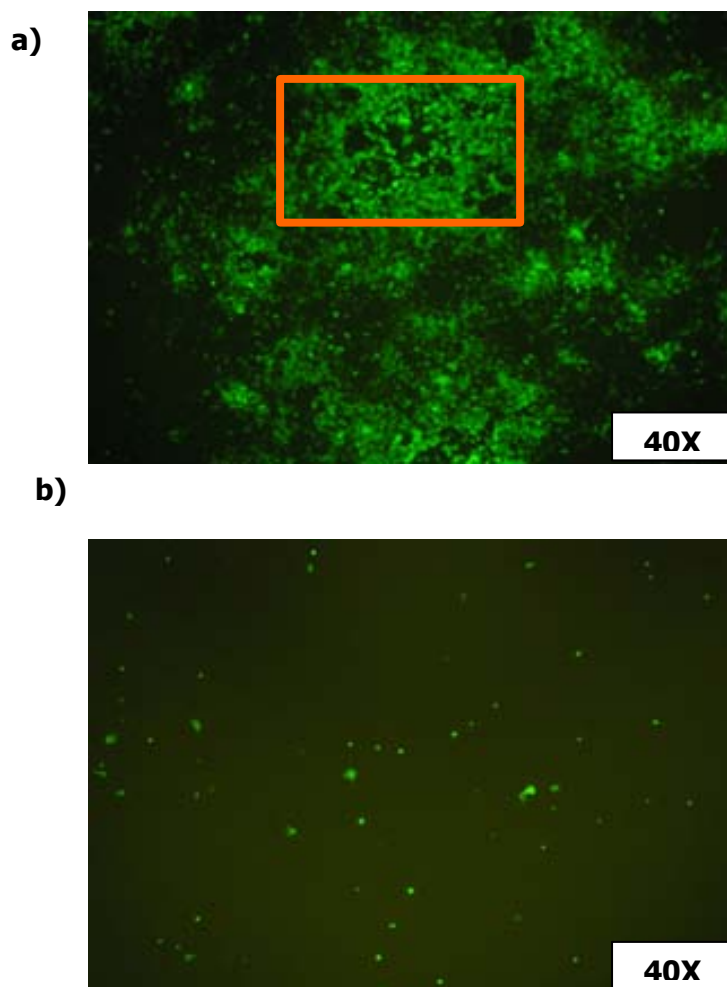
L'estratègia emprada fou expressar les seqüències peptídiques escollides a l'HI loop de la fibra de l'adenovirus 5 (Ad5) (figura R.14). Concretament les seqüències candidates es van inserir a l'HI loop de la fibra de l'Ad5 entre la treonina-546 i la prolina-547 sense modificar les seqüències de reconeixement del receptor CAR (Krasnykh et al., 1998).



**Figura R.14.- Esquema del procediment seguit per a la incorporació de les nostres seqüències peptídiques a l'HI loop de la fibra de l'Ad5.** Adaptat de (Krasnykh et al., 1998).

Tal i com s'explica a Materials i Mètodes (apartat 5), mitjançant la tècnica de mutagènesi dirigida, emprant els oligonucleòtids dissenyats per a cadascuna de les seqüències peptídiques (es van dissenyar de manera que cadascun contingués la seqüència consens d'un enzim de restricció diferent en cada cas) i el plasmidi pXK3.1 (que conté el gen codificant per la fibra de l'Ad5) (Belousova et al., 2002) es van incorporar les seqüències a l'HI loop de la fibra de l'Ad5 en la posició ja esmentada. Els plasmidis resultants de les mutagènesis dirigides amb les seqüències CTPQNTTMC, CYPERSPLC, CPLHQRPC i CFPPMFYDC es van digerir amb els enzims BsrGI (*New England Biolabs Inc., Beverly, MA, USA*), NruI (*New England Biolabs Inc., Beverly, MA, USA*), StuI (*New England Biolabs Inc., Beverly, MA, USA*) i AflIII (*New England Biolabs Inc., Beverly, MA, USA*) respectivament, per tal de determinar la incorporació de les seqüències al gen de la fibra. Una vegada obtinguts els DNAs amb les seqüències peptídiques incorporades al gen de la fibra i després de ser comprovats per seqüenciació automàtica (*ABI PRISM 377 DNA Sequencer, servei de seqüenciació de l'IRO*), es va alliberar el gen de la fibra per digestió enzimàtica d'1µg de DNA amb els enzims XbaI (*New England Biolabs Inc., Beverly, MA, USA*) i KpnI (*New England Biolabs Inc., Beverly, MA, USA*). Aquest es va purificar per posterior recombinació homòloga emprant la soca bacteriana *E.coli* BJ5183 amb el plasmidi pVK50TL (Bayo-Puxan et al., 2006) que conté el genoma complet de l'Ad5, amb la regió E1A substituïda pels gens de la proteïna verda fluorescent (GFP) i el de la luciferasa (luc) sota el control del promotor CMV -és el que anomenem casset d'expressió *Track-Luc* (TL)-. Mitjançant digestió enzimàtica, amb els enzims esmentats anteriorment, es van identificar els DNAs que contenien les seqüències peptídiques al gen de la fibra. Aquests DNAs es van comprovar per seqüenciació automàtica (*ABI PRISM 377 DNA Sequencer, servei de seqüenciació de l'IRO*). Una vegada obtingut el genoma complet de l'Ad5 amb les seqüències peptídiques incorporades a l'HI loop de la fibra, els adenovirus recombinants es van generar mitjançant la transfecció d'aquests DNAs (3µg) a les cèl·lules HEK293 (*Human Embryonic Kidney 293*).

Aquestes cèl·lules estan transformades amb un fragment de 4,5 Kb de l'extrem esquerre del genoma viral que inclou el gen E1A (Graham et al., 1977), i per tant, permeten la replicació d'adenovirus amb aquesta regió delecionada. Les cèl·lules transfectades amb els genomes de l'Ad5 amb les seqüències CTPQNTTMC, CYPSSRPLC i CPLHQRPCM incorporades a la fibra, van demostrar efecte citopàtic (resultant de la replicació del virus en les cèl·lules) indicant que aquests adenovirus recombinants es generaven correctament (figura R.15 a)). En canvi, en el cas de les cèl·lules transfectades amb el genoma de l'Ad5 amb la seqüència CFPPMFYDC incorporada a la fibra, no es va observar efecte citopàtic i, per tant, aquest adenovirus no es va poder generar (figura R.15 b)). L'adenovirus amb la seqüència CTPQNTTMC inserida a l'HI loop es va anomenar AdTLCTPQ, l'adenovirus amb la seqüència CYPSSRPLC inserida a l'HI loop es va anomenar AdTLCYPS i l'adenovirus amb la seqüència CPLHQRPCM inserida a l'HI loop es va anomenar AdTLCPLH.

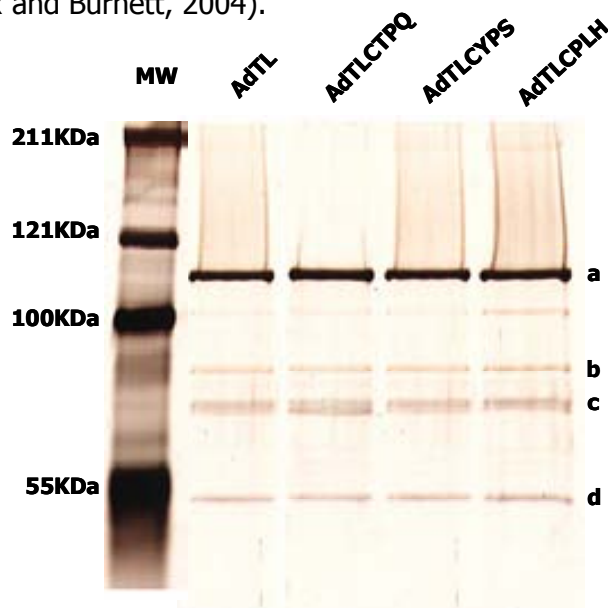


**Figura R.15.- Imatge de les cèl·lules HEK293 transfectades amb el genoma viral complet de l'AdTLCTPQ (a) i de l'AdTLCFPP (b).** Per tal de generar els adenovirus recombinants, les cèl·lules HEK293 es van transfectar amb 3 $\mu$ g genoma complet viral. Es mostra la imatge d'un camp (40X) obtinguda al cap de 5 dies de les cèl·lules HEK 293 transfectades amb el genoma viral de l'AdTLCTPQ (a) i de l'AdTLCFPP (b). El requadre taronja assenjala les cèl·lules amb efecte citopàtic.

Els extractes cel·lulars resultants de la transfecció es van utilitzar per infectar cèl·lules HEK293 per tal d'amplificar els adenovirus recombinants, aquests es van purificar per ultracentrifugació en gradients de CICs pel mètode estàndard (Graham and Prevec, 1995) i

es va determinar la titulació de les partícules virals (pv/ml) pel mètode espectrofotomètric (Maizel, White, and Scharff, 1968), obtenint  $1,364 \cdot 10^{12}$  pv/ml en el cas de l'AdTLCTPQ i de l'AdTLCPLH i  $1,54 \cdot 10^{12}$  pv/ml en el cas de l'AdTLCYPS. Juntament amb els tres adenovirus recombinants també es va purificar l'AdTL, que presenta la fibra sense modificar, obtenint  $1,16 \cdot 10^{12}$  pv/ml.

Degut a què havíem modificat genèticament el genoma viral i per tal de determinar que els adenovirus recombinants havien incorporat correctament les fibres modificades a la càpside, es va comparar el perfil proteic dels adenovirus recombinants AdTLCTPQ, AdTLCYPS i AdTLCPLH amb els de l'AdTL (Mahanivong et al., 2006). Per això  $8 \cdot 10^9$  pv dels virions purificats es van desnaturalitzar i es va resoldre en un gel 8% d'acrilamida en condicions desnaturalitzants. En la figura R.16 es mostra el gel resultant tenyit amb nitrat de plata, on s'observen les proteïnes majoritàries de l'Ad5: l'hexó de 109KDa (figura R.16 a), la base del pentó de 63KDa (figura R.16 b), la fibra de 61KDa (figura R.16 c) i la proteïna V de 41KDa (figura R.16 d) (Rux and Burnett, 2004).



**Figura R.16.- Imatge de l'electroforesi de les proteïnes majoritàries de l'adenovirus.**  $8 \cdot 10^9$  pv dels adenovirus AdTL, AdTLCTPQ, AdTLCYPS i AdTLCPLH purificats es van bullir en tampó de càrrega al 5% de  $\beta$ -mercaptoetanol i es van resoldre en un gel al 8% d'acrilamida en condicions desnaturalitzants. Es mostra el gel resultant tenyit amb nitrat de plata. Les proteïnes majoritàries de l'adenovirus estan indicades a la part dreta de la imatge: hexó (a), base del pentó (b), fibra (c) i proteïna V (d). A l'esquerra de la imatge es mostra el marcador de pes molecular *Pre-stained SDS-Page standards* (BioRad laboratories).

No s'observa cap canvi en el perfil d'aquestes proteïnes majoritàries dels tres adenovirus recombinants comparades amb les de l'AdTL, indicant-nos que la modificació genètica realitzada no havia afectat a la incorporació de les fibres modificades a la càpside dels adenovirus recombinants.

Els adenovirus obtinguts en aquest treball són defectius en replicació, atès que com ja hem comentat, la regió E1A es troba substituïda pel gen de la proteïna verda fluorescent (GFP) i el de la luciferasa (*luc*) sota el control del promotor CMV, anomenat casset d'expressió *Track-Luc* (TL). La quantificació de l'expressió d'aquests gens en les cèl·lules i teixits infectats amb els adenovirus recombinants, ens permetran determinar la capacitat d'infecció d'aquests en els experiments descrits posteriorment, tant en sistemes *in vitro* com *in vivo*.

## **2.2.- Estudi de la infecció *in vitro* dels adenovirus recombinants AdTLCTPQ, AdTLCYPS i AdTLCPLH.**

Per tal d'analitzar si els nostres adenovirus recombinants modificaven o no el tropisme natural de l'Ad5 mediat majoritàriament pel receptor CAR i les integrines  $\alpha_v\beta_3$  i  $\alpha_v\beta_5$ , vam emprar un repertori de línies cel·lulars que expressen diferents nivells de receptors, incloent-hi les nostres cèl·lules de pròstata candidates. Els nivells d'expressió de CAR i de les integrines  $\alpha_v\beta_3$  i  $\alpha_v\beta_5$  de les cèl·lules humanes de càncer de pròstata PC3P i PC3MM2, de la línia humana de càncer de mama MDA MB 435 Lung 2 i de la línia humana de càncer de pàncrees NP9 (ambdues prèviament emprades en l'apartat 1.4) es van analitzar mitjançant citometria de flux (taula R.4). En el cas de les cèl·lules HEK293, no es van determinar ja que està descrit que presenten elevats nivells d'aquests dos receptors (Dmitriev et al., 1998). Per a la detecció de CAR es va utilitzar l'anticòs monoclonal contra la proteïna CAR humana (RmcB, ATCC, CRL-2379) i per a la detecció de les integrines es va utilitzar l'anticòs monoclonal L230 (ATCC, HB-8448) que reconeix la subunitat  $\alpha_v$ . La unió d'aquests als antígens va ser monitoritzada amb un anticòs secundari conjugat amb FITC (*goat anti-mouse Alexa Fluor 488*, DAKO) i la intensitat de fluorescència va ser analitzada per FACSscan FC500-MPL (Beckman Coulter). Els resultats obtinguts amb l'IgG inespecífica (DAKO) ens indiquen la unió inespecífica del segon anticòs a les diferents línies cel·lulars.

Com s'indica a la taula R.4, tant la línia parental de càncer de pròstata PC3P com la variant metastàtica PC3MM2 presenten uns nivells d'expressió de CAR similars, essent els més elevats de les línies cel·lulars analitzades. En el cas de les MDA MB 435 Lung 2 l'expressió del receptor CAR és nul·la (observant-se un resultat inferior que en el cas de l'IgG inespecífica) i en el cas de les NP9 els nivells d'expressió d'aquest receptor és inferior a les línies de càncer de pròstata.

	<b>IgG inespecífica</b>		<b>Anti-CAR (RmcB)</b>		<b>Anti-<math>\alpha_v</math> (L230)</b>	
	% cèl·lules positives	Canal de fluorescència	% cèl·lules positives	Canal de fluorescència	% cèl·lules positives	Canal de fluorescència
<b>PC3P</b>	0,21	20	87,86	106	84,42	100
<b>PC3MM2</b>	0,25	39	88,81	108	63,88	129
<b>MDA MB 435 Lung 2</b>	0,4	20	0,13	18	93,26	138
<b>NP9</b>	0,99	17	88,48	51	93,11	182

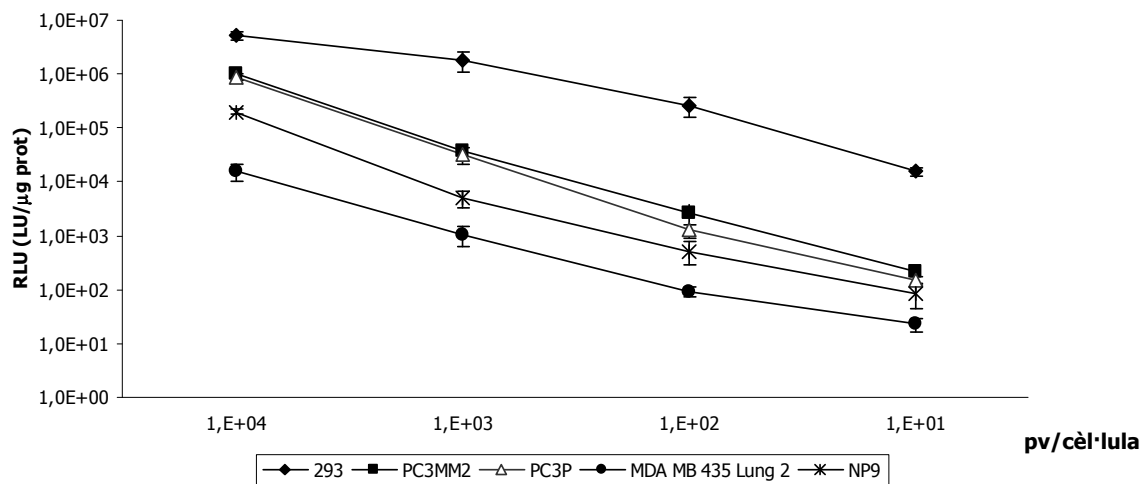
**Taula R.4.- Anàlisi per citometria de fluxe dels nivells d'expressió del receptor CAR i d'integrines  $\alpha_v$  a les línies cel·lulars PC3P, PC3MM2, MDA MB 435 Lung 2 i NP9.** La detecció es va fer mitjançant anticossos específics (l'hibridoma RmcB per a la detecció de CAR i l'hibridoma L230 per a la detecció d'integrines  $\alpha_v$ ), la unió dels quals fou monitoritzada amb un segon anticòs conjugat amb FITC i la intensitat de fluorescència fou analitzada per FACS-scan FC500-MPL (Beckman Coulter). L'IgG inespecífica ens indica la unió inespecífica de l'anticòs conjugat amb FITC a les diferents línies cel·lulars. S'indica, per cada cas, el percentatge de cèl·lules fluorescents i el canal d'intensitat de fluorescència.

En canvi, l'expressió d'integrines és superior tant en el cas de les NP9 com en el cas de les MDA MB 435 Lung 2. Els nivells d'expressió d'integrines és superior a la línia parental PC3P que a la seva variant metastàtica PC3MM2 (taula R.4).

A continuació, es va analitzar la infectivitat de l'Ad5 sense modificar (AdTL) a les diferents línies i variants cel·lulars emprades (figura R.17). Per tal de determinar la infectivitat dels adenovirus a les línies cel·lulars, les cèl·lules es van incubar a TA amb dilucions seriades (de  $10^4$ pv/cèl·lula a  $10^1$ pv/cèl·lula) dels virions purificats, 24 o 48 hores després (segons la línia cel·lular utilitzada) es van recollir les cèl·lules emprant el tampó de lisi RLB (*Reporter Lysis Buffer*, Promega) i se'n va mesurar la concentració de proteïna total i l'activitat luciferasa (apartat 10 de Materials i Mètodes). La infectivitat (RLU) es va calcular com a mesura relativa de l'expressió del gen de la luciferasa (LU) per unitat de proteïna ( $\mu$ g de proteïna) (figura R.17).

Tal i com es mostra en la figura R.17, les cèl·lules HEK293 van ser les que presentaren una major infectivitat a totes les dilucions de l'AdTL testades, probablement per l'entrada de l'adenovirus a través de CAR. En el cas de les PC3P i les PC3MM2, la infectivitat d'aquest Ad5 no modificat va ser molt similar, corresponent-se als nivells d'expressió de CAR obtinguts. La infectivitat de l'AdTL a les NP9 va ser inferior que a les línies de càncer de pròstata, i va ser en el cas de les MDA MB 435 Lung 2 on trobarem la menor infectivitat de l'AdTL.

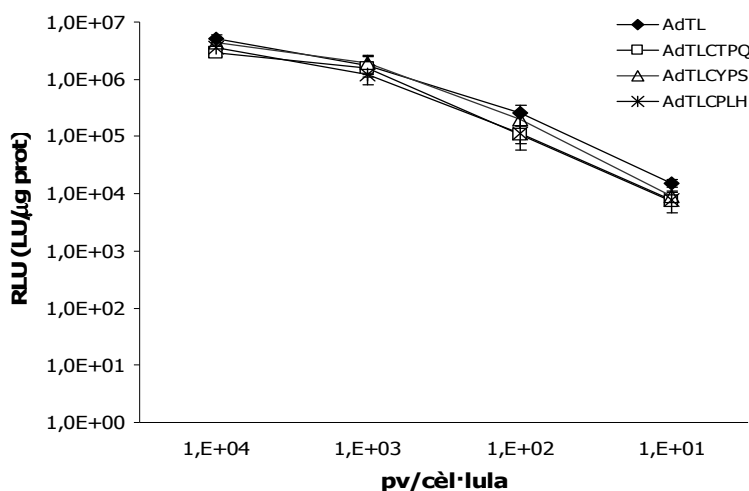




**Figura R.17.- Representació de la infectivitat de l'AdTL a les cèl·lules HEK293, PC3P, PC3MM2, MDA MB 435 Lung 2 i NP9.** Es van infectar cèl·lules HEK293, PC3P, PC3MM2, MDA MB 435 Lung 2 i NP9 amb dilucions seriades de l'AdTL no recombinant ( $10^4$  pv/cèl·lula,  $10^3$  pv/cèl·lula,  $10^2$  pv/cèl·lula,  $10^1$  pv/cèl·lula). 24 hores (en el cas de les cèl·lules HEK293) i 48 hores (en el cas de les altres línies cel·lulars) després de la infecció les cèl·lules es van recollir i es va quantificar la proteïna i l'activitat luciferasa. Es mostra la mitjana de l'activitat luciferasa relativa RLU (LU/ $\mu$ g proteïna) obtinguda de tres experiments ( $\pm$ SD).

Per tant, els resultats obtinguts de l'anàlisi de la infectivitat de l'AdTL a les diferents línies cel·lulars utilitzades (figura R.17) es corresponien amb els obtinguts de l'anàlisi dels nivells d'expressió de CAR (taula R.4), indicant-nos que el principal responsable de l'entrada de l'Ad5 no modificat en les línies cel·lulars analitzades és CAR (Kanerva and Hemminki, 2004).

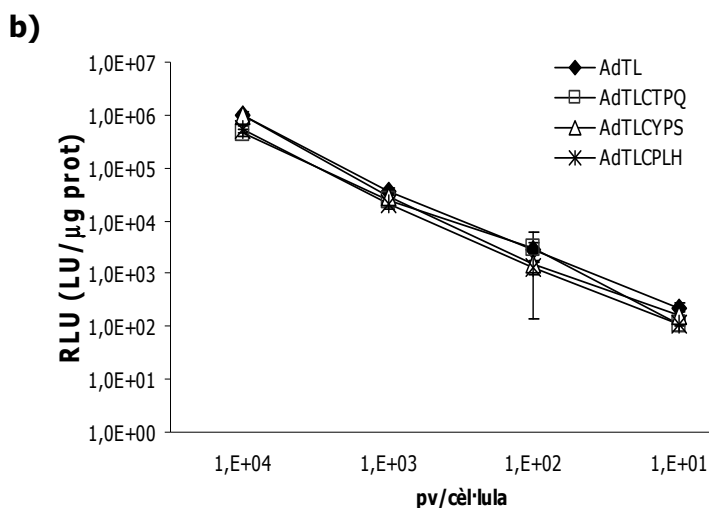
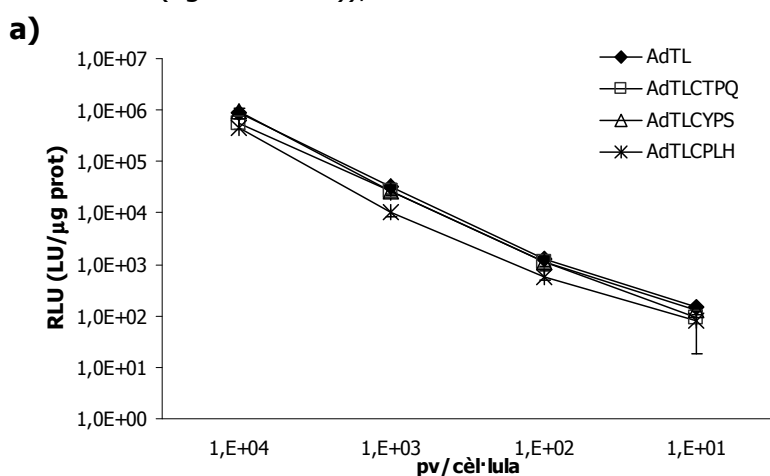
Per tal de determinar si la inserció de les seqüències peptídiques CTPQNTTMC, CYPSPSPLC i CPLHQRPC conferien canvis en la capacitat d'infectar de l'Ad5, es va analitzar la infectivitat dels adenovirus recombinants AdTLCTPQ, AdTLCYPS i AdTLCPLH, juntament amb la de l'AdTL (que ens indica la infectivitat de l'Ad5 deguda als receptors responsables del tropisme natural d'aquest) a les diferents línies cel·lulars esmentades. En la figura R.18 es mostra l'anàlisi de la infectivitat dels adenovirus recombinants a les cèl·lules epitelials HEK293.



**Figura R.18.- Representació de l'anàlisi de la infectivitat dels adenovirus AdTL, AdTLCTPQ, AdTLCYPS i AdTLCPLH a les cèl·lules epitelials HEK293.** Es van infectar cèl·lules en cultiu amb dilucions seriades de l'AdTL, AdTLCTPQ, AdTLCYPS i AdTLCPLH ( $10^4$  pv/cèl·lula,  $10^3$  pv/cèl·lula,  $10^2$  pv/cèl·lula,  $10^1$  pv/cèl·lula). La transducció dels virus es va analitzar 24 hores després de la infecció. Els valors indiquen la mitja de l'activitat luciferasa relativa referida a la quantitat de proteïna total -RLU (LU/ $\mu$ g proteïna)- de cada dilució viral testada obtinguda de tres experiments ( $\pm$ SD).

No es van observar diferències estadísticament significatives en la infecció de l'Ad5 de referència (AdTL) respecte a la dels adenovirus recombinants (AdTLCTPQ, AdTLCYPS i AdTLCPLH) pel que fa a les cèl·lules epitelials HEK293 en les quatre dilucions testades (figura R.18), indicant-nos que els adenovirus recombinants eren infectius. Concretament, la infectivitat de l'AdTL va ser entre 1,12 i 2 vegades la de l'AdTLCTPQ; entre 0,92 i 1,65 vegades la de l'AdTLCYPS i entre 1,45 i 1,92 vegades la de l'AdTLCPLH segons la dilució analitzada.

A continuació es va assajar la infectivitat dels adenovirus recombinants a les cèl·lules de pròstata candidates, la línia parental PC3P (figura R.19 a)) i la seva variant metastàtica PC3MM2 (figura R.19 b)), en relació a la del control d'Ad5 no modificat (AdTL).

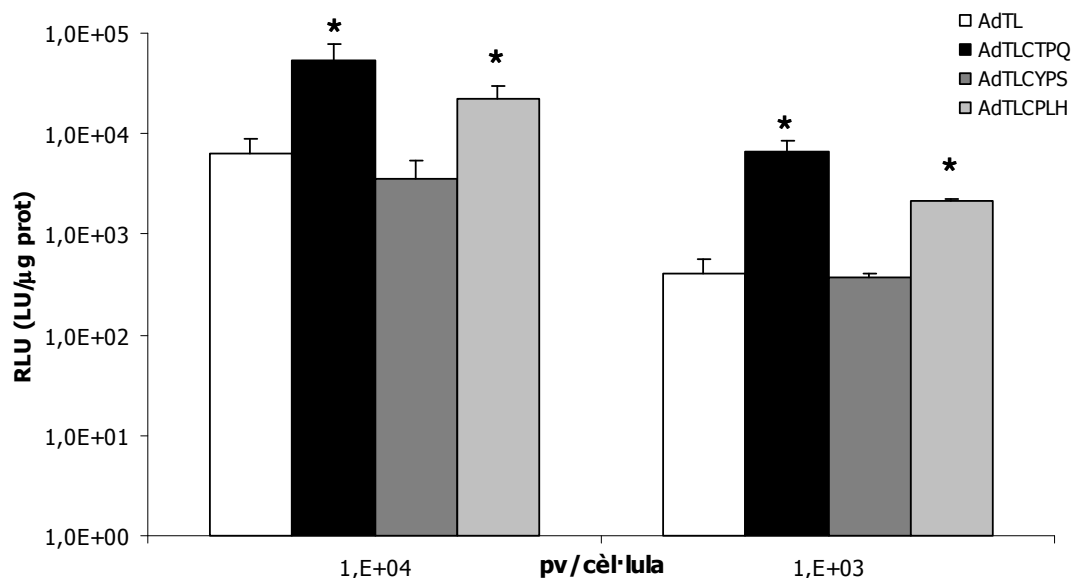


**Figura R.19.- Representació de la infectivitat dels adenovirus AdTL, AdTLCTPQ, AdTLCYPS i AdTLCPLH a la línia humana de càncer de pròstata PC3P (a) i a la seva variant metastàtica PC3MM2 (b)).** Les cèl·lules en cultiu es van infectar amb dilucions seriadades de l'AdTL, AdTLCTPQ, AdTLCYPS i AdTLCPLH ( $10^4$  pv/cèl·lula,  $10^3$  pv/cèl·lula,  $10^2$  pv/cèl·lula,  $10^1$  pv/cèl·lula). La transducció dels adenovirus es va analitzar 48 hores després de la infecció. Els valors indiquen la mitjana de l'activitat luciferasa relativa referida a la quantitat de proteïna total -RLU (LU/μg proteïna)- de cada dilució viral testada obtinguda de tres experiments ( $\pm$ SD).

Els resultats obtinguts no demostraren diferències estadísticament significatives en la infectivitat dels adenovirus recombinants respecte a la de l'AdTL a les quatre dilucions testades, ni en el cas de la línia de càncer de pròstata PC3P (figura R.19 a)) ni en el cas de la variant metastàtica PC3MM2 (figura R.19 b)). Concretament, en el cas de les PC3P, l'AdTL va demostrar una infectivitat entre 1,18 i 1,6 la de l'AdTLCTPQ; entre 0,96 i 1,2 la de

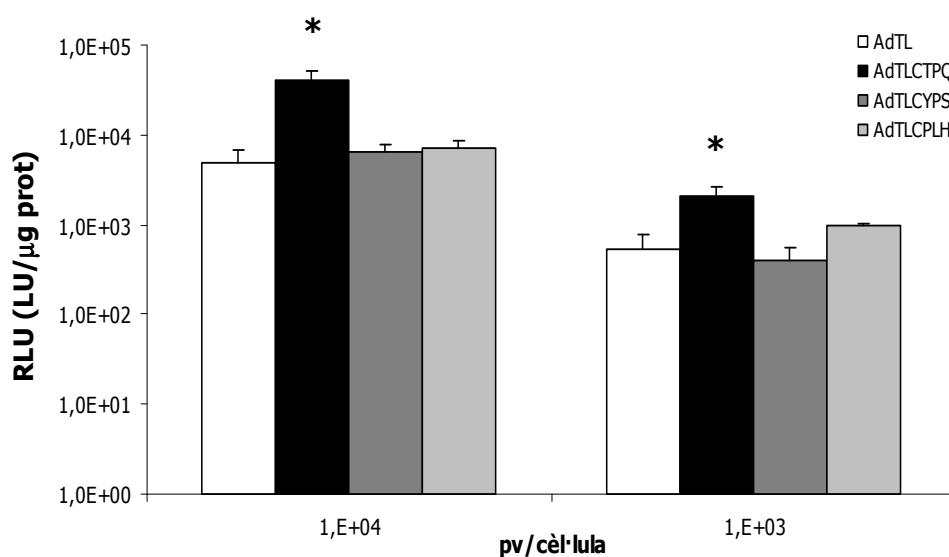
l'AdTLCYPS i entre 1,82 i 3,24 la de l'AdTLCPLH segons la dilució analitzada (figura R.19 a)). En el cas de les cèl·lules PC3MM2 la infectivitat de l'AdTL va ser entre 0,87 i 2,2 la de l'AdTLCTPQ; entre 1 i 1,76 la de l'AdTLCYPS i entre 1,77 i 2 la de l'AdTLCPLH segons la dilució analitzada (figura R.19 b)). El fet que no haguem observat diferències estadísticament significatives en els resultats d'infectivitat de les cèl·lules PC3P i PC3MM2 indica que la inserció de les seqüències CTPQNTTMC, CYPSRSPLC i CPLHQRPC a l'HI loop de la fibra no modifica la capacitat d'infecció del vector Ad5 a les línies cel·lulars esmentades en les condicions analitzades.

Atès que no es van observar diferències significatives en la infecció de les línies cel·lulars de càncer de pròstata, ens vam plantejar si la inserció de les seqüències peptídiques CTPQNTTMC, CYPSRSPLC i CPLHQRPC suposaria una millora en la infectivitat de línies amb baixa expressió de CAR (taula R.4) i d'unió provada d'aquestes seqüències (apartat 1.4) MDA MB 435 Lung2 i NP9, ja que s'ha descrit que adenovirus modificats genèticament mitjançant la nostra mateixa estratègia han demostrat un augment de la infectivitat de l'Ad5 de cèl·lules CAR negatives però no de cèl·lules CAR positives (Rein et al., 2004). Per això es va analitzar la infectivitat dels adenovirus recombinants (AdTLCTPQ, AdTLCYPS i AdTLCPLH), en relació a la de l'Ad5 no modificat (AdTL), a les cèl·lules MDA MB 435 Lung 2 (figura R.20) i NP9 (figura R.21).



**Figura R.20.- Representació de l'anàlisi de la infectivitat dels adenovirus AdTL, AdTLCTPQ, AdTLCYPS i AdTLCPLH a les cèl·lules de càncer de mama MDA MB 435 Lung 2.** Es van infectar cèl·lules en cultiu amb dilucions seriades de l'AdTL, AdTLCTPQ, AdTLCYPS i AdTLCPLH ( $10^4$  pv/cèl·lula i  $10^3$  pv/cèl·lula). La transducció dels virus es va analitzar 48 hores després de la infecció. Els valors indiquen la mitjana de l'activitat luciferasa relativa referida a la quantitat de proteïna total -RLU (LU/ $\mu$ g proteïna)- de cada dilució viral testada obtinguda de tres experiments ( $\pm$ SD). El símbol \* indica diferència significativa respecte als resultats de l'AdTL.

La infectivitat de l'AdTLCTPQ a les cèl·lules MDA MB 435 Lung 2 (figura R.20) va ser significativament superior a la del virus no modificat de referència (AdTL) per ambdues dilucions analitzades ( $10^4$  i  $10^3$  pv/cèl·lula ). Concretament aquest virus va demostrar una infectivitat 8,45 ( $p < 0,02$ ) i 16 ( $p < 0,01$ ) vegades més elevada que la de l'AdTL a  $10^4$  pv/cèl·lula i  $10^3$  pv/cèl·lula respectivament. Per altra banda, en aquesta línia cel·lular l'AdTLCLPH també va presentar un augment significatiu en la infectivitat, concretament, de 3,49 i 5,36 vegades respecte l'AdTL a  $10^4$  pv/cèl·lula i  $10^3$  pv/cèl·lula respectivament ( $p < 0,01$ ). Contràriament, l'AdTLCYPS va mantenir la infectivitat de l'AdTL en les dues dilucions testades.



**Figura R.21.- Representació de l'anàlisi de la infectivitat dels adenovirus AdTL, AdTLCTPQ, AdTLCYPS i AdTLCLPH a les cèl·lules de càncer de pàncrees NP9.** Es van infectar cèl·lules en cultiu amb dilucions seriades de l'AdTL, AdTLCTPQ, AdTLCYPS i AdTLCLPH ( $10^4$  pv/cèl·lula i  $10^3$  pv/cèl·lula). La transducció dels virus es va analitzar 48 hores després de la infecció. Els valors indiquen la mitjana de l'activitat luciferasa relativa referida a la quantitat de proteïna total -RLU (LU/ $\mu$ g proteïna)- de cada dilució viral testada obtinguda de tres experiments ( $\pm$ SD). El símbol \* indica diferència significativa respecte als resultats de l'AdTL.

En el cas de les NP9 (figura R.21), l'AdTLCTPQ també va demostrar un augment estadísticament significatiu de la seva infectivitat respecte a la de l'Ad5 no modificat (AdTL), concretament, de 8,22 i 3,91 vegades la de l'AdTL a  $10^4$  pv/cèl·lula i  $10^3$  pv/cèl·lula respectivament ( $p < 0,01$ ). En el cas de l'AdTLCLPH, es va detectar un augment de la infectivitat de 2 vegades respecte l'AdTL a  $10^3$  pv/cèl·lula, tot i que aquesta diferència no va ser estadísticament significativa. En les cèl·lules NP9 també l'AdTLCYPS va mantenir la infectivitat de l'AdTL en les dues dilucions testades.

Per tant, en ambdues línies cel·lulars, la inserció de la seqüència CTPQNTTMC a la fibra de l'Ad5 va suposar una millora de la infectivitat, ja que és en el cas de l'AdTLCTPQ on s'observa un augment estadísticament significatiu de la infectivitat respecte a la de l'AdTL. Per altra banda, en el cas de les MDA MB 435 Lung 2, la inserció de la seqüència

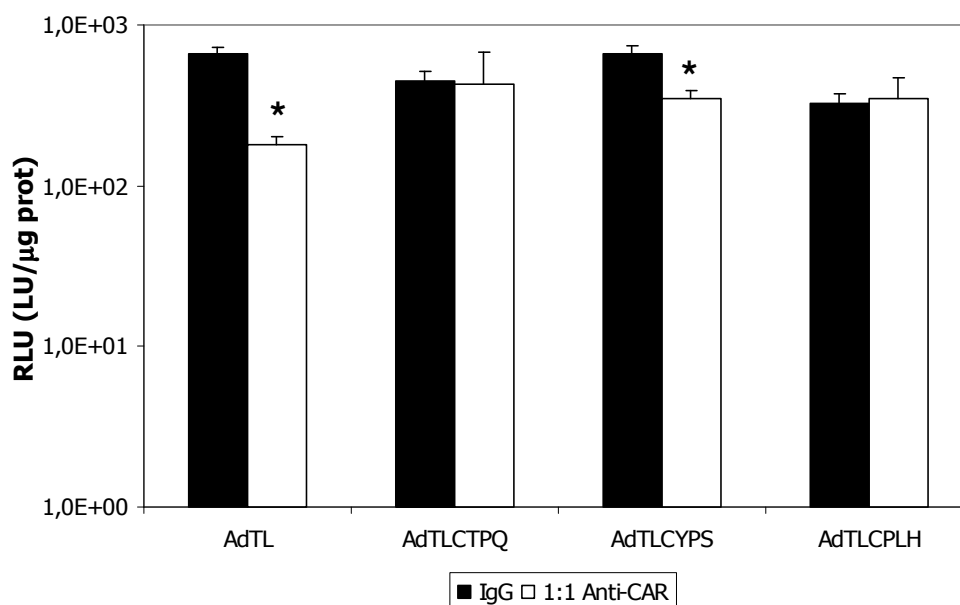
CPLHQRPC a la fibra de l'Ad5 també va suposar una millora de la infectivitat, atès que l'AdTLCPLH va demostrar una infectivitat significativament superior a la de l'AdTL en aquesta línia cel·lular. Aquests resultats suggereixen que tant l'AdTLCTPQ com l'AdTLCPLH podrien infectar aquestes cèl·lules utilitzant un receptor diferent al que està utilitzant l'AdTL.

### **2.3.- L'AdTLCTPQ i l'AdTLCPLH tenen la capacitat d'infectar les cèl·lules PC3MM2 utilitzant un receptor diferent a CAR.**

Degut als resultats obtinguts en els estudis d'infectivitat en les cèl·lules MDA MB 435 Lung 2 i NP9, ens vam plantejar si en experiments de bloqueig dels receptors CAR presents en les cèl·lules PC3MM2 els adenovirus recombinants presentarien una capacitat d'infecció diferent a la de l'AdTL. Tot i que s'han descrit diferents estratègies per aquesta finalitat (Belousova et al., 2002; Nicklin et al., 2001; Nicklin et al., 2004), en el nostre cas es va utilitzar un anticòs monoclonal de ratolí contra la proteïna humana CAR (RmcB) que inhibeix la unió de l'Ad5 a les cèl·lules (Dechecchi et al., 2000).

Per aquest assaig les cèl·lules PC3MM2 van ser incubades amb el sobrenedant de l'hibridoma anti-CAR (RmcB) abans de procedir a la infecció amb els diferents adenovirus (500 pv/cèl·lula). Tal com s'indica a Material i Mètodes (apartat 10) la incubació es va fer a 4°C emprant com a control una concentració equivalent d'IgG no específica. Com a mesura de la infectivitat es va determinar l'activitat del gen luciferasa. Els resultats mostrats en la figura R.22 indiquen que la infecció amb l'Ad5 de referència (AdTL) és significativament inferior després de la incubació de les cèl·lules amb l'anticòs anti-CAR (RmcB), indicant que havíem bloquejat CAR.

Com es pot veure en la figura R.22, tant en el cas de l'AdTL com en el de l'AdTLCYPS es va observar una disminució significativa ( $p < 0,01$ ) de la infectivitat després del tractament amb l'anticòs anti-CAR (RmcB) respecte la infectivitat obtinguda en les cèl·lules tractades amb l'IgG no específica, concretament, de 3,74 i 1,91 vegades respectivament. Tot i així, la disminució de la infectivitat va ser superior en el cas de l'AdTL (74%) que en el cas de l'AdTLCYPS (48%). Contràriament, el tractament amb l'anticòs anti-CAR (RmcB) no va suposar cap canvi estadísticament significatiu en la infectivitat de l'AdTLCTPQ ni de l'AdTLCPLH a les cèl·lules PC3MM2, essent aquesta infectivitat 0,95 i 1,07 vegades l'obtinguda en el cas de les cèl·lules tractades amb l'IgG no específica respectivament.



**Figura R.22.- Representació de l'anàlisi de la infectivitat dels adenovirus AdTL, AdTLCTPQ, AdTLCYPS i AdTLCPLH en cèl·lules PC3MM2 prèviament tractades amb l'anti-CAR RmcB.** Les cèl·lules PC3MM2 es van incubar durant 2 hores a 4°C amb una dilució 1:1 d'anti-CAR (RmcB) o de l'IgG no específica. A continuació les cèl·lules es van infectar amb 500 pv/cèl·lula de cadascun dels adenovirus durant 1 hora a TA. El medi es va substituir i la transducció dels virus es va mesurar 18 hores després. Els valors indiquen la mitjana de l'activitat luciferasa relativa referida a la quantitat de proteïna total RLU (LU/μg proteïna) de cada dilució viral testada obtinguda de tres experiments (±SD). El símbol \* indica diferència significativa respecte als resultats obtinguts amb el tractament amb la IgG no específica ( $p < 0,01$ ).

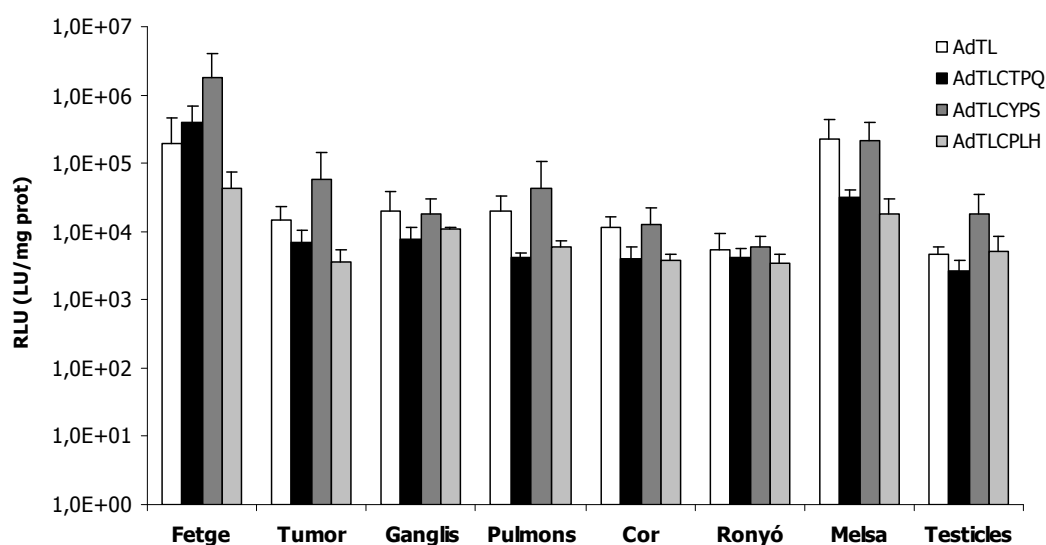
#### 2.4.- Estudi de la infecció *in vivo* dels vectors AdTLCTPQ, AdTLCYPS i AdTLCPLH en un model ortotòpic de càncer de pròstata.

Per determinar si la incorporació de les seqüències CTPQNTTMC, CYPSSRPLC i CPLHQRPC a l'HI loop de la fibra de l'Ad5 podrien modificar la biodistribució dels adenovirus *in vivo*, es va analitzar la infectivitat dels vectors AdTLCTPQ, AdTLCPLH i AdTLCYPS en un model ortotòpic de càncer de pròstata.

Es va utilitzar la variant metastàtica de càncer de pròstata PC3MM2 sobre la qual s'havia fet la selecció de les seqüències i que és altament metastàtica a pulmó i os (Pettaway et al., 1996). Experiments previs al nostre laboratori havien demostrat que la injecció ortotòpica de cèl·lules PC3MM2 a la pròstata de ratolins *Balb C/nude* produïa tumor i l'aparició de nòduls limfàtics en un 100% dels casos. Així doncs, la injecció sistèmica dels vectors adenovirals recombinants en aquest model animal ens permetria determinar si la inserció de les seqüències peptídiques CTPQNTTMC, CYPSSRPLC i CPLHQRPC a l'HI loop de la fibra de l'Ad5 suposaria alguna millora en la capacitat d'aquest d'unir-se al tumor.

Per això es van injectar sistèmicament  $5 \cdot 10^{10}$  pv dels adenovirus AdTL, AdTLCTPQ, AdTLCYPS i AdTLCPLH en ratolins *Balb C/nude* als quals se'ls havia implantat

ortotòpicament a pròstata  $10^6$  cèl·lules PC3MM2 i que ja havien desenvolupat tumor. Tal i com s'indica a Materials i Mètodes (apartat 11), 5 dies després es van sacrificar els animals per a l'anàlisi de l'expressió gènica -pel qual es va quantificar la concentració de proteïna total (BCA, Pierce) i l'activitat luciferasa dels extractes tissulars d'interès- i de l'acumulació del genoma viral mitjançant PCR a temps real. En la figura R.23 es mostren els resultats de la biodistribució dels adenovirus recombinants als diferents teixits obtinguda de l'anàlisi de l'expressió gènica, calculada com a activitat luciferasa (LU) relativa als mg de proteïna total (RLU).



**Figura R.23.- Representació de la biodistribució *in vivo* dels adenovirus AdTL, AdTLCTPQ, AdTLCYPS i AdTLCPLH en un model animal de càncer de pròstata.** Anàlisi de l'activitat luciferasa relativa dels diferents teixits després de la injecció sistèmica dels vectors AdTL, AdTLCTPQ, AdTLCYPS i AdTLCPLH. Es van implantar ortotòpicament a pròstata  $10^6$  cèl·lules PC3MM2 en ratolins Balb/c nude. 4 setmanes després es van injectar de forma sistèmica  $5 \cdot 10^{10}$  pv de cada adenovirus. La transducció dels virus es va mesurar 5 dies després de la infecció. Els valors indiquen la mitjana (n=5) de l'activitat luciferasa relativa RLU (LU/mg proteïna) de cada teixit ( $\pm$ SD).

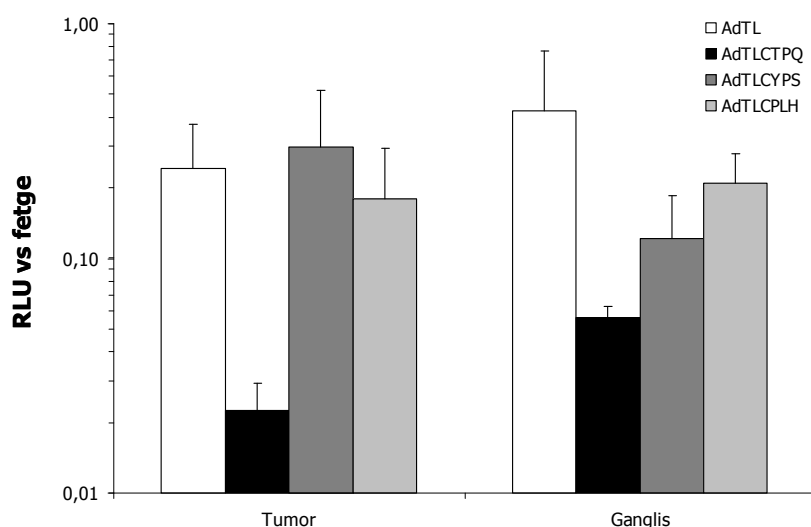
Els resultats obtinguts en el cas de l'Ad5 no modificat (AdTL) ens indiquen el patró de biodistribució de l'Ad5 degut al seu tropisme natural (Rein et al., 2004; Reynolds, Dmitriev, and Curiel, 1999), essent el fetge i la melsa els teixits que van presentar un valor més elevat d'infecció que la resta de teixits analitzats ( $1,98 \cdot 10^5 \pm 2,52 \cdot 10^5$  RLU i  $2,28 \cdot 10^5 \pm 2,12 \cdot 10^5$  RLU respectivament), seguits pels pulmons ( $1,98 \cdot 10^4 \pm 1,37 \cdot 10^4$  RLU), cor ( $1,15 \cdot 10^4 \pm 4,96 \cdot 10^3$  RLU), ronyó ( $5,47 \cdot 10^3 \pm 4,12 \cdot 10^3$  RLU) i testicles ( $4,67 \cdot 10^3 \pm 1,39 \cdot 10^3$  RLU), obtenint un valor d'infectivitat similar entre aquests teixits. Pel que fa als tres adenovirus recombinants AdTLCTPQ, AdTLCYPS i AdTLCPLH, es va obtenir un mateix patró de biodistribució de la infectivitat d'aquests teixits excepte en el cas de l'AdTLCYPS i de l'AdTLCPLH en què els testicles ( $1,81 \cdot 10^4 \pm 1,76 \cdot 10^4$  RLU i  $5,09 \cdot 10^3 \pm 3,42 \cdot 10^3$  RLU respectivament) van demostrar una infectivitat superior que l'observada en el cor ( $1,29 \cdot 10^4$

$\pm 9,08 \cdot 10^3$  RLU i  $3,74 \cdot 10^3 \pm 9,07 \cdot 10^2$  RLU respectivament) i els ronyons ( $6,02 \cdot 10^3 \pm 2,41 \cdot 10^3$  RLU i  $3,39 \cdot 10^3 \pm 1,25 \cdot 10^3$  RLU respectivament). Cap d'aquestes diferències va ser estadísticament significativa.

Si comparem els resultats obtinguts en el cas dels adenovirus recombinants amb els obtinguts en el cas de l'AdTL s'observen diferències, però en cap cas estadísticament significatives. Concretament a l'AdTLCTPQ les diferències més importants són les obtingudes en la melsa i el pulmó, en què aquest adenovirus va demostrar una infectivitat 7 i 4,8 vegades inferior a la de l'AdTL, respectivament. Aquest adenovirus va infectar el fetge 2 vegades més que l'AdTL. En el cas de l'AdTLCYPS destaquen els valors obtinguts en el cas del fetge i dels testicles, essent 3,9 i 3,4 vegades superiors als obtinguts en el cas de l'AdTL, respectivament. L'AdTLCPLH va demostrar una infectivitat del fetge i la melsa 5 i 12 vegades inferior a la de l'AdTL, respectivament.

Pel que fa a la infecció dels adenovirus recombinants a tumor i a ganglis comparada amb l'obtinguda en el cas de l'Ad5 no modificat (AdTL), també s'observen diferències però en cap cas estadísticament significatives. En el cas de l'AdTLCTPQ la infecció a ganglis va ser 3,7 vegades la de l'AdTL, en canvi en el cas del tumor la infectivitat observada va ser inferior a la de l'AdTL, concretament 2,14 vegades. La infecció de l'AdTLCYPS a tumor i ganglis va ser 3,9 i 0,9 vegades la de l'AdTL, respectivament. L'AdTLCPLH va demostrar una infectivitat, tant a tumor com a ganglis, inferior a la de l'AdTL, concretament 4,2 i 1,9 vegades respectivament.

En la figura R.24 es mostra la ràtio tumor/fetge i ganglis/fetge de cadascun dels adenovirus com a indicatiu de l'hepatotoxicitat dels vectors adenovirals (Rein et al., 2004).

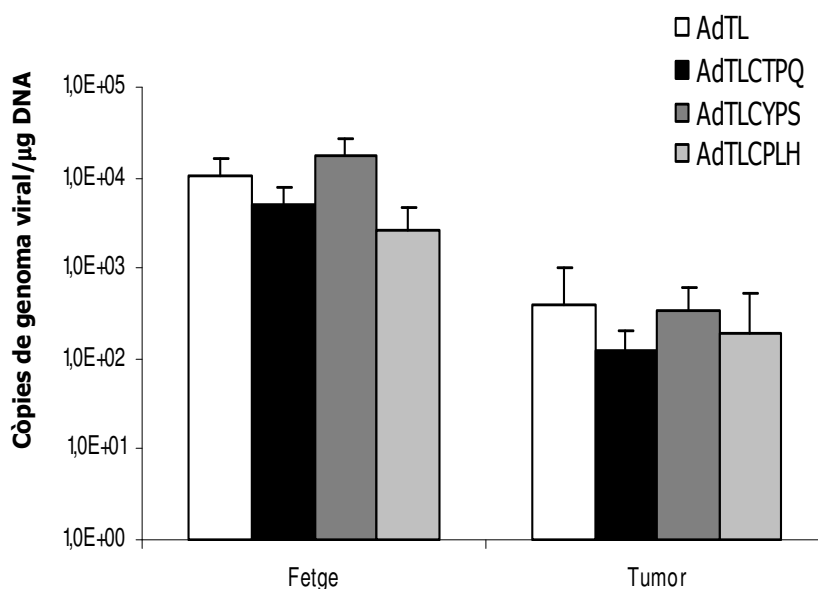


**Figura R.24.- Representació de les ràtios tumor/fetge i ganglis/fetge dels adenovirus recombinants.** Es van implantar ortotòpicament a pròstata  $10^6$  cèl·lules PC3MM2 en ratolins Balb/c nude. 4 setmanes després es van injectar de forma sistèmica  $5 \cdot 10^{10}$  pv de cada adenovirus. Al cap de 5 dies es van sacrificar els animals i es va quantificar l'activitat luciferasa i la concentració de proteïna dels extractes tissulars. Els valors indiquen la mitjana ( $n=5$ ) de la ràtio tumor/fetge i ganglis/fetge per virus ( $\pm$ SD).



Tal i com s'indica a la figura R.24 en tots els casos la ràtio tumor/fetge i ganglis/fetge va ser igual o inferior que la de l'Ad5 sense modificar, indicant-nos que la inserció de les seqüències peptídiques CTPQNTTMC, CYPSRSPLC i CPLHQRPC a l'HI loop de l'Ad5 no significava cap millora en la infectivitat del tumor i dels ganglis *in vivo*.

Es va analitzar l'acumulació del genoma viral a les mostres de fetge i de tumor dels quals havíem analitzat l'expressió gènica després de la injecció dels adenovirus recombinants. Tal i com s'explica a Materials i Mètodes (apartat 12), aquest anàlisi es va fer mitjançant PCR quantitativa a temps real emprant 50ng de DNA de cada teixit d'interès i els oligonucleòtids que ens amplifiquen la regió de l'HI loop de la fibra on havíem incorporat les seqüències candidates. En la figura R.25 es mostren els resultats obtinguts de l'acumulació del genoma viral normalitzats per la quantitat total de DNA de la mostra (obtinguda emprant oligonucleòtids específics pel gen 18S).



**Figura R.25.- Representació de l'acumulació del genoma dels adenovirus AdTL, AdTLCTPQ, AdTLCYPS i AdTLCPLH a fetge i tumor.** Anàlisi del número de còpies de genoma viral del fetge i del tumor d'animals injectats sistèmicament amb AdTL, AdTLCTPQ, AdTLCYPS i AdTLCPLH mitjançant PCR quantitativa a temps real. Es van implantar ortotòpicament a pròstata  $10^6$  cèl·lules PC3MM2 en ratolins Balb/C nude. 4 setmanes després es van injectar de forma sistèmica  $5 \cdot 10^{10}$  pv de cada adenovirus. 50ngr de DNA de cada teixit va ser analitzat utilitzant encebadors específics de la fibra de l'Ad i de 18S. Com a recta patró es va utilitzar 50ngr de DNA de fetge i de tumor de ratolins que no se'ls hi havia injectat adenovirus, contaminat amb  $10^8$ - $10$  còpies de genoma viral de l'AdTL. Els valors indiquen la mitjana ( $n=5$ ) de les còpies de genoma viral ( $\pm$ SD) normalitzades per la quantitat de DNA total ( $\mu$ g 18S).

Tal i com es mostra en la figura R.25, el número de còpies del genoma de l'AdTLCYPS detectat a fetge va ser 1,76 vegades superior que el detectat en el cas de l'AdTL ( $1,02 \cdot 10^4 \pm 5,83 \cdot 10^3$  còpies de genoma viral/ $\mu$ g de DNA), tot i que aquesta diferència no va ser estadísticament significativa. Pel que fa a l'AdTLCTPQ i l'AdTLCPLH, en ambdós casos el

número de còpies de genoma viral detectades va ser inferior a les detectades en el cas de l'AdTL, tot i que aquesta diferència tampoc va ser estadísticament significativa (1,99 i 3,8 vegades respectivament). Pel que fa al tumor, l'AdTL va ser el que va demostrar una major acumulació de genoma viral en aquest teixit ( $3,96 \cdot 10^2 \pm 6,09 \cdot 10^2$  còpies de genoma viral/ $\mu\text{g}$  de DNA). En el cas dels adenovirus recombinants AdTLCTPQ, AdTLCYPS i AdTLCPLH, les diferències observades respecte els resultats obtinguts de l'AdTL no van ser estadísticament significatives resultant en la detecció de l'acumulació dels genoma viral de 3,14, 1,18 i 2,11 vegades inferior, respectivament. Aquests resultats indiquen que la inserció de les seqüències peptídiques CTPQNTTMC, CYPSRSPLC i CPLHQRPMC a l'HI loop de la fibra de l'Ad5 no modifica l'acumulació del genoma d'aquests virus a fetge i a tumor en aquest model de càncer de pròstata.

Discussió



El càncer de pròstata és el càncer majorment diagnosticat en homes adults i la segona causa de mort, després del càncer de pulmó (Mabjeesh, Zhong, and Simons, 2002; MacRae et al., 2006; Mazhar and Waxman, 2004). En la malaltia localitzada, els tractaments convencionals com la prostatectomia radical, radioteràpia i braquiteràpia són els més utilitzats (MacRae et al., 2006). Tot i així, més d'un 30% de pacients amb la malaltia localitzada no es curen amb aquests tractaments (Stanizzi and Hall, 2007), esdevenint el desenvolupament de metàstasis el principal risc dels pacients amb càncer de pròstata. En la malaltia disseminada, la privació d'andrògens (Mabjeesh, Zhong, and Simons, 2002) i el Taxotere (docetaxel) (Freytag et al., 2007) són els més utilitzats, però l'eficàcia d'aquests tractaments és limitada atès que el tumor esdevé resistent al tractament hormonal (Mabjeesh, Zhong, and Simons, 2002) i a la quimioteràpia (Freytag et al., 2007), essent el desenvolupament de metàstasis la principal causa de mort dels pacients. Això justifica la cerca de noves teràpies que millorin l'eficàcia dels tractaments del càncer de pròstata, sobretot en presència de focus metastàtics en altres òrgans. En aquest sentit, la teràpia gènica podria ser una eina útil contra cèl·lules metastàtiques de càncer de pròstata si pogués ser emprada en clínica de manera segura i eficaç (Steiner, Gingrich, and Chauhan, 2002). Malgrat això, limitacions relacionades tant amb la potència dels gens terapèutics com amb l'eficiència i l'especificitat de transferència d'aquests dificulten la seva aplicació a la clínica (Vile, Russell, and Lemoine, 2000).

De fet, en els darrers anys s'han fet servir com a mínim 70 estratègies diferents de teràpia gènica pel càncer de pròstata -segons les bases de dades de *Genetic Modification Clinical Research Information System* (<http://www4.od.nih.gov/oba/RAC/GeMCRIS/GeMCRIS.htm>)- amb resultats excel·lents -sobretot en estudis preclínic- però, malauradament, molt pocs han arribat fins a la clínica i els que ho han fet han demostrat tenir una eficàcia molt limitada en assajos clínics -revisat a (Freytag et al., 2007)-. La majoria dels protocols de teràpia gènica en càncer de pròstata (concretament un 44%, *Gene Therapy Clinical Trials Worldwide* <http://www.wiley.co.uk/genetherapy/clinical/>) fan servir els adenovirus com a vectors de transferència de gens específics (com IL-2, HSV-tk i p53, entre altres), però no és només la baixa capacitat de transducció i/o expressió del gen la causa d'aquest poc èxit dels adenovirus, sinó probablement també la baixa selectivitat i especificitat per arribar a les cèl·lules tumorals de pròstata disseminades als ossos, al fetge o als pulmons. A més a més, el 78% dels assajos clínics de teràpia gènica del càncer de pròstata amb vectors adenovirals utilitzen la injecció intratumoral (segons les bases de dades de *Gene Therapy Clinical Trials Worldwide* <http://www.wiley.co.uk/genetherapy/clinical/>), que limita la teràpia als tumors

localitzats, a part que no assegura la transferència del transgen a la totalitat de les cèl·lules que formen el tumor degut a la baixa difusió del vector pel tumor (Wickham, 2000).

La baixa eficàcia dels tractaments del càncer de pròstata disseminat és, com a mínim i en part, deguda a la inaccessibilitat i/o al reconeixement específic de les cèl·lules metastàtiques en diferents òrgans. Això és així no tan sols pels tractaments convencionals amb citostàtics, sinó també pels vectors de teràpia gènica, motiu pel qual s'han desenvolupat les anomenades estratègies de *targeting* o vehiculació cap a les cèl·lules diana. En aquest sentit, l'experiència dels darrers anys en el disseny i *targeting* de polímers (Wang et al., 2003), liposomes conjugats amb citostàtics (Lopez-Barcons et al., 2004), pèptids proapoptòtics o citotòxics (Ellerby et al., 1999) o drogues citotòxiques com la doxorubicina (Miyazaki et al., 1997) és molt útil per als vectors de teràpia gènica i en particular, per a poder substituir els vectors terapèutics emprats en l'administració intraprostàtica per aquells que puguin ser emprats en l'administració sistèmica. Per a poder administrar sistèmicament un vector cal evitar la transferència del transgen als teixits i cèl·lules no diana i, per tant, aquest vector haurà d'estar específicament dirigit a les cèl·lules diana, fet que, a més a més, permetrà l'administració de dosis menors de vectors per assolir una transferència del transgen eficient (Mizuguchi and Hayakawa, 2004).

Hem comentat a la introducció que el direccionament de vectors terapèutics es pot fer utilitzant promotors específics de les cèl·lules de càncer de pròstata -com el del PSA o el de l'osteocalcina (Figueiredo et al., 2006; Kraaij et al., 2007; Lee et al., 2004; Zeng et al., 2007)- o bé modificant el tropisme natural de l'adenovirus -anomenat *targeting* transduccional- (Kanerva and Hemminki, 2004; Mizuguchi and Hayakawa, 2004; Rots et al., 2003). En estudis preclínic i clínic de *targeting* transduccional de vectors adenovirals pel càncer de pròstata -que només representen el 12% del total- tan sols s'han fet servir anticossos biespecífics o molècules bifuncionals contra proteïnes de membrana com el PSMA (Ikegami et al., 2005; Ikegami et al., 2006; Kraaij et al., 2005). Però la mida molecular d'aquests "vehicles" dificulta en part la seva estabilitat en circulació i la distribució en diferents òrgans des del sistema capil·lar (Reynolds, Dmitriev, and Curiel, 1999). És per això que l'ús de lligands peptídics i específics podria ser molt útil. De fet, la vehiculació de vectors terapèutics i de polímers-drogues mitjançant pèptids específics ha estat utilitzada amb èxit en estudis preclínic per a la transferència de gens específics a cèl·lules epitelials del sistema respiratori (Jost et al., 2001), a cèl·lules glandulars de la tràquea (Gaden et al., 2004), a cèl·lules endotelials (Nicklin et al., 2004), a cèl·lules de càncer cervical (Rein et al., 2004) i a cèl·lules de càncer d'ovari (Kanerva et al., 2002).

En aquest treball ens vam plantejar dues coses: en primer lloc trobar uns lligands peptídics adequats per vehiculitzar vectors terapèutics a cèl·lules metastàtiques de càncer de pròstata. En segon lloc i atès que els vectors terapèutics més eficaços són els adenovirus, vam voler esbrinar si aquestes seqüències podrien ser emprades per a modificar el tropisme natural dels adenovirus i si podrien transduir amb igual o més eficàcia a les cèl·lules metastàtiques. Per això, hem introduït a l'HI loop de la fibra de l'Ad5 les seqüències peptídiques seleccionades per *Phage Display* potencialment específiques per aquestes cèl·lules i hem analitzat la infectivitat dels adenovirus recombinants tant en sistemes *in vitro* com en sistemes *in vivo*.

### **Identificació de seqüències peptídiques específiques per al reconeixement de cèl·lules PC3MM2.**

En el nostre grup havíem pogut comprovar l'eficàcia del direccionament o vehiculació (*targeting*) de drogues com la doxorubicina a cèl·lules metastàtiques de mama, còlon o fibrosarcoma (Janes et al., 2001; Lopez-Barcons et al., 2005; Lopez-Barcons et al., 2004; Pechar et al., 2005), encoratjant-nos a trobar ara seqüències peptídiques específiques pel direccionament terapèutic a càncer de pròstata.

Per a la identificació de seqüències peptídiques específiques hem utilitzat una llibreria de *Phage Display*, ja que aquestes llibreries permeten la identificació dels lligands sense conèixer les característiques del receptor potencial i, a més a més, la selecció del lligand no es basa tan sols en el perfil d'expressió d'aquest receptor, si no també en la seva accessibilitat a lligands extracel·lulars (Jager et al., 2007). Concretament, hem utilitzat la llibreria de *Phage Display* Ph.D.-C7C, ja que, com ja hem comentat en altres apartats d'aquesta memòria, en aquesta llibreria els heptapeptids presenten una estructura tridimensional ben definida degut a la conformació cíclica que adopten i per tant es faciliten les interaccions proteïna-peptid (Smith and Petrenko, 1997). Aquest tipus de llibreries s'han fet servir tant *in vivo* (Bockmann et al., 2005; Essler and Ruoslahti, 2002; Pasqualini and Ruoslahti, 1996) com *in vitro* (Bockmann, Drosten, and Putzer, 2005; Robinson et al., 2005) per a la identificació de seqüències específiques per a diferents teixits i cèl·lules que, en alguns casos, han estat emprades per al direccionament específic de drogues anticancerígenes (Arap, Pasqualini, and Ruoslahti, 1998) i de vectors terapèutics (Bockmann, Drosten, and Putzer, 2005; Rittner et al., 2007) a les cèl·lules i teixits d'interès. En el nostre cas, vam escollir aquesta llibreria d'heptapeptids cíclics per emprar-los

inicialment en el direccionament de citostàtics ancorats a polímers, a nanopartícules o a liposomes, tal com s'havia fet en estudis previs del grup.

Efectivament, existeixen exemples previs de l'ús de llibreries de *Phage Display* (tot i que en cap cas de pèptids cíclics) per a la selecció de pèptids específics de càncer de pròstata (Romanov, Durand, and Petrenko, 2001). En alguns casos, el cribratge s'ha fet *in vivo* basant-se en el fet que la recuperació de fags localitzats en el tumor permetria identificar aquells pèptids (fags) que haurien arribat intactes al tumor i haurien escapat de la unió a d'altres factors sèrics (o tanmateix del RES del fetge), haurien reconegut l'antigen específic al qual s'hi haurien unit i fins i tot s'haurien pogut internalitzar. Els investigadors Rouslahti i Pasqualini van ser els pioners d'aquests tipus de cribratge *in vivo* per a seleccionar pèptids específics, sobretot de la vasculatura de diferents òrgans (Pasqualini and Ruoslahti, 1996; Ruoslahti, 2000). En el cas de pròstata, la identificació de seqüències reconeixedores de la microvasculatura s'ha utilitzat per vehicular-hi fàrmacs citotòxics (Arap et al., 2002). De totes maneres sembla que majoritàriament els cribratges *in vivo* s'utilitzen sobretot per seleccionar seqüències peptídiques que reconeixen antígens de la vasculatura (Michon et al., 2002) i són per altra banda poc utilitzats per identificar antígens tumorals en tumors sòlids. A més a més, l'elevat nombre d'animals d'experimentació necessaris per aquest tipus d'experiments de cribratge *in vivo* fa dissuasori aquest procediment .

En el nostre cas, el cribratge de la llibreria de *Phage Display* s'ha realitzat *in vitro* utilitzant cèl·lules de càncer de pròstata PC3MM2. Tal com s'ha documentat als resultats, després de les quatre rondes de *biopanning* hem obtingut un enriquiment selectiu de fags units a les cèl·lules diana de 16 vegades entre la primera i la quarta ronda (taula D.1).

Rondes de <i>biopanning</i>	Input (pfu)	Output (pfu)	Eficiència (output/output ronda anterior)
<b>Primera</b>	$2 \cdot 10^{10}$	$9,07 \cdot 10^5$	-
<b>Segona</b>	$2 \cdot 10^{10}$	$1,21 \cdot 10^7$	13
<b>Tercera</b>	$2 \cdot 10^{10}$	$3,32 \cdot 10^7$	2,7
<b>Quarta</b>	$2 \cdot 10^{10}$	$1,43 \cdot 10^7$	0,43

**Taula D.1.- Nombre de fags recuperats en cadascuna de les rondes de biopanning sobre les cèl·lules PC3MM2.** A la segona columna es mostren les *pfus* incubades a l'inici de la ronda (*input*), a la tercera columna les *pfus* recuperades al final de la ronda (*output*) i a la quarta columna la relació entre l'*output* i l'*output* de la ronda anterior.

Certament, esperàvem un major enriquiment de fags atesos els resultats utilitzant altres línies cel·lulars (Nicklin et al., 2000; Rasmussen et al., 2002; Zhang, Spring, and Schwab,



2001), ja que vam incloure 1 ronda de selecció negativa o de substracció (concretament la segona ronda de *biopanning*). Aquesta la vam incloure perquè preteníem eliminar les seqüències peptídiques que podrien interaccionar amb receptors cel·lulars expressats també a altres cèl·lules i possiblement poder augmentar la recuperació de fags portadors de seqüències específiques per a les cèl·lules PC3MM2 i que no reconeguessin a altres línies cel·lulars. Justament després d'aquesta ronda és quan hem obtingut un augment estadísticament significatiu ( $p \leq 0,02$ ) en el nombre de fags recuperats sobre les cèl·lules PC3MM2 -concretament de 13 vegades respecte la ronda anterior (figura R.3, pàgina 81)-.

En resum, de les  $1,28 \cdot 10^9$  seqüències peptídiques representades en la llibreria hem escollit aleatòriament 90 calbes, 30 de les quals al final del cribratge i d'aquestes hem identificat 21 seqüències peptídiques diferents, procedents de poblacions monoclonals de fags que s'uneixen a les cèl·lules PC3MM2 (taula D.2)

Núm. de fag	Núm. de ronda*	Seqüència (N → C)	Freqüència (%)
45	3	APLHRPM	10
50	3	<b>PLHQQRPM</b>	10
59	3	<b>PLAQRPM</b>	3,3
61	4	TYPWQPA	3,3
62	4	RTSTSLA	3,3
63	4	QSTNRPS	3,3
64	4	PTLMKLV	3,3
65	4	<b>PLSQRPM</b>	10
66	4	NKNNHT	3,3
67	4	LLFPRL	3,3
69	4	LPPMFYD	3,3
70	4	<b>PLDQRPM</b>	3,3
72	4	DLPMHPM	6,6
74	4	NYRNAMI	3,3
77	4	ERSHMRS	3,3
78	4	DTNSSAK	3,3
81	4	FPPMFYD	10
82	4	<b>PLQQRPM</b>	3,3
86	4	PMHQQRPM	3,3
87	4	PPKDRPM	3,3
89	4	WPDRSRA	3,3

**Taula D.2.- Relació de les 21 seqüències peptídiques diferents identificades en la quarta ronda de biopanning sobre les cèl·lules PC3MM2.** A la primera columna es mostra el número de fag, a la segona columna el número de ronda a la qual s'ha identificat per primera vegada la seqüència, a la tercera columna la seqüència peptídica i a la quarta columna la freqüència d'aparició de la seqüència.

A diferència d'altres treballs (Bockmann, Drosten, and Putzer, 2005; Nicklin et al., 2000; Rasmussen et al., 2002) en què les seqüències seleccionades van representar més del 40% del total de les seqüències identificades (taula D.3), en aquest treball no hem obtingut una única seqüència peptídica majoritària, però hem definit un motiu peptídic majoritari, el

PLXQRPM, dins el qual s'agrupen 5 seqüències peptídiques diferents que s'han trobat en 9 de les 30 seqüències identificades (marcades en negreta a la taula D.2).

Seqüència (N → C)	Tipus cel·lular (a què s'uneix)	Freqüència (%)	Llibreria de <i>Phage Display</i>	Autors
SIGYPLP	HUVEC	56	Ph.D.-7	(Nicklin et al., 2000)
HEWSYLAPYPWF	WiDr	54	Ph.D.-12	(Rasmussen et al., 2002)
HTFEPGV	MTC	44	Ph.D.-C7C	(Bockmann, Drosten, and Putzer, 2005)

**Taula D.3.- Relació de la freqüència d'aparició de les seqüències SIGYPLP, HEWSYLAPYPWF i HTFEPGV en el cribratge *in vitro* de llibreries de Phage Display sobre cèl·lules endotelials, cèl·lules WiDr i MTC.** A la primera columna es mostra la seqüència majoritària identificada en el cribratge sobre cèl·lules endotelials HUVEC (Nicklin et al., 2000), cèl·lules tumorals de càncer de còlon WiDr (Rasmussen et al., 2002) i cèl·lules de càncer medul·lar de tiroides (MTC) (Bockmann, Drosten, and Putzer, 2005) A la segona columna el tipus cel·lular a què s'uneixen, a la tercera columna la freqüència d'aparició (en %), a la quarta columna la llibreria utilitzada i a la cinquena columna la referència del treball publicat.

Els representants del motiu peptídic PLXQRPM els hem trobat en els tres triplicats de la quarta ronda de selecció (taula R.1, pàgina 83), fet que remarca la importància d'aquestes seqüències peptídiques. Per això hem triat per a estudis posteriors les dues seqüències majoritàries d'aquest motiu peptídic, CPLHQRPC i CPLSQRPC, juntament amb les altres seqüències peptídiques que hem trobat repetides, CAPLHRPMC, CDLPMHPMC i CFPPMFYDC -i que a diferència de les seqüències CPLHQRPC i CPLSQRPC, també les hem trobat repetides entre les seqüències identificades de la quarta ronda sobre la línia parental PC3P (taula R.2, pàgina 85)-. Aquest fet ens indica que aquestes tres seqüències reconeixen proteïnes expressades tant en la línia parental com en la variant metastàtica. També hem triat la seqüència peptídica CYPSPSLC per semblança amb un altre peptid trobat al laboratori (dades no mostrades). Cal dir que són seqüències peptídiques novedoses, ja que no s'ha descrit anteriorment la identificació de cap d'aquestes seqüències en el cribratge de llibreries de *Phage Display* utilitzant línies cel·lulars de càncer de pròstata ni altres línies cel·lulars.

Per tal de determinar si les seqüències candidates s'unien a receptors expressats a la superfície cel·lular de les cèl·lules PC3MM2, s'han analitzat *in vitro* les eficiències d'unió dels fags relacionats amb les diferents seqüències candidates sobre la variant metastàtica PC3MM2. Tots els fags amb les seqüències peptídiques seleccionades s'uneixen a les cèl·lules diana amb major eficiència que amb la que ho fa el fag que expressa la seqüència CTPQNTTMC -la qual vam escollir com a seqüència no específica- o el fag control (M13) (figura R.8, pàgina 98). Les eficiències d'unió a les cèl·lules PC3MM2 són molt variables segons la seqüència, compreses entre 6 i 178 vegades la del control, essent les seqüències

CAPLHRPMC, CPLHQRPC i CFPPMFYDC les que han demostrat una major eficiència d'unió (taula D.4).

<b>Fag</b>	<b>Eficiència d'unió a PC3MM2</b>
<b>M13</b>	1
<b>CTPQ</b>	2,6
<b>CAPL</b>	63
<b>CYPS</b>	6
<b>CPLS</b>	52
<b>CDLP</b>	36
<b>CPLH</b>	95
<b>CFPP</b>	178

**Taula D.4.- Relació de les eficiències d'unió dels fags analitzats a les cèl·lules PC3MM2.** Es mostra l'eficiència d'unió dels fags analitzats a les cèl·lules PC3MM2 normalitzats per l'eficiència d'unió inespecífica (fag M13).

La unió que hem trobat experimentalment amb les seqüències escollides encaixa amb les que d'altres autors han descrit per la unió de fags a cèl·lules en cultiu fent servir estratègies similars a la que nosaltres hem emprat (Jager et al., 2007). Per exemple, la seqüència CPLDIDFYC, seleccionada com a lligand per a cèl·lules de leucèmia, va presentar una eficiència d'unió similar a les obtingudes per algunes de les nostres seqüències, concretament de 100 vegades la del control (Jager et al., 2007). Però, les eficiències d'unió de seqüències seleccionades per *Phage Display* són molt variables i segurament depenen de l'estratègia de cribratge i de selecció utilitzada, ja que les eficiències d'unió de les seqüències peptídiques seleccionades per *Bockmann et al.* van ser inferiors que en el nostre cas, concretament entre 4 i 22 vegades la del control (Bockmann, Drosten, and Putzer, 2005) i també van ser inferiors que en el nostre cas (concretament de fins 25 vegades la del control) les eficiències d'unió de les seqüències seleccionades sobre la línia de càncer de pròstata LNCaP (Romanov, Durand, and Petrenko, 2001). En canvi, la seqüència HEWSYLAPYPWF va presentar un eficiència d'unió molt superior a les observades en el nostre cas, de 1000 vegades la del control (Rasmussen et al., 2002).

Un cop provada la unió dels fags a les nostres cèl·lules diana PC3MM2, vam explorar com cadascuna de les seqüències peptídiques (cadascun dels fags) podia també reconèixer i unir-se *in vitro* a altres cèl·lules, concretament, a altres línies tumorals -tant d'origen prostàtic com d'altres orígens- i a línies no tumorals. Els resultats obtinguts en les línies no tumorals demostren que totes les seqüències peptídiques s'uneixen amb una major eficiència a les cèl·lules PC3MM2 que a les cèl·lules no tumorals utilitzades, exceptuant la seqüència CPLSQRPC que ha demostrat una eficiència d'unió similar a les cèl·lules MDCK i HUVEC respecte la de les cèl·lules PC3MM2 (figura R.11, pàgina 101).

Els resultats més encoratjadors per a la possible utilització d'aquests pèptids en teràpia gènica han estat els obtinguts en el cas dels hepatòcits, en què les eficiències d'unió obtingudes han estat molt inferiors a les obtingudes sobre les cèl·lules PC3MM2 (entre 0,012 i 0,076 vegades pels fags CPLH i CPLS respectivament). El fet que aquestes seqüències s'uneixin amb baixa eficiència als hepatòcits és important atès que el fetge segresta més del 90% de vectors adenovirals administrats sistèmicament (Barnett, Crews, and Douglas, 2002), disminuint el vector disponible per arribar a les cèl·lules diana.

Pel que fa a les diferents línies tumorals d'origen prostàtic, totes les seqüències presenten unes eficiències d'unió superiors a les variants metastàtiques PC3MM2 i LNCaPLN3 que a les línies parentals PC3P i LNCaP, indicant que aquestes seqüències reconeixen amb una major eficiència les variants metastàtiques (figura R.8, pàgina 98). En totes les línies tumorals utilitzades, siguin o no d'origen prostàtic, la seqüència CFPPMFYDC és la seqüència que s'uneix amb una major eficiència, indicant-nos que aquesta seqüència podria ser reconeixedora de cèl·lules tumorals de diferents orígens (figura R.8, pàgina 98 i figura R.12, pàgina 101). Sorprenentment, els màxims valors d'eficiència d'unió de la majoria de les seqüències peptídiques analitzades els hem obtingut utilitzant la línia de càncer de mama MDA MB 435 Lung 2 i no les cèl·lules PC3MM2, sobre les quals aquestes seqüències van ser seleccionades. És a dir, les proteïnes cel·lulars a les quals s'uneixen aquestes seqüències peptídiques es troben també expressades i en un major nivell en les cèl·lules MDA MB 435 Lung 2. L'única seqüència peptídica que presenta una major eficiència d'unió a les cèl·lules PC3MM2 que a la resta de línies i variants tumorals analitzades és CYPSRSPLC (concretament entre 3 i 11 vegades més a les PC3MM2 que a la resta de línies cel·lulars per les cèl·lules NP9 i PC3P respectivament). Aquesta seqüència s'uneix a la resta de línies i variants tumorals analitzades amb una eficiència similar a la del control (M13), indicant que la unió d'aquesta seqüència a aquestes cèl·lules és inespecífica. Tot i que l'eficiència d'unió a les cèl·lules PC3MM2 no és molt elevada (6 vegades la del control), aquests resultats indiquen que aquesta seqüència s'uneix a una proteïna que presenta una major expressió a les cèl·lules PC3MM2 que a la resta de línies i variants tumorals analitzades, essent doncs més específica per a aquesta variant metastàtica de càncer de pròstata.

El fet que en alguns casos les seqüències analitzades s'uneixin amb una major eficiència o una eficiència similar a altres línies cel·lulars diferents a l'usada en la selecció, torna a encaixar amb els resultats obtinguts per altres seqüències peptídiques, com les seqüències TPRTQKA i KAMSWYA, identificades en el cribratge de la llibreria de *Phage Display* Ph.D.-C7C sobre cèl·lules de càncer medul·lar de tiroides i que s'uneixen amb una major eficiència

a les línies cel·lulars H1299 i HEK293 que a la usada per la selecció (Bockmann, Drosten, and Putzer, 2005). O la seqüència QIDRFDAVQWL, que va presentar un freqüència d'aparició del 100% en el cribratge de la llibreria Ph.D.-12 sobre cèl·lules WiDr, però que s'unia amb una mateixa eficiència a les cèl·lules HEK293 que a la usada per la selecció (Rasmussen et al., 2002).

La cerca de possibles homologies amb proteïnes cel·lulars és una anàlisi generalitzada en els treballs de cribratge de llibreries de *Phage Display*. En el nostre cas, no l'hem realitzat per a identificar els possibles receptors de les seqüències peptídiques -tal i com *Kolonin et al.* van realitzar per a la seqüència CRVASVLPC (Kolonin et al., 2006)- sinó com a aproximació per a determinar si aquestes seqüències presentaven homologia amb proteïnes de membrana o proteïnes que s'uneixen a proteïnes de membrana i per tant podrien tenir un paper en interaccions proteïna-proteïna (Romanov, Durand, and Petrenko, 2001). Concretament, hem trobat homologia amb lligands de receptors coneguts com FGF23 (seqüència YPSRSPL) i Jagged-2 (seqüència PLHQRPM). També amb proteïnes que es troben a l'espai extracel·lular, membrana basal i matriu extracel·lular i que per tant són candidates a ser reconegudes per possibles receptors cel·lulars com NOV (seqüència TPQNTTM), sFRP1 (seqüència TPQNTTM), ADAMTS5 (seqüència PLHQRPM) i Mucina 16 (seqüència FPPMFYD). Amb la regió extracel·lular proteïnes de membrana com MMP17 (seqüència YPSRSPL), HLAII DOB (seqüència YPSRSPL), DNER (seqüència TPQNTTM), SIGL9 (seqüència TPQNTTM), CD248 (seqüència PLHQRPM), Cadherina-11 (seqüència FPPMFYD) i ADAM 8 (seqüència CFPPMFYDC). També hem trobat homologia amb subunitats de les integrines  $\alpha_4$  i  $\alpha_5$  (seqüències FPPMFYD, PLHQRPM) i amb components de la matriu extracel·lular com el col·lagen (seqüència YPSRSPL). Es tracta de resultats preliminars que poden obrir noves línies d'estudi com la de l'expressió diferencial d'aquestes proteïnes en diferents tipus cel·lulars.

Pel que fa a l'ús de les seqüències seleccionades, vam voler estudiar la possibilitat de vehicular citostàtics mitjançant els pèptids cíclics. En col·laboració amb el Dr. Karel Ulbrich (Institute of Macromolecular Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic) vam tenir l'oportunitat d'assajar *in vitro* l'activitat de polímers biosintètics conjugats amb doxorubicina i dirigits a les cèl·lules mitjançant els pèptids ancorats al polímer. Els resultats preliminars d'aquesta estratègia indiquen que, efectivament, el pèptid CPLHQRPMC és un bon candidat per provocar la citostasi *in vitro* de les cèl·lules PC3MM2 (dades no mostrades). Actualment, el grup de recerca del Dr. Ulbrich està treballant per millorar les

condicions de síntesi i conjugació del polímer per optimitzar les ràtios (polímer vs doxorubicina i pèptid) que permetrà estudis en aquesta direcció.

**Construcció d'un vector adenoviral dirigit amb les seqüències CTPQNTTMC, CYPSSPLC, CPLHQRPC i CFPPMFYDC a l'HI loop de la fibra de l'Ad5.**

Vam decidir la construcció d'un vector viral per ús terapèutic contra les cèl·lules de pròstata. Vam escollir els adenovirus recombinants com a vectors atès a : (1) la seva elevada capacitat de transferència del transgen tant de cèl·lules en divisió com quiescents sense integrar el seu genoma al genoma de la cèl·lula hoste (Kovesdi et al., 1997), (2) el seu genoma pot acomodar fragments grans de DNA (Bett, Prevec, and Graham, 1993), (3) que no són oncogènics en humans (Belousova et al., 2002; McConnell and Imperiale, 2004; Mizuguchi and Hayakawa, 2004) i (4) com ja hem comentat abans, han estat els més utilitzats en càncer de pròstata (*Gene Therapy Clinical Trials Worldwide* <http://www.wiley.co.uk/genetherapy/clinical/>).

Molt concretament, l'objectiu d'aquesta part del treball fou la modificació del tropisme natural de vectors adenovirals, atès que volíem evitar la infecció mediada pels receptors virals majoritaris, el *Cocksacie and Adenovirus Receptor* (CAR) (Bergelson et al., 1997), les integrines  $\alpha_v\beta_3$  i  $\alpha_v\beta_5$  (Wickham et al., 1993) i els heparan sulfats glicosaminoglicans (Dechecchi et al., 2000). Per això vam voler utilitzar les seqüències peptídiques seleccionades prèviament, tot i que probablement no tindrien la mateixa eficiència, doncs a diferència dels fags, els pèptids a la fibra adenoviral no adoptarien la conformació cíclica atès que no es poden formar els ponts disulfur degut a la localització citoplasmàtica i no al reticle endoplasmàtic, però podrien ser igualment útils pel reconeixement de les cèl·lules diana mitjançant els 7 aminoàcids centrals.

De totes les possibles localitzacions de lligands específics a la càpside de l'adenovirus, la modificació de l'HI loop és la més eficient (Campos and Barry, 2006; Kurachi et al., 2007). Per això nosaltres hem introduït les seqüències CYPSSPLC, CPLHQRPC i CFPPMFYDC a l'HI loop de la fibra de l'Ad5 amb la pretensió que pogués dirigir-se cap a les cèl·lules diana PC3MM2. Alhora també hem inclòs la seqüència peptídica CTPQNTTMC, que no discriminava entre les nostres o altres cèl·lules i s'unia a qualsevol d'elles inespecíficament, per tal de construir un adenovirus que no dirigís específicament cap a cèl·lules PC3MM2 i que ens servís per a determinar l'efecte inespecífic de la modificació de l'HI loop.

Per a la incorporació d'aquestes seqüències s'ha utilitzat un mètode basat en la mutagènesi dirigida del gen de la fibra i posterior recombinació homòloga del gen de la fibra amb les seqüències peptídiques incorporades amb el genoma complet de l'Ad5. Degut a la gran diferència en la mida entre el gen de la fibra (3,1Kb) i el genoma complet del virus (40Kb), l'eficiència de recombinació és molt baixa. Per això, s'utilitza l'estratègia de construir un plasmidi intermedi (anomenat pShuttle) augmentant així l'èxit de la recombinació homòloga (Bayo-Puxan et al., 2006; Belousova et al., 2002; Krasnykh et al., 1998; Krasnykh et al., 1996). En el nostre cas, aquest plasmidi intermedi no el vam obtenir potser per una baixa eficiència en el procés de lligació i el genoma viral complet amb les fibres modificades es va aconseguir mitjançant la recombinació homòloga directa del gen de la fibra amb el genoma viral complet. Per tal de generar els adenovirus recombinants s'han transfectat cèl·lules HEK293 amb els genomes virals amb les fibres modificades. Dels 4 adenovirus recombinants amb les fibres modificades, l'adenovirus amb la seqüència CFPPMFYDC (l'AdTLCFPP) ha estat impossible de generar, ja que no hem observat efecte citopàtic en les cèl·lules HEK293 transfectades amb el seu genoma (figura R.15, pàgina 105). Tot i que la seqüència (de 9 aminoàcids) per longitud és compatible amb la polimerització de la fibra – *Belousova et al.* van demostrar la incorporació de fins a 100 aminoàcids a l'HI loop de la fibra (Belousova et al., 2002)-, vam suposar que la possible causa seria o efectes en l'estructura de la fibra (Ghosh and Barry, 2005) o efectes estèrics en el reconeixement de CAR (Xia et al., 2000). Per tal de comprovar-ho seria necessari transfectar el genoma viral d'aquest adenovirus recombinant en cèl·lules empaquetadores que s'utilitzen per a la generació i propagació d'adenovirus amb el tropisme natural modificat, com les cèl·lules 211B (Von Seggern et al., 1998) o les HEK293-Fb (Leissner et al., 2001) -que expressen la fibra de l'Ad5 de forma constitutiva-. En el cas dels adenovirus recombinants AdTLCTPQ, AdTLCYPS i AdTLCPLH s'han generat, amplificat i purificat obtenint titulacions similars que en el cas de l'AdTL, indicant que la inserció d'aquestes tres seqüències peptídiques no afecta a la infecció cel·lular i a la replicació de l'Ad5.

**Efecte de la inserció a l'HI loop de la fibra de les seqüències peptídiques CTPQNTTMC, CYPERSPLC i CPLHQRPC sobre la infectivitat *in vitro* i *in vivo* dels nostres vectors.**

Els resultats obtinguts en experiments *in vitro* (apartat 2.2 de Resultats, pàgina 107) sobre les cèl·lules PC3MM2 i PC3P no demostren una millora en la infectivitat de l'Ad5 a les cèl·lules PC3P i PC3MM2, que expressen elevats nivells de CAR. Tot i així, els resultats obtinguts en les cèl·lules MDA MB 435 Lung 2 i NP9 (ambdues expressen baixos nivells de

CAR) i en els experiments de bloqueig de CAR en cèl·lules PC3MM2 demostren que la inserció a l'HI loop de les seqüències CTPQNTTMC i CPLHQRPC, i no de la seqüència CYPSSPLC, dóna la capacitat a l'Ad5 per a infectar aquestes cèl·lules a través d'un receptor diferent a CAR i que, per tant, els adenovirus AdTLCTPQ i AdTLCPLH poden infectar les cèl·lules a través de dues vies: una dependent de CAR i l'altra independent de CAR i segurament a través del receptor d'aquestes seqüències peptídiques -tal i com es va suggerir per l'AdNGR-L2 (Mizuguchi et al., 2001) que expressa la seqüència NGR, que reconeix l'aminopeptidasa N (Pasqualini et al., 2000)-. Aquests resultats també encaixen amb els obtinguts en el cas d'adenovirus amb la seqüència RGD insertada a l'HI loop que van demostrar un augment de la infectivitat en cèl·lules CAR negatives (i per tant refractàries a ser infectades per aquests virus) i que expressen el receptor d'aquestes seqüències (Wu et al., 2002) però no de cèl·lules CAR positives (Rein et al., 2004). El fet que la millora en la infectivitat de l'AdTLCTPQ i de l'AdTLCPLH a les cèl·lules PC3MM2 només l'observem en condicions de bloqueig de CAR (figura R.22, pàgina 114) es pot explicar, doncs, per una menor afinitat d'aquestes seqüències pel seu possible receptor que no la de les seqüències reconeixedores de CAR per aquest i/o per una menor expressió del possible receptor de les seqüències comparada amb la de CAR en aquesta línia cel·lular (Oh, Engler, and Joung, 2005). L'augment de la infectivitat dels adenovirus recombinants en cèl·lules CAR negatives ha estat de com a màxim 16 vegades la de l'AdTL (concretament per l'AdTLCTPQ en les cèl·lules MDA MB 435 Lung 2). Aquest augment d'infectivitat és inferior que els obtinguts pels adenovirus amb la seqüència RGD (Kurachi et al., 2007) o NGR (Mizuguchi et al., 2001) a l'HI loop de la fibra que infectaven a cèl·lules CAR negatives entre 230 (cèl·lules SF295) i 100 (cèl·lules LN444) vegades més que l'adenovirus amb les fibres sense modificar. Aquests resultats segurament són deguts a què els receptors de les seqüències RGD i NGR, integrines i CD13 respectivament, es troben altament expressats en aquestes línies cel·lulars (Kurachi et al., 2007; Mizuguchi et al., 2001) i, per tant, els nostres resultats es podrien explicar per una baixa expressió del possible receptor de la seqüència en les línies cel·lulars analitzades.

Per altra banda, voldríem comentar que les cèl·lules MDA MB 435 Lung 2 han estat referenciades en aquest treball com a cèl·lules de càncer de mama, però probablement no són un model representatiu de càncer de mama, ja que molt recentment s'ha demostrat que tenen un origen melanocític (Christgen and Lehmann, 2007; Rae et al., 2007). Els baixos nivells de CAR (taula R.4, pàgina 108) de les cèl·lules MDA MB 435 Lung 2 -que són altament invasives- es podrien explicar pel fet que s'ha descrit la pèrdua d'expressió de CAR



a nivell transcripcional en cèl·lules que han patit la transició epitel·li-mesènquima (Lacher et al., 2006). En aquest sentit, l'estratègia de modificar els adenovirus ens interessa precisament per vehicular els adenovirus. És a dir, hem demostrat que els pèptids podrien servir per vehicular els adenovirus a les cèl·lules que expressen nivells baixos de CAR i per tant són poc susceptibles a ser infectades i que, com ja hem comentat, aquest podria ser el cas de carcinomes invasius o cèl·lules que han patit la transició epitel·li-mesènquima (Lacher et al., 2006).

La inserció de les seqüències peptídiques escollides a l'HI loop de l'Ad5 no ha suposat, en experiments *in vivo* (apartat 2.3 de Resultats, pàgina 114), ni una millora de la infecció del tumor i dels nòduls limfàtics ni una disminució de la infecció a fetge respecte a la de l'Ad5 sense modificar. Aquests resultats podrien fer pensar que aquestes seqüències no són bones candidates pel direccionament de vectors a les cèl·lules diana, però degut als resultats obtinguts en els experiments *in vitro*, creiem que no són bones candidates per dirigir la infecció del vector utilitzat. En aquest treball, hem realitzat la inserció de lligands específics per a les cèl·lules diana (*targeting*), però no l'eliminació del tropisme natural de l'adenovirus (*detargeting*). Estratègies similars a la nostra han aconseguit un augment de la infecció *in vivo* de tumors amb baixa expressió de CAR (Bauerschmitz et al., 2004; Dehari et al., 2003; Wu et al., 2002), però no de tumors amb elevada expressió de CAR (Rein et al., 2004), potser aquest és el nostre cas, i mai una disminució de la infecció a fetge. A més a més, no hem observat un augment estadísticament significatiu de la infecció en cap dels teixits analitzats respecte a la de l'Ad5 sense modificar, a diferència dels resultats obtinguts amb un adenovirus amb la seqüència RGD a l'HI loop: un augment de la infecció de tots els teixits analitzats, entre ells el fetge (Reynolds, Dmitriev, and Curiel, 1999). Els nostres resultats es podrien explicar per una baixa expressió dels receptors de les seqüències peptídiques seleccionades en els diferents òrgans analitzats i, per tant, podrien permetre un direccionament d'un vector adequat més específic i no tan expandit.

Els resultats més sorprenents d'aquest treball són que justament sigui la seqüència CTPQNTTMC, que va ser escollida com a seqüència no rellevant, la que en ser inserida a la fibra de l'Ad5 demostrí un major augment d'infectivitat respecte l'Ad5 sense modificar i que la seqüència CYPSRSPLC, que semblava una gran candidata per ser específica per a les PC3MM2, no demostrí cap millora de la infectivitat respecte l'Ad5 sense modificar. Aquests resultats són similars als obtinguts per la seqüència QM10 -seleccionada per *Phage Display* sobre les cèl·lules CF-KM4- que en ser insertada a la càpside de l'Ad5 (tot i que en aquest cas va ser al *shaft* de fibra i no a l'HI loop) no va demostrar cap tipus d'especificitat ni

millora de la infecció (Gaden et al., 2004) i es podrien explicar per possibles canvis conformacionals de la seqüència peptídica en ser introduïda a l'HI loop (Ghosh and Barry, 2005; Mizuguchi and Hayakawa, 2004), potser deguts al fet que les seqüències en la llibreria de fags es troben lligades tan sols en el seu extrem C-terminal i, en canvi, en ser inserides a l'HI loop es troben lligades tant en el seu extrem C-terminal com en el seu extrem N-terminal (Mizuguchi and Hayakawa, 2004). Justament, un dels principals inconvenients de la selecció per *Phage Display* de seqüències peptídiques específiques per al direccionament de vectors, és la pèrdua de funcionalitat de la seqüència en ser introduïda en un context diferent al del fag (Jang, Lim, and Schaffer, 2007; Miura et al., 2007), que ha portat a la construcció de llibreries de *Phage Display* en què la llibreria peptídica es troba expressada en el context de l'HI loop de la fibra de l'Ad5 (Ghosh and Barry, 2005; Pereboev, Pereboeva, and Curiel, 2001) i recentment a la construcció de la primera llibreria de pèptids expressada directament a la fibra de l'Ad5 (*adenodisplay*) (Miura et al., 2007) -tal i com s'havia fet anteriorment amb retrovirus (Bupp and Roth, 2002) i virus adeno-associats (Waterkamp et al., 2006)-. En aquesta llibreria d'*adenodisplay*, els pèptids es troben ja en el context del vector, evitant així els problemes de canvi de context ja comentats, alhora que s'assegura que les seqüències seleccionades permetran la internalització de l'adenovirus (Miura et al., 2007).

Tot i no haver obtingut un augment significatiu de la infectivitat del tumor i nòduls limfàtics en els experiments *in vivo* emprant els adenovirus recombinants, basant-nos en els resultats obtinguts *in vitro*, creiem que les seqüències obtingudes en aquest treball representen una contribució en la teràpia (convencional i gènica) contra el càncer de pròstata en poder ser emprades pel direccionament terapèutic i en aquest cas de vectors terapèutics a les cèl·lules tumorals de càncer de pròstata. A la literatura, la major part de treballs de direccionament de vectors a les cèl·lules tumorals de càncer de pròstata es basen en el direccionament transcripcional d'aquests vectors (Figueiredo et al., 2006; Kraaij et al., 2007; Lee et al., 2004; Zeng et al., 2007). En alguns casos, però, s'ha descrit la pèrdua de l'especificitat del promotor resultant en l'expressió del transgen a cèl·lules i teixits normals (Majhen and Ambriovic-Ristov, 2006; Rots et al., 2003). Pel que fa al direccionament transduccional de vectors terapèutics pel càncer de pròstata, són pocs els treballs que utilitzen seqüències peptídiques (Stevenson et al., 2007) i, com ja hem comentat, la major part usen molècules adaptadores o anticossos específics contra proteïnes de membrana (Ikegami et al., 2005; Ikegami et al., 2006; Kraaij et al., 2005). L'ús d'aquesta aproximació presenta desavantatges, com per exemple, que els complexos entre el vector i les molècules

adaptadores no són uniformes i, per tant, es poden produir variacions entre diferents preparacions del vector (Kanerva and Hemminki, 2004; Mizuguchi and Hayakawa, 2004) i que l'estabilitat dels complexos en humans no es coneix (Kanerva and Hemminki, 2004).

En base als resultats obtinguts en aquest treball, creiem que serà necessari analitzar la infectivitat *in vivo* dels adenovirus recombinats en un model animal de càncer de mama (emprant les cèl·lules MDA MB 435 Lung 2) i de càncer de pàncrees (emprant les cèl·lules NP9) per determinar si en sistemes *in vivo* les seqüències CTPQNTTMC i CPLHQRPCM permeten un augment de la infectivitat dels tumors. També seria interessant introduir aquestes seqüències (i també les altres seqüències seleccionades) en vectors adenovirals *detargetitzats*, com per exemple, vectors adenovirals que presentin mutacions que impedeixin el reconeixement dels receptors responsables del tropisme natural de l'Ad5 (CAR, integrines i heparan sulfats) (Koizumi et al., 2006) i la interacció del *knob* de la fibra amb factors de coagulació sanguinis, que s'ha demostrat que està involucrada en la infecció de l'Ad5 a fetge (Shayakhmetov et al., 2004), o en vectors modificats amb polímers (com el PHPMA) que presenten una major persistència en sang i una eliminació del tropisme natural de l'adenovirus (Stevenson et al., 2007) i per què no, en altres tipus de vectors tant virals com no virals. Seguint l'objectiu d'aquest treball, seria interessant utilitzar una llibreria d'*adenodisplay* amb adenovirus *detargetitzats* per a la identificació de seqüències específiques pel càncer de pròstata metastàtic, ja que les seqüències identificades amb aquesta llibreria permetrien la infecció de les cèl·lules diana de forma específica i la internalització del vector, obtenint una expressió gènica eficient i per tant amb una aplicació clínica (Miura et al., 2007).



# Conclusions



1. Del cribatge *in vitro* de la llibreria de *Phage Display* (Ph.D.-C7C) mitjançant 3 rondes de selecció positiva sobre les cèl·lules de càncer de pròstata PC3MM2 i una de negativa sobre les cèl·lules parentals PC3P:
  - 1.1. Hem identificat 90 seqüències peptídiques, 81 de les quals són diferents.
  - 1.2. Hem identificat dos motius peptídics majoritaris (PLXQRPM i XPPMFYD) i dues seqüències majoritàries no incloses en cap motiu peptídic (CAPLHRPMC i CDLPMHPMC). El motiu peptídic PLXQRPM és el més representatiu, incloent 5 seqüències peptídiques diferents i detectat en el 30% de les seqüències obtingudes en la quarta ronda de selecció sobre les cèl·lules PC3MM2 i en cap cas sobre les cèl·lules PC3P.
2. Les seqüències peptídiques (CTPQNTTMC, CAPLHRPMC, CYPERSPLC, CPLSQRPMC, CDLPMHPMC, CPLHQRPC i CFPPMFYDC) han estat seleccionades en base al reconeixement i unió dels fags a les cèl·lules PC3MM2:
  - 2.1. Tenen una major eficiència d'unió a les cèl·lules PC3MM2 que a les cèl·lules no tumorals utilitzades (entre 85 i 1,85 vegades), exceptuant la seqüència CPLSQRPMC que ha demostrat una eficiència d'unió similar a les cèl·lules MDCK i HUVEC respecte la de les cèl·lules PC3MM2.
  - 2.2. Les seqüències peptídiques escollides s'uneixen amb una major eficiència d'unió (entre 1,2 i 12 vegades) a les variants metastàtiques de càncer de pròstata que a les seves línies parentals.
  - 2.3. La seqüència CYPERSPLC és l'única seqüència peptídica que ha demostrat una major eficiència d'unió a les cèl·lules PC3MM2 que a la resta de línies i variants cel·lulars tumorals utilitzades, essent entre 3 i 11 vegades superior.
  - 2.4. Totes 7 seqüències peptídiques presenten *in silico* homologia amb proteïnes secretades o amb la regió extracel·lular de proteïnes de membrana.

3. Hem construït 3 vectors adenovirals recombinants amb les seqüències CTPQNTTMC (AdTLCTPQ), CYPSPRLC (AdTLCYPS) i CPLHQRPC (AdTLCPLH) inserides a l'HI loop de la fibra de l'Ad5:
  - 3.1. L'anàlisi de la infectivitat d'aquests virus sobre cèl·lules HEK293, PC3P i PC3MM2 *in vitro* no ha demostrat diferències significatives en la infecció dels adenovirus recombinants respecte la de l'adenovirus amb les fibres sense modificar.
  - 3.2. Els adenovirus AdTLCTPQ i AdTLCPLH poden infectar les cèl·lules de càncer de pròstata PC3MM2 utilitzant un receptor alternatiu a CAR, com hem demostrat amb anticossos funcionals contra aquest receptor.
  - 3.3. Els adenovirus recombinants AdTLCTPQ i AdTLCPLH també infecten les línies cel·lulars MDA MB 435 Lung2 de càncer de mama i NP9 de càncer de pàncrees emprant una via alternativa a CAR.
4. Els adenovirus recombinants AdTLCTPQ, AdTLCYPS i AdTLCPLH administrats per via endovenosa són capaços d'infectar tumors primaris i metàstasis de ratolins portadors de tumors de pròstata, tot i que no s'han observat canvis significatius en la biodistribució dels adenovirus recombinants respecte la de l'adenovirus amb les fibres sense modificar.



# Bibliografía



**A**

Aihara, M., Wheeler, T. M., Ohori, M., and Scardino, P. T. (1994). Heterogeneity of prostate cancer in radical prostatectomy specimens. *Urology* 43(1), 60-6; discussion 66-7.

Akalu, A., Liebermann, H., Bauer, U., Granzow, H., and Seidel, W. (1999). The subgenus-specific C-terminal region of protein IX is located on the surface of the adenovirus capsid. *J Virol* 73(7), 6182-7.

Al-Hajj, M., Wicha, M. S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S. J., and Clarke, M. F. (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(7), 3983-8.

Aleman, R., and Curiel, D. T. (2001). CAR-binding ablation does not change biodistribution and toxicity of adenoviral vectors. *Gene Ther* 8(17), 1347-53.

Arap, W., Pasqualini, R., and Ruoslahti, E. (1998). Cancer treatment by targeted drug delivery to tumor vasculature in a mouse model. *Science* 279(5349), 377-80.

Arya, M., Bott, S. R., Shergill, I. S., Ahmed, H. U., Williamson, M., and Patel, H. R. (2006). The metastatic cascade in prostate cancer. *Surg Oncol* 15(3), 117-28.

Asgari, K., Sesterhenn, I. A., McLeod, D. G., Cowan, K., Moul, J. W., Seth, P., and Srivastava, S. (1997). Inhibition of the growth of pre-established subcutaneous tumor nodules of human prostate cancer cells by single injection of the recombinant adenovirus p53 expression vector. *Int J Cancer* 71(3), 377-82.

**B**

Barnett, B. G., Crews, C. J., and Douglas, J. T. (2002). Targeted adenoviral vectors. *Biochim Biophys Acta* 1575(1-3), 1-14.

Bauerschmitz, G. J., Kanerva, A., Wang, M., Herrmann, I., Shaw, D. R., Strong, T. V., Desmond, R., Rein, D. T., Dall, P., Curiel, D. T., and Hemminki, A. (2004). Evaluation of a selectively oncolytic adenovirus for local and systemic treatment of cervical cancer. *Int J Cancer* 111(2), 303-9.

Bayo-Puxan, N., Cascallo, M., Gros, A., Huch, M., Fillat, C., and Aleman, R. (2006). Role of the putative heparan sulfate glycosaminoglycan-binding site of the adenovirus type 5 fiber shaft on liver detargeting and knob-mediated retargeting. *J Gen Virol* 87(Pt 9), 2487-95.

Belousova, N., Krendelchtchikova, V., Curiel, D. T., and Krasnykh, V. (2002). Modulation of adenovirus vector tropism via incorporation of polypeptide ligands into the fiber protein. *J Virol* 76(17), 8621-31.

Belldegrun, A., Tso, C. L., Zisman, A., Naitoh, J., Said, J., Pantuck, A. J., Hinkel, A., deKernion, J., and Figlin, R. (2001). Interleukin 2 gene therapy for prostate cancer: phase I clinical trial and basic biology. *Hum Gene Ther* 12(8), 883-92.

Bergelson, J. M., Cunningham, J. A., Droguett, G., Kurt-Jones, E. A., Krithivas, A., Hong, J. S., Horwitz, M. S., Crowell, R. L., and Finberg, R. W. (1997). Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* 275(5304), 1320-3.

Bergelson, J. M., Krithivas, A., Celi, L., Droguett, G., Horwitz, M. S., Wickham, T., Crowell, R. L., and Finberg, R. W. (1998). The murine CAR homolog is a receptor for coxsackie B viruses and adenoviruses. *J Virol* 72(1), 415-9.

Bett, A. J., Prevec, L., and Graham, F. L. (1993). Packaging capacity and stability of human adenovirus type 5 vectors. *J Virol* 67(10), 5911-21.

Bewley, M. C., Springer, K., Zhang, Y. B., Freimuth, P., and Flanagan, J. M. (1999). Structural analysis of the mechanism of adenovirus binding to its human cellular receptor, CAR. *Science* 286(5444), 1579-83.

Bockmann, M., Drosten, M., and Putzer, B. M. (2005). Discovery of targeting peptides for selective therapy of medullary thyroid carcinoma. *J Gene Med* 7(2), 179-88.

Bockmann, M., Hilken, G., Schmidt, A., Cranston, A. N., Tannapfel, A., Drosten, M., Frilling, A., Ponder, B. A., and Putzer, B. M. (2005). Novel SRESPHP peptide mediates specific binding to primary medullary thyroid carcinoma after systemic injection. *Hum Gene Ther* 16(11), 1267-75.

Bok, R. A., and Small, E. J. (2002). Bloodborne biomolecular markers in prostate cancer development and progression. *Nat Rev Cancer* 2(12), 918-26.

Bonkhoff, H., Stein, U., and Remberger, K. (1993). Differential expression of alpha 6 and alpha 2 very late antigen integrins in the normal, hyperplastic, and neoplastic prostate: simultaneous demonstration of cell surface receptors and their extracellular ligands. *Hum Pathol* 24(3), 243-8.

Bonkhoff, H., Stein, U., and Remberger, K. (1994). Multidirectional differentiation in the normal, hyperplastic, and neoplastic human prostate: simultaneous demonstration of cell-specific epithelial markers. *Hum Pathol* 25(1), 42-6.

Bonkhoff, H., Stein, U., and Remberger, K. (1994). The proliferative function of basal cells in the normal and hyperplastic human prostate. *Prostate* 24(3), 114-8.

Bonkhoff, H., Stein, U., and Remberger, K. (1995). Endocrine-paracrine cell types in the prostate and prostatic adenocarcinoma are postmitotic cells. *Hum Pathol* 26(2), 167-70.

Bonnet, D., and Dick, J. E. (1997). Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 3(7), 730-7.

Boris-Lawrie, K., and Temin, H. M. (1994). The retroviral vector. Replication cycle and safety considerations for retrovirus-mediated gene therapy. *Ann N Y Acad Sci* 716, 59-70; discussion 71.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-54.

Brothman, A. R., Maxwell, T. M., Cui, J., Deubler, D. A., and Zhu, X. L. (1999). Chromosomal clues to the development of prostate tumors. *Prostate* 38(4), 303-12.

Bupp, K., and Roth, M. J. (2002). Altering retroviral tropism using a random-display envelope library. *Mol Ther* 5(3), 329-35.

## C

Campos, S. K., and Barry, M. A. (2006). Comparison of adenovirus fiber, protein IX, and hexon capsomeres as scaffolds for vector purification and cell targeting. *Virology* 349(2), 453-62.

Collins, A. T., Habib, F. K., Maitland, N. J., and Neal, D. E. (2001). Identification and isolation of human prostate epithelial stem cells based on alpha(2)beta(1)-integrin expression. *J Cell Sci* 114(Pt 21), 3865-72.

Collins, A. T., and Maitland, N. J. (2006). Prostate cancer stem cells. *Eur J Cancer* 42(9), 1213-8.

Cross, D., and Burmester, J. K. (2006). Gene therapy for cancer treatment: past, present and future. *Clin Med Res* 4(3), 218-27.

Croyle, M. A., Chirmule, N., Zhang, Y., and Wilson, J. M. (2001). "Stealth" adenoviruses blunt cell-mediated and humoral immune responses against the virus and allow for significant gene expression upon readministration in the lung. *J Virol* 75(10), 4792-801.

Croyle, M. A., Yu, Q. C., and Wilson, J. M. (2000). Development of a rapid method for the PEGylation of adenoviruses with enhanced transduction and improved stability under harsh storage conditions. *Hum Gene Ther* 11(12), 1713-22.

Curiel, D. T. (1999). Considerations and challenges for the achievement of targeted gene delivery. *Gene Ther* 6(9), 1497-8.

Christgen, M., and Lehmann, U. (2007). MDA-MB-435: The Questionable Use of a Melanoma Cell Line as a Model for Human Breast Cancer is Going On. *Cancer Biol Ther* 6(9).

Chung, L. W., Hsieh, C. L., Law, A., Sung, S. Y., Gardner, T. A., Egawa, M., Matsubara, S., and Zhau, H. E. (2003). New targets for therapy in prostate cancer: modulation of stromal-epithelial interactions. *Urology* 62(5 Suppl 1), 44-54.

**D**

Dehecchi, M. C., Tamanini, A., Bonizzato, A., and Cabrini, G. (2000). Heparan sulfate glycosaminoglycans are involved in adenovirus type 5 and 2-host cell interactions. *Virology* 268(2), 382-90.

Dehari, H., Ito, Y., Nakamura, T., Kobune, M., Sasaki, K., Yonekura, N., Kohama, G., and Hamada, H. (2003). Enhanced antitumor effect of RGD fiber-modified adenovirus for gene therapy of oral cancer. *Cancer Gene Ther* 10(1), 75-85.

DeWeese, T. L., van der Poel, H., Li, S., Mikhak, B., Drew, R., Goemann, M., Hamper, U., DeJong, R., Detorie, N., Rodriguez, R., Haulk, T., DeMarzo, A. M., Piantadosi, S., Yu, D. C., Chen, Y., Henderson, D. R., Carducci, M. A., Nelson, W. G., and Simons, J. W. (2001). A phase I trial of CV706, a replication-competent, PSA selective oncolytic adenovirus, for the treatment of locally recurrent prostate cancer following radiation therapy. *Cancer Res* 61(20), 7464-72.

Dmitriev, I., Kashentseva, E., Rogers, B. E., Krasnykh, V., and Curiel, D. T. (2000). Ectodomain of coxsackievirus and adenovirus receptor genetically fused to epidermal growth factor mediates adenovirus targeting to epidermal growth factor receptor-positive cells. *J Virol* 74(15), 6875-84.

Dmitriev, I., Krasnykh, V., Miller, C. R., Wang, M., Kashentseva, E., Mikheeva, G., Belousova, N., and Curiel, D. T. (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.

Dmitriev, I. P., Kashentseva, E. A., and Curiel, D. T. (2002). Engineering of adenovirus vectors containing heterologous peptide sequences in the C terminus of capsid protein IX. *J Virol* 76(14), 6893-9.

Douglas, J. T., Rogers, B. E., Rosenfeld, M. E., Michael, S. I., Feng, M., and Curiel, D. T. (1996). Targeted gene delivery by tropism-modified adenoviral vectors. *Nat Biotechnol* 14(11), 1574-8.

**E**

Edelstein, M. L., Abedi, M. R., Wixon, J., and Edelstein, R. M. (2004). Gene therapy clinical trials worldwide 1989-2004-an overview. *J Gene Med* 6(6), 597-602.

Eder, J. P., Kantoff, P. W., Roper, K., Xu, G. X., Bublely, G. J., Boyden, J., Gritz, L., Mazzara, G., Oh, W. K., Arlen, P., Tsang, K. Y., Panicali, D., Schlom, J., and Kufe, D. W. (2000). A phase I trial of a recombinant vaccinia virus expressing prostate-specific antigen in advanced prostate cancer. *Clin Cancer Res* 6(5), 1632-8.

Einfeld, D. A., Brough, D. E., Roelvink, P. W., Kovesdi, I., and Wickham, T. J. (1999). Construction of a pseudoreceptor that mediates transduction by adenoviruses expressing a ligand in fiber or penton base. *J Virol* 73(11), 9130-6.

Einfeld, D. A., Schroeder, R., Roelvink, P. W., Lizonova, A., King, C. R., Kovesdi, I., and Wickham, T. J. (2001). Reducing the native tropism of adenovirus vectors requires removal of both CAR and integrin interactions. *J Virol* 75(23), 11284-91.

El-Aneed, A. (2004). An overview of current delivery systems in cancer gene therapy. *J Control Release* 94(1), 1-14.

Ellerby, H. M., Arap, W., Ellerby, L. M., Kain, R., Andrusiak, R., Rio, G. D., Krajewski, S., Lombardo, C. R., Rao, R., Ruoslahti, E., Bredesen, D. E., and Pasqualini, R. (1999). Anti-cancer activity of targeted pro-apoptotic peptides. *Nat Med* 5(9), 1032-8.

Essler, M., and Ruoslahti, E. (2002). Molecular specialization of breast vasculature: a breast-homing phage-displayed peptide binds to aminopeptidase P in breast vasculature. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(4), 2252-7.

Eto, Y., Gao, J. Q., Sekiguchi, F., Kurachi, S., Katayama, K., Maeda, M., Kawasaki, K., Mizuguchi, H., Hayakawa, T., Tsutsumi, Y., Mayumi, T., and Nakagawa, S. (2005). PEGylated adenovirus vectors containing RGD peptides on the tip of PEG show high transduction efficiency and antibody evasion ability. *J Gene Med* 7(5), 604-12.

**F**

- Farnsworth, W. E. (1999). Prostate stroma: physiology. *Prostate* 38(1), 60-72.
- Feldman, B. J., and Feldman, D. (2001). The development of androgen-independent prostate cancer. *Nat Rev Cancer* 1(1), 34-45.
- Figueiredo, M. L., Sato, M., Johnson, M., and Wu, L. (2006). Specific targeting of gene therapy to prostate cancer using a two-step transcriptional amplification system. *Future Oncol* 2(3), 391-406.
- Fisher, K. D., Stallwood, Y., Green, N. K., Ulbrich, K., Mautner, V., and Seymour, L. W. (2001). Polymer-coated adenovirus permits efficient retargeting and evades neutralising antibodies. *Gene Ther* 8(5), 341-8.
- Foley, R., Lawler, M., and Hollywood, D. (2004). Gene-based therapy in prostate cancer. *Lancet Oncol* 5(8), 469-79.
- Freytag, S. O., Khil, M., Stricker, H., Peabody, J., Menon, M., DePeralta-Venturina, M., Nafziger, D., Pegg, J., Paielli, D., Brown, S., Barton, K., Lu, M., Aguilar-Cordova, E., and Kim, J. H. (2002). Phase I study of replication-competent adenovirus-mediated double suicide gene therapy for the treatment of locally recurrent prostate cancer. *Cancer Res* 62(17), 4968-76.
- Freytag, S. O., Stricker, H., Movsas, B., and Kim, J. H. (2007). Prostate cancer gene therapy clinical trials. *Mol Ther* 15(6), 1042-52.
- Freytag, S. O., Stricker, H., Pegg, J., Paielli, D., Pradhan, D. G., Peabody, J., DePeralta-Venturina, M., Xia, X., Brown, S., Lu, M., and Kim, J. H. (2003). Phase I study of replication-competent adenovirus-mediated double-suicide gene therapy in combination with conventional-dose three-dimensional conformal radiation therapy for the treatment of newly diagnosed, intermediate- to high-risk prostate cancer. *Cancer Res* 63(21), 7497-506.
- Foster, D. Bostwick. W.B. (1998). The identification and pathologic significance of neuroendocrine differentiation in human prostatic carcinoma. Pathology of the Prostate. Vol. 34, Major Problems in Pathology, Chapter 20:352-63. C. Saunders Publishers, 1998.
- Furcinitti, P. S., van Oostrum, J., and Burnett, R. M. (1989). Adenovirus polypeptide IX revealed as capsid cement by difference images from electron microscopy and crystallography. *Embo J* 8(12), 3563-70.
- G**
- Gaden, F., Franqueville, L., Magnusson, M. K., Hong, S. S., Merten, M. D., Lindholm, L., and Boulanger, P. (2004). Gene transduction and cell entry pathway of fiber-modified adenovirus type 5 vectors carrying novel endocytic peptide ligands selected on human tracheal glandular cells. *J Virol* 78(13), 7227-47.
- Ghosh, D., and Barry, M. A. (2005). Selection of muscle-binding peptides from context-specific peptide-presenting phage libraries for adenoviral vector targeting. *J Virol* 79(21), 13667-72.
- Giordano, R. J., Cardo-Vila, M., Lahdenranta, J., Pasqualini, R., and Arap, W. (2001). Biopanning and rapid analysis of selective interactive ligands. *Nat Med* 7(11), 1249-53.
- Gleason, D. F. (1966). Classification of prostatic carcinomas. *Cancer Chemother Rep* 50(3), 125-8.
- Goldman, C. K., Rogers, B. E., Douglas, J. T., Sosnowski, B. A., Ying, W., Siegal, G. P., Baird, A., Campaign, J. A., and Curiel, D. T. (1997). Targeted gene delivery to Kaposi's sarcoma cells via the fibroblast growth factor receptor. *Cancer Res* 57(8), 1447-51.
- Graham, F. L., and Prevec, L. (1995). Methods for construction of adenovirus vectors. *Mol Biotechnol* 3(3), 207-20.
- Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C., and Nairn, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36(1), 59-74.
- Green, N. M., Wrigley, N. G., Russell, W. C., Martin, S. R., and McLachlan, A. D. (1983). Evidence for a repeating cross-beta sheet structure in the adenovirus fibre. *Embo J* 2(8), 1357-65.

Grompe, M., Jones, S. N., Loulseged, H., and Caskey, C. T. (1992). Retroviral-mediated gene transfer of human ornithine transcarbamylase into primary hepatocytes of spf and spf-ash mice. *Hum Gene Ther* 3(1), 35-44.

Gulley, J., Chen, A. P., Dahut, W., Arlen, P. M., Bastian, A., Steinberg, S. M., Tsang, K., Panicali, D., Poole, D., Schlom, J., and Michael Hamilton, J. (2002). Phase I study of a vaccine using recombinant vaccinia virus expressing PSA (rV-PSA) in patients with metastatic androgen-independent prostate cancer. *Prostate* 53(2), 109-17.

## H

Herman, J. R., Adler, H. L., Aguilar-Cordova, E., Rojas-Martinez, A., Woo, S., Timme, T. L., Wheeler, T. M., Thompson, T. C., and Scardino, P. T. (1999). In situ gene therapy for adenocarcinoma of the prostate: a phase I clinical trial. *Hum Gene Ther* 10(7), 1239-49.

Honda, T., Kagawa, S., Spurgers, K. B., Gjertsen, B. T., Roth, J. A., Fang, B., Lowe, S. L., Norris, J. S., Meyn, R. E., and McDonnell, T. J. (2002). A recombinant adenovirus expressing wild-type Bax induces apoptosis in prostate cancer cells independently of their Bcl-2 status and androgen sensitivity. *Cancer Biol Ther* 1(2), 163-7.

Hong, J. S., and Engler, J. A. (1996). Domains required for assembly of adenovirus type 2 fiber trimers. *J Virol* 70(10), 7071-8.

Hong, S. S., Karayan, L., Tournier, J., Curiel, D. T., and Boulanger, P. A. (1997). Adenovirus type 5 fiber knob binds to MHC class I alpha2 domain at the surface of human epithelial and B lymphoblastoid cells. *Embo J* 16(9), 2294-306.

Huang, S., Kamata, T., Takada, Y., Ruggeri, Z. M., and Nemerow, G. R. (1996). Adenovirus interaction with distinct integrins mediates separate events in cell entry and gene delivery to hematopoietic cells. *J Virol* 70(7), 4502-8.

## I

Ikegami, S., Tadakuma, T., Yamakami, K., Ono, T., Suzuki, S., Yoshimura, I., Asano, T., and Hayakawa, M. (2005). Selective gene therapy for prostate cancer cells using liposomes conjugated with IgM type monoclonal antibody against prostate-specific membrane antigen. *Hum Cell* 18(1), 17-23.

Ikegami, S., Yamakami, K., Ono, T., Sato, M., Suzuki, S., Yoshimura, I., Asano, T., Hayakawa, M., and Tadakuma, T. (2006). Targeting gene therapy for prostate cancer cells by liposomes complexed with anti-prostate-specific membrane antigen monoclonal antibody. *Hum Gene Ther* 17(10), 997-1005.

Itoh, A., Okada, T., Mizuguchi, H., Hayakawa, T., Mizukami, H., Kume, A., Takatoku, M., Komatsu, N., Hanazono, Y., and Ozawa, K. (2003). A soluble CAR-SCF fusion protein improves adenoviral vector-mediated gene transfer to c-Kit-positive hematopoietic cells. *J Gene Med* 5(11), 929-40.

Iyer, M., Wu, L., Carey, M., Wang, Y., Smallwood, A., and Gambhir, S. S. (2001). Two-step transcriptional amplification as a method for imaging reporter gene expression using weak promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(25), 14595-600.

## J

Jager, S., Jahnke, A., Wilmes, T., Adebahr, S., Vogtle, F. N., Delima-Hahn, E., Pfeifer, D., Berg, T., Lubbert, M., and Trepel, M. (2007). Leukemia targeting ligands isolated from phage display peptide libraries. *Leukemia* 21(3), 411-20.

Janes, K. A., Fresneau, M. P., Marazuela, A., Fabra, A., and Alonso, M. J. (2001). Chitosan nanoparticles as delivery systems for doxorubicin. *J Control Release* 73(2-3), 255-67.

Jang, J. H., Lim, K. I., and Schaffer, D. V. (2007). Library selection and directed evolution approaches to engineering targeted viral vectors. *Biotechnol Bioeng* 98(3), 515-24.

Jewett, H. J. (1975). The present status of radical prostatectomy for stages A and B prostatic cancer. *Urol Clin North Am* 2(1), 105-24.

Jolly, D. (1994). Viral vector systems for gene therapy. *Cancer Gene Ther* 1(1), 51-64.

Jost, P. J., Harbottle, R. P., Knight, A., Miller, A. D., Coutelle, C., and Schneider, H. (2001). A novel peptide, THALWHT, for the targeting of human airway epithelia. *FEBS Lett* 489(2-3), 263-9.

Joung, I., Harber, G., Gerecke, K. M., Carroll, S. L., Collawn, J. F., and Engler, J. A. (2005). Improved gene delivery into neuroglial cells using a fiber-modified adenovirus vector. *Biochem Biophys Res Commun* 328(4), 1182-7.

## K

Kanerva, A., and Hemminki, A. (2004). Modified adenoviruses for cancer gene therapy. *Int J Cancer* 110(4), 475-80.

Kanerva, A., Wang, M., Bauerschmitz, G. J., Lam, J. T., Desmond, R. A., Bhoola, S. M., Barnes, M. N., Alvarez, R. D., Siegal, G. P., Curiel, D. T., and Hemminki, A. (2002). Gene transfer to ovarian cancer versus normal tissues with fiber-modified adenoviruses. *Mol Ther* 5(6), 695-704.

Kasono, K., Blackwell, J. L., Douglas, J. T., Dmitriev, I., Strong, T. V., Reynolds, P., Kropf, D. A., Carroll, W. R., Peters, G. E., Bucy, R. P., Curiel, D. T., and Krasnykh, V. (1999). Selective gene delivery to head and neck cancer cells via an integrin targeted adenoviral vector. *Clin Cancer Res* 5(9), 2571-9.

Kim, J. J., Trivedi, N. N., Wilson, D. M., Mahalingam, S., Morrison, L., Tsai, A., Chattergoon, M. A., Dang, K., Patel, M., Ahn, L., Boyer, J. D., Chalian, A. A., Schoemaker, H., Kieber-Emmons, T., Agadjanyan, M. A., and Weiner, D. B. (1998). Molecular and immunological analysis of genetic prostate specific antigen (PSA) vaccine. *Oncogene* 17(24), 3125-35.

Kim, Y., Lillo, A. M., Steiniger, S. C., Liu, Y., Ballatore, C., Anichini, A., Mortarini, R., Kaufmann, G. F., Zhou, B., Felding-Habermann, B., and Janda, K. D. (2006). Targeting heat shock proteins on cancer cells: selection, characterization, and cell-penetrating properties of a peptidic GRP78 ligand. *Biochemistry* 45(31), 9434-44.

Kirby, I., Davison, E., Beavil, A. J., Soh, C. P., Wickham, T. J., Roelvink, P. W., Kovesdi, I., Sutton, B. J., and Santis, G. (1999). Mutations in the DG loop of adenovirus type 5 fiber knob protein abolish high-affinity binding to its cellular receptor CAR. *J Virol* 73(11), 9508-14.

Koizumi, N., Kawabata, K., Sakurai, F., Watanabe, Y., Hayakawa, T., and Mizuguchi, H. (2006). Modified adenoviral vectors ablated for coxsackievirus-adenovirus receptor, alphav integrin, and heparan sulfate binding reduce in vivo tissue transduction and toxicity. *Hum Gene Ther* 17(3), 264-79.

Koizumi, N., Mizuguchi, H., Sakurai, F., Yamaguchi, T., Watanabe, Y., and Hayakawa, T. (2003). Reduction of natural adenovirus tropism to mouse liver by fiber-shaft exchange in combination with both CAR- and alphav integrin-binding ablation. *J Virol* 77(24), 13062-72.

Kolonin, M. G., Sun, J., Do, K. A., Vidal, C. I., Ji, Y., Baggerly, K. A., Pasqualini, R., and Arap, W. (2006). Synchronous selection of homing peptides for multiple tissues by in vivo phage display. *Faseb J* 20(7), 979-81.

Kovesdi, I., Brough, D. E., Bruder, J. T., and Wickham, T. J. (1997). Adenoviral vectors for gene transfer. *Curr Opin Biotechnol* 8(5), 583-9.

Kraaij, R., van der Weel, L., de Ridder, C. M., van der Korput, H. A., Zweistra, J. L., van Rijswijk, A. L., Bangma, C. H., and Trapman, J. (2007). A small chimeric promoter for high prostate-specific transgene expression from adenoviral vectors. *Prostate* 67(8), 829-39.

Kraaij, R., van Rijswijk, A. L., Oomen, M. H., Haisma, H. J., and Bangma, C. H. (2005). Prostate specific membrane antigen (PSMA) is a tissue-specific target for adenoviral transduction of prostate cancer in vitro. *Prostate* 62(3), 253-9.

Krasnykh, V., Dmitriev, I., Mikheeva, G., Miller, C. R., Belousova, N., and Curiel, D. T. (1998). Characterization of an adenovirus vector containing a heterologous peptide epitope in the HI loop of the fiber knob. *J Virol* 72(3), 1844-52.



Krasnykh, V., Dmitriev, I., Navarro, J. G., Belousova, N., Kashentseva, E., Xiang, J., Douglas, J. T., and Curiel, D. T. (2000). Advanced generation adenoviral vectors possess augmented gene transfer efficiency based upon coxsackie adenovirus receptor-independent cellular entry capacity. *Cancer Res* 60(24), 6784-7.

Krasnykh, V. N., Mikheeva, G. V., Douglas, J. T., and Curiel, D. T. (1996). Generation of recombinant adenovirus vectors with modified fibers for altering viral tropism. *J Virol* 70(10), 6839-46.

Kubo, H., Gardner, T. A., Wada, Y., Koeneman, K. S., Gotoh, A., Yang, L., Kao, C., Lim, S. D., Amin, M. B., Yang, H., Black, M. E., Matsubara, S., Nakagawa, M., Gillenwater, J. Y., Zhau, H. E., and Chung, L. W. (2003). Phase I dose escalation clinical trial of adenovirus vector carrying osteocalcin promoter-driven herpes simplex virus thymidine kinase in localized and metastatic hormone-refractory prostate cancer. *Hum Gene Ther* 14(3), 227-41.

Kurachi, S., Koizumi, N., Sakurai, F., Kawabata, K., Sakurai, H., Nakagawa, S., Hayakawa, T., and Mizuguchi, H. (2007). Characterization of capsid-modified adenovirus vectors containing heterologous peptides in the fiber knob, protein IX, or hexon. *Gene Ther* 14(3), 266-74.

Kyprianou, N., and Isaacs, J. T. (1988). Activation of programmed cell death in the rat ventral prostate after castration. *Endocrinology* 122(2), 552-62.

## L

Lacher, M. D., Tiirikainen, M. I., Saunier, E. F., Christian, C., Anders, M., Oft, M., Balmain, A., Akhurst, R. J., and Korn, W. M. (2006). Transforming growth factor-beta receptor inhibition enhances adenoviral infectability of carcinoma cells via up-regulation of Coxsackie and Adenovirus Receptor in conjunction with reversal of epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Res* 66(3), 1648-57.

Lanciotti, J., Song, A., Doukas, J., Sosnowski, B., Pierce, G., Gregory, R., Wadsworth, S., and O'Riordan, C. (2003). Targeting adenoviral vectors using heterofunctional polyethylene glycol FGF2 conjugates. *Mol Ther* 8(1), 99-107.

Le, L. P., Everts, M., Dmitriev, I. P., Davydova, J. G., Yamamoto, M., and Curiel, D. T. (2004). Fluorescently labeled adenovirus with pIX-EGFP for vector detection. *Mol Imaging* 3(2), 105-16.

Lee, C., Shevrin, D. H., and Kozlowski, J. M. (1993). In vivo and in vitro approaches to study metastasis in human prostatic cancer. *Cancer Metastasis Rev* 12(1), 21-8.

Lee, S. J., Zhang, Y., Lee, S. D., Jung, C., Li, X., Kim, H. S., Bae, K. H., Jeng, M. H., Kao, C., and Gardner, T. (2004). Targeting prostate cancer with conditionally replicative adenovirus using PSMA enhancer. *Mol Ther* 10(6), 1051-8.

Leissner, P., Legrand, V., Schlesinger, Y., Hadji, D. A., van Raaij, M., Cusack, S., Pavirani, A., and Mehtali, M. (2001). Influence of adenoviral fiber mutations on viral encapsidation, infectivity and in vivo tropism. *Gene Ther* 8(1), 49-57.

Li, X., Marani, M., Yu, J., Nan, B., Roth, J. A., Kagawa, S., Fang, B., Denner, L., and Marcelli, M. (2001). Adenovirus-mediated Bax overexpression for the induction of therapeutic apoptosis in prostate cancer. *Cancer Res* 61(1), 186-91.

Li, Z., Zhao, R., Wu, X., Sun, Y., Yao, M., Li, J., Xu, Y., and Gu, J. (2005). Identification and characterization of a novel peptide ligand of epidermal growth factor receptor for targeted delivery of therapeutics. *Faseb J* 19(14), 1978-85.

Lochmuller, H., Jani, A., Huard, J., Prescott, S., Simoneau, M., Massie, B., Karpati, G., and Acsadi, G. (1994). Emergence of early region 1-containing replication-competent adenovirus in stocks of replication-defective adenovirus recombinants (delta E1 + delta E3) during multiple passages in 293 cells. *Hum Gene Ther* 5(12), 1485-91.

Lopez-Barcons, L. A., Polo, D., Llorens, A., Reig, F., and Fabra, A. (2005). Targeted adriamycin delivery to MXT-B2 metastatic mammary carcinoma cells by transferrin liposomes: effect of adriamycin ADR-to-lipid ratio. *Oncol Rep* 14(5), 1337-43.

Lopez-Barcons, L. A., Polo, D., Reig, F., and Fabra, A. (2004). Pentapeptide YIGSR-mediated HT-1080 fibrosarcoma cells targeting of adriamycin encapsulated in sterically stabilized liposomes. *J Biomed Mater Res A* 69(1), 155-63.

Lowe, S. L., Rubinchik, S., Honda, T., McDonnell, T. J., Dong, J. Y., and Norris, J. S. (2001). Prostate-specific expression of Bax delivered by an adenoviral vector induces apoptosis in LNCaP prostate cancer cells. *Gene Ther* 8(18), 1363-71.

## M

Mabjeesh, N. J., Zhong, H., and Simons, J. W. (2002). Gene therapy of prostate cancer: current and future directions. *Endocr Relat Cancer* 9(2), 115-39.

MacRae, E. J., Giannoudis, A., Ryan, R., Brown, N. J., Hamdy, F. C., Maitland, N., and Lewis, C. E. (2006). Gene therapy for prostate cancer: current strategies and new cell-based approaches. *Prostate* 66(5), 470-94.

Mahanivong, C., Kruger, J. A., Bian, D., Reisfeld, R. A., and Huang, S. (2006). A simplified cloning strategy for the generation of an endothelial cell selective recombinant adenovirus vector. *J Virol Methods* 135(1), 127-35.

Maizel, J. V., Jr., White, D. O., and Scharff, M. D. (1968). The polypeptides of adenovirus. I. Evidence for multiple protein components in the virion and a comparison of types 2, 7A, and 12. *Virology* 36(1), 115-25.

Majhen, D., and Ambriovic-Ristov, A. (2006). Adenoviral vectors--how to use them in cancer gene therapy? *Virus Res* 119(2), 121-33.

Mandava, S., Makowski, L., Devarapalli, S., Uzubell, J., and Rodi, D. J. (2004). RELIC--a bioinformatics server for combinatorial peptide analysis and identification of protein-ligand interaction sites. *Proteomics* 4(5), 1439-60.

Martin, K., Brie, A., Saulnier, P., Perricaudet, M., Yeh, P., and Vigne, E. (2003). Simultaneous CAR- and alpha V integrin-binding ablation fails to reduce Ad5 liver tropism. *Mol Ther* 8(3), 485-94.

Mathis, J. M., Stoff-Khalili, M. A., and Curiel, D. T. (2005). Oncolytic adenoviruses - selective retargeting to tumor cells. *Oncogene* 24(52), 7775-91.

Mazhar, D., and Waxman, J. (2004). Gene therapy for prostate cancer. *BJU Int* 93(4), 465-9.

McConnell, M. J., and Imperiale, M. J. (2004). Biology of adenovirus and its use as a vector for gene therapy. *Hum Gene Ther* 15(11), 1022-33.

McNeal, J. E. (1968). Regional morphology and pathology of the prostate. *Am J Clin Pathol* 49(3), 347-57.

McNeal, J. E. (1969). Origin and development of carcinoma in the prostate. *Cancer* 23(1), 24-34.

McNeal, J. E. (1978). Origin and evolution of benign prostatic enlargement. *Invest Urol* 15(4), 340-5.

Meier, O., and Greber, U. F. (2004). Adenovirus endocytosis. *J Gene Med* 6 Suppl 1, S152-63.

Meulenbroek, R. A., Sargent, K. L., Lunde, J., Jasmin, B. J., and Parks, R. J. (2004). Use of adenovirus protein IX (pIX) to display large polypeptides on the virion--generation of fluorescent virus through the incorporation of pIX-GFP. *Mol Ther* 9(4), 617-24.

Michon, I. N., Hauer, A. D., von der Thusen, J. H., Molenaar, T. J., van Berkel, T. J., Biessen, E. A., and Kuiper, J. (2002). Targeting of peptides to restenotic vascular smooth muscle cells using phage display in vitro and in vivo. *Biochim Biophys Acta* 1591(1-3), 87-97.

Mikata, K., Uemura, H., Ohuchi, H., Ohta, S., Nagashima, Y., and Kubota, Y. (2002). Inhibition of growth of human prostate cancer xenograft by transfection of p53 gene: gene transfer by electroporation. *Mol Cancer Ther* 1(4), 247-52.

Miller, C. R., Buchsbaum, D. J., Reynolds, P. N., Douglas, J. T., Gillespie, G. Y., Mayo, M. S., Raben, D., and Curiel, D. T. (1998). Differential susceptibility of primary and established human glioma cells

to adenovirus infection: targeting via the epidermal growth factor receptor achieves fiber receptor-independent gene transfer. *Cancer Res* 58(24), 5738-48.

Miura, Y., Yoshida, K., Nishimoto, T., Hatanaka, K., Ohnami, S., Asaka, M., Douglas, J. T., Curiel, D. T., Yoshida, T., and Aoki, K. (2007). Direct selection of targeted adenovirus vectors by random peptide display on the fiber knob. *Gene Ther*.

Miyazaki, M., Nagy, A., Schally, A. V., Lamharzi, N., Halmos, G., Szepeshazi, K., Groot, K., and Armatis, P. (1997). Growth inhibition of human ovarian cancers by cytotoxic analogues of luteinizing hormone-releasing hormone. *J Natl Cancer Inst* 89(23), 1803-9.

Mizuguchi, H., and Hayakawa, T. (2004). Targeted adenovirus vectors. *Hum Gene Ther* 15(11), 1034-44.

Mizuguchi, H., Koizumi, N., Hosono, T., Ishii-Watabe, A., Uchida, E., Utoguchi, N., Watanabe, Y., and Hayakawa, T. (2002). CAR- or alphav integrin-binding ablated adenovirus vectors, but not fiber-modified vectors containing RGD peptide, do not change the systemic gene transfer properties in mice. *Gene Ther* 9(12), 769-76.

Mizuguchi, H., Koizumi, N., Hosono, T., Utoguchi, N., Watanabe, Y., Kay, M. A., and Hayakawa, T. (2001). A simplified system for constructing recombinant adenoviral vectors containing heterologous peptides in the HI loop of their fiber knob. *Gene Ther* 8(9), 730-5.

Moffatt, S., Wiehle, S., and Cristiano, R. J. (2005). Tumor-specific gene delivery mediated by a novel peptide-polyethylenimine-DNA polyplex targeting aminopeptidase N/CD13. *Hum Gene Ther* 16(1), 57-67.

Muzyczka, N. (1992). Use of adeno-associated virus as a general transduction vector for mammalian cells. *Curr Top Microbiol Immunol* 158, 97-129.

## N

Nasu, Y., Ebara, S., and Kumon, H. (2004). [Adenovirus-mediated interleukin-12 gene therapy for prostate cancer]. *Nippon Rinsho* 62(6), 1181-91.

Nicklin, S. A., Dishart, K. L., Buening, H., Reynolds, P. N., Hallek, M., Nemerow, G. R., Von Seggern, D. J., and Baker, A. H. (2003). Transductional and transcriptional targeting of cancer cells using genetically engineered viral vectors. *Cancer Lett* 201(2), 165-73.

Nicklin, S. A., Von Seggern, D. J., Work, L. M., Pek, D. C., Dominiczak, A. F., Nemerow, G. R., and Baker, A. H. (2001). Ablating adenovirus type 5 fiber-CAR binding and HI loop insertion of the SIGYPLP peptide generate an endothelial cell-selective adenovirus. *Mol Ther* 4(6), 534-42.

Nicklin, S. A., White, S. J., Nicol, C. G., Von Seggern, D. J., and Baker, A. H. (2004). In vitro and in vivo characterisation of endothelial cell selective adenoviral vectors. *J Gene Med* 6(3), 300-8.

Nicklin, S. A., White, S. J., Watkins, S. J., Hawkins, R. E., and Baker, A. H. (2000). Selective targeting of gene transfer to vascular endothelial cells by use of peptides isolated by phage display. *Circulation* 102(2), 231-7.

Nikitin, A. Y., Matoso, A., and Roy-Burman, P. (2007). Prostate stem cells and cancer. *Histol Histopathol* 22(9), 1043-9.

Noureddini, S. C., and Curiel, D. T. (2005). Genetic targeting strategies for adenovirus. *Mol Pharm* 2(5), 341-7.

## O

O'Riordan, C. R., Lachapelle, A., Delgado, C., Parkes, V., Wadsworth, S. C., Smith, A. E., and Francis, G. E. (1999). PEGylation of adenovirus with retention of infectivity and protection from neutralizing antibody in vitro and in vivo. *Hum Gene Ther* 10(8), 1349-58.

Ogawara, K., Rots, M. G., Kok, R. J., Moorlag, H. E., Van Loenen, A. M., Meijer, D. K., Haisma, H. J., and Molema, G. (2004). A novel strategy to modify adenovirus tropism and enhance transgene delivery to activated vascular endothelial cells in vitro and in vivo. *Hum Gene Ther* 15(5), 433-43.

Oh, K. S., Engler, J. A., and Joung, I. (2005). Enhancement of gene delivery to cancer cells by a retargeted adenovirus. *J Microbiol* 43(2), 179-82.

Oyama, T., Sykes, K. F., Samli, K. N., Minna, J. D., Johnston, S. A., and Brown, K. C. (2003). Isolation of lung tumor specific peptides from a random peptide library: generation of diagnostic and cell-targeting reagents. *Cancer Lett* 202(2), 219-30.

## P

Page, R. D. (1996). TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput Appl Biosci* 12(4), 357-8.

Papatsoris, A. G., and Papavassiliou, A. G. (2001). Prostate cancer: horizons in the development of novel anti-cancer strategies. *Curr Med Chem Anticancer Agents* 1(1), 47-70.

Pasqualini, R., Koivunen, E., Kain, R., Lahdenranta, J., Sakamoto, M., Stryhn, A., Ashmun, R. A., Shapiro, L. H., Arap, W., and Ruoslahti, E. (2000). Aminopeptidase N is a receptor for tumor-homing peptides and a target for inhibiting angiogenesis. *Cancer Res* 60(3), 722-7.

Pasqualini, R., and Ruoslahti, E. (1996). Organ targeting in vivo using phage display peptide libraries. *Nature* 380(6572), 364-6.

Pechar, M., Ulbrich, K., Etrych, T., Fabra, A., Stevenson, M., and Seymour, L. (2005). Oligopeptides as targeting structures in cancer therapy. *J Control Release* 101(1-3), 376-9.

Pereboev, A., Pereboeva, L., and Curiel, D. T. (2001). Phage display of adenovirus type 5 fiber knob as a tool for specific ligand selection and validation. *J Virol* 75(15), 7107-13.

Pettaway, C. A., Pathak, S., Greene, G., Ramirez, E., Wilson, M. R., Killion, J. J., and Fidler, I. J. (1996). Selection of highly metastatic variants of different human prostatic carcinomas using orthotopic implantation in nude mice. *Clin Cancer Res* 2(9), 1627-36.

Pisters, L. L., Pettaway, C. A., Troncoso, P., McDonnell, T. J., Stephens, L. C., Wood, C. G., Do, K. A., Brisbay, S. M., Wang, X., Hossan, E. A., Evans, R. B., Soto, C., Jacobson, M. G., Parker, K., Merritt, J. A., Steiner, M. S., and Logothetis, C. J. (2004). Evidence that transfer of functional p53 protein results in increased apoptosis in prostate cancer. *Clin Cancer Res* 10(8), 2587-93.

Price, J. E., Polyzos, A., Zhang, R. D., and Daniels, L. M. (1990). Tumorigenicity and metastasis of human breast carcinoma cell lines in nude mice. *Cancer Res* 50(3), 717-21.

## R

Rae, J. M., Creighton, C. J., Meck, J. M., Haddad, B. R., and Johnson, M. D. (2007). MDA-MB-435 cells are derived from M14 melanoma cells--a loss for breast cancer, but a boon for melanoma research. *Breast Cancer Res Treat* 104(1), 13-9.

Rasmussen, U. B., Schreiber, V., Schultz, H., Mischler, F., and Schughart, K. (2002). Tumor cell-targeting by phage-displayed peptides. *Cancer Gene Ther* 9(7), 606-12.

Rein, D. T., Breidenbach, M., Wu, H., Han, T., Haviv, Y. S., Wang, M., Kirby, T. O., Kawakami, Y., Dall, P., Alvarez, R. D., and Curiel, D. T. (2004). Gene transfer to cervical cancer with fiber-modified adenoviruses. *Int J Cancer* 111(5), 698-704.

Reyes, G., Villanueva, A., Garcia, C., Sancho, F. J., Piulats, J., Lluís, F., and Capella, G. (1996). Orthotopic xenografts of human pancreatic carcinomas acquire genetic aberrations during dissemination in nude mice. *Cancer Res* 56(24), 5713-9.

Reynolds, P., Dmitriev, I., and Curiel, D. (1999). Insertion of an RGD motif into the HI loop of adenovirus fiber protein alters the distribution of transgene expression of the systemically administered vector. *Gene Ther* 6(7), 1336-9.

Rittner, K., Schreiber, V., Erbs, P., and Lusky, M. (2007). Targeting of adenovirus vectors carrying a tumor cell-specific peptide: in vitro and in vivo studies. *Cancer Gene Ther*.

Robinson, P., Stuber, D., Deryckere, F., Tedbury, P., Lagrange, M., and Orfanoudakis, G. (2005). Identification using phage display of peptides promoting targeting and internalization into HPV-transformed cell lines. *J Mol Recognit* 18(2), 175-82.

- Robinson, S. A., and Rosenzweig, S. A. (2006). Paradoxical effects of the phage display-derived peptide antagonist IGF-F1-1 on insulin-like growth factor-1 receptor signaling. *Biochem Pharmacol* 72(1), 53-61.
- Roehlitz, C. F. (2001). Gene therapy of cancer. *Swiss Med Wkly* 131(1-2), 4-9.
- Roelvink, P. W., Kovesdi, I., and Wickham, T. J. (1996). Comparative analysis of adenovirus fiber-cell interaction: adenovirus type 2 (Ad2) and Ad9 utilize the same cellular fiber receptor but use different binding strategies for attachment. *J Virol* 70(11), 7614-21.
- Roelvink, P. W., Mi Lee, G., Einfeld, D. A., Kovesdi, I., and Wickham, T. J. (1999). Identification of a conserved receptor-binding site on the fiber proteins of CAR-recognizing adenoviridae. *Science* 286(5444), 1568-71.
- Romanczuk, H., Galer, C. E., Zabner, J., Barsomian, G., Wadsworth, S. C., and O'Riordan, C. R. (1999). Modification of an adenoviral vector with biologically selected peptides: a novel strategy for gene delivery to cells of choice. *Hum Gene Ther* 10(16), 2615-26.
- Romanov, V. I., Durand, D. B., and Petrenko, V. A. (2001). Phage display selection of peptides that affect prostate carcinoma cells attachment and invasion. *Prostate* 47(4), 239-51.
- Rots, M. G., Curiel, D. T., Gerritsen, W. R., and Haisma, H. J. (2003). Targeted cancer gene therapy: the flexibility of adenoviral gene therapy vectors. *J Control Release* 87(1-3), 159-65.
- Rowe, W. P., Huebner, R. J., Gilmore, L. K., Parrott, R. H., and Ward, T. G. (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. (2000). Targeting tumor vasculature with homing peptides from phage display. *Semin Cancer Biol* 10(6), 435-42.
- Russell, W. C. (2000). Update on adenovirus and its vectors. *J Gen Virol* 81(Pt 11), 2573-604.
- Rux, J. J., and Burnett, R. M. (2004). Adenovirus structure. *Hum Gene Ther* 15(12), 1167-76.
- S**
- Sanda, M. G., Smith, D. C., Charles, L. G., Hwang, C., Pienta, K. J., Schlom, J., Milenic, D., Panicali, D., and Montie, J. E. (1999). Recombinant vaccinia-PSA (PROSTVAC) can induce a prostate-specific immune response in androgen-modulated human prostate cancer. *Urology* 53(2), 260-6.
- Sar, M., Lubahn, D. B., French, F. S., and Wilson, E. M. (1990). Immunohistochemical localization of the androgen receptor in rat and human tissues. *Endocrinology* 127(6), 3180-6.
- Satoh, T., Teh, B. S., Timme, T. L., Mai, W. Y., Gdor, Y., Kusaka, N., Fujita, T., Pramudji, C. K., Vlachaki, M. T., Ayala, G., Wheeler, T., Amato, R., Miles, B. J., Kadmon, D., Butler, E. B., and Thompson, T. C. (2004). Enhanced systemic T-cell activation after in situ gene therapy with radiotherapy in prostate cancer patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 59(2), 562-71.
- Shalev, M., Miles, B. J., Thompson, T. C., Ayala, G., Butler, E. B., Aguilar-Cordova, E., and Kadmon, D. (2000). Suicide gene therapy for prostate cancer using a replication-deficient adenovirus containing the herpesvirus thymidine kinase gene. *World J Urol* 18(2), 125-9.
- Shayakhmetov, D. M., Li, Z. Y., Ni, S., and Lieber, A. (2004). Analysis of adenovirus sequestration in the liver, transduction of hepatic cells, and innate toxicity after injection of fiber-modified vectors. *J Virol* 78(10), 5368-81.
- Shayakhmetov, D. M., and Lieber, A. (2000). Dependence of adenovirus infectivity on length of the fiber shaft domain. *J Virol* 74(22), 10274-86.
- Shimizu, A., Maruta, F., Akita, N., Miwa, S., Seymour, L. W., Kerr, D. J., Parker, A. L., and Miyagawa, S. (2007). Identification of an Oligopeptide Binding to Hepatocellular Carcinoma. *Oncology* 71(1-2), 136-145.
- Simons, J. W., Mikhak, B., Chang, J. F., DeMarzo, A. M., Carducci, M. A., Lim, M., Weber, C. E., Baccala, A. A., Goemann, M. A., Clift, S. M., Ando, D. G., Levitsky, H. I., Cohen, L. K., Sanda, M. G., Mulligan, R. C., Partin, A. W., Carter, H. B., Piantadosi, S., Marshall, F. F., and Nelson, W. G. (1999).

Induction of immunity to prostate cancer antigens: results of a clinical trial of vaccination with irradiated autologous prostate tumor cells engineered to secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor using ex vivo gene transfer. *Cancer Res* 59(20), 5160-8.

Singh, S. K., Hawkins, C., Clarke, I. D., Squire, J. A., Bayani, J., Hide, T., Henkelman, R. M., Cusimano, M. D., and Dirks, P. B. (2004). Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 432(7015), 396-401.

Smith, G. P., and Petrenko, V. A. (1997). Phage Display. *Chem Rev* 97(2), 391-410.

Smith, T. A., Idamakanti, N., Marshall-Neff, J., Rollence, M. L., Wright, P., Kaloss, M., King, L., Mech, C., Dinges, L., Iverson, W. O., Sherer, A. D., Markovits, J. E., Lyons, R. M., Kaleko, M., and Stevenson, S. C. (2003). Receptor interactions involved in adenoviral-mediated gene delivery after systemic administration in non-human primates. *Hum Gene Ther* 14(17), 1595-604.

Smith, T. A., Idamakanti, N., Rollence, M. L., Marshall-Neff, J., Kim, J., Mulgrew, K., Nemerow, G. R., Kaleko, M., and Stevenson, S. C. (2003). Adenovirus serotype 5 fiber shaft influences in vivo gene transfer in mice. *Hum Gene Ther* 14(8), 777-87.

Smothers, J. F., Henikoff, S., and Carter, P. (2002). Tech.Sight. Phage display. Affinity selection from biological libraries. *Science* 298(5593), 621-2.

Stanizzi, M. A., and Hall, S. J. (2007). Clinical experience with gene therapy for the treatment of prostate cancer. *Rev Urol* 9 Suppl 1, S20-8.

Steiner, M. S., Gingrich, J. R., and Chauhan, R. D. (2002). Prostate cancer gene therapy. *Surg Oncol Clin N Am* 11(3), 607-20.

Stevenson, M., Hale, A. B., Hale, S. J., Green, N. K., Black, G., Fisher, K. D., Ulbrich, K., Fabra, A., and Seymour, L. W. (2007). Incorporation of a laminin-derived peptide (SIKVAV) on polymer-modified adenovirus permits tumor-specific targeting via alpha6-integrins. *Cancer Gene Ther* 14(4), 335-45.

Stewart, P. L., Burnett, R. M., Cyrklaff, M., and Fuller, S. D. (1991). Image reconstruction reveals the complex molecular organization of adenovirus. *Cell* 67(1), 145-54.

Stouten, P. F., Sander, C., Ruigrok, R. W., and Cusack, S. (1992). New triple-helical model for the shaft of the adenovirus fibre. *J Mol Biol* 226(4), 1073-84.

## T

Teh, B. S., Aguilar-Cordova, E., Kernen, K., Chou, C. C., Shalev, M., Vlachaki, M. T., Miles, B., Kadmon, D., Mai, W. Y., Caillouet, J., Davis, M., Ayala, G., Wheeler, T., Brady, J., Carpenter, L. S., Lu, H. H., Chiu, J. K., Woo, S. Y., Thompson, T., and Butler, E. B. (2001). Phase I/II trial evaluating combined radiotherapy and in situ gene therapy with or without hormonal therapy in the treatment of prostate cancer--a preliminary report. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 51(3), 605-13.

Tillman, B. W., de Gruijl, T. D., Luykx-de Bakker, S. A., Scheper, R. J., Pinedo, H. M., Curiel, T. J., Gerritsen, W. R., and Curiel, D. T. (1999). Maturation of dendritic cells accompanies high-efficiency gene transfer by a CD40-targeted adenoviral vector. *J Immunol* 162(11), 6378-83.

Tolcher, A. W. (2001). Preliminary phase I results of G3139 (bcl-2 antisense oligonucleotide) therapy in combination with docetaxel in hormone-refractory prostate cancer. *Semin Oncol* 28(4 Suppl 15), 67-70.

Trudel, S., Trachtenberg, J., Toi, A., Sweet, J., Li, Z. H., Jewett, M., Tshilias, J., Zhuang, L. H., Hitt, M., Wan, Y., Gauldie, J., Graham, F. L., Dancey, J., and Stewart, A. K. (2003). A phase I trial of adenovector-mediated delivery of interleukin-2 (AdIL-2) in high-risk localized prostate cancer. *Cancer Gene Ther* 10(10), 755-63.

## V

van Leenders, G. J., Aalders, T. W., Hulsbergen-van de Kaa, C. A., Ruiter, D. J., and Schalken, J. A. (2001). Expression of basal cell keratins in human prostate cancer metastases and cell lines. *J Pathol* 195(5), 563-70.

- van Leenders, G. J., and Schalken, J. A. (2001). Stem cell differentiation within the human prostate epithelium: implications for prostate carcinogenesis. *BJU Int* 88 Suppl 2, 35-42; discussion 49-50.
- Vellinga, J., Rabelink, M. J., Cramer, S. J., van den Wollenberg, D. J., Van der Meulen, H., Leppard, K. N., Fallaux, F. J., and Hoeben, R. C. (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., Mahfouz, I., Dedieu, J. F., Brie, A., Perricaudet, M., and Yeh, P. (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.
- Vile, R. G., Russell, S. J., and Lemoine, N. R. (2000). Cancer gene therapy: hard lessons and new courses. *Gene Ther* 7(1), 2-8.
- Visakorpi, T., Hyytinen, E., Koivisto, P., Tanner, M., Keinänen, R., Palmberg, C., Palotie, A., Tammela, T., Isola, J., and Kallioniemi, O. P. (1995). In vivo amplification of the androgen receptor gene and progression of human prostate cancer. *Nat Genet* 9(4), 401-6.
- Vogelstein, B., Fearon, E. R., Hamilton, S. R., Kern, S. E., Preisinger, A. C., Leppert, M., Nakamura, Y., White, R., Smits, A. M., and Bos, J. L. (1988). Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 319(9), 525-32.
- Von Seggern, D. J., Kehler, J., Endo, R. I., and Nemerow, G. R. (1998). Complementation of a fibre mutant adenovirus by packaging cell lines stably expressing the adenovirus type 5 fibre protein. *J Gen Virol* 79 (Pt 6), 1461-8.
- Vorburger, S. A., and Hunt, K. K. (2002). Adenoviral gene therapy. *Oncologist* 7(1), 46-59.

## W

- Wagner, E., Kircheis, R., and Walker, G. F. (2004). Targeted nucleic acid delivery into tumors: new avenues for cancer therapy. *Biomed Pharmacother* 58(3), 152-61.
- Wang, D., Miller, S., Sima, M., Kopeckova, P., and Kopecek, J. (2003). Synthesis and evaluation of water-soluble polymeric bone-targeted drug delivery systems. *Bioconjug Chem* 14(5), 853-9.
- Wang, J., Murakami, T., Hakamata, Y., Ajiki, T., Jinbu, Y., Akasaka, Y., Ohtsuki, M., Nakagawa, H., and Kobayashi, E. (2001). Gene gun-mediated oral mucosal transfer of interleukin 12 cDNA coupled with an irradiated melanoma vaccine in a hamster model: successful treatment of oral melanoma and distant skin lesion. *Cancer Gene Ther* 8(10), 705-12.
- Waterkamp, D. A., Muller, O. J., Ying, Y., Trepel, M., and Kleinschmidt, J. A. (2006). Isolation of targeted AAV2 vectors from novel virus display libraries. *J Gene Med* 8(11), 1307-19.
- White, S. J., Simmonds, R. E., Lane, D. A., and Baker, A. H. (2005). Efficient isolation of peptide ligands for the endothelial cell protein C receptor (EPCR) using candidate receptor phage display biopanning. *Peptides* 26(7), 1264-9.
- Wickham, T. J. (2000). Targeting adenovirus. *Gene Ther* 7(2), 110-4.
- Wickham, T. J. (2003). Ligand-directed targeting of genes to the site of disease. *Nat Med* 9(1), 135-9.
- Wickham, T. J., Mathias, P., Cheresch, D. A., and Nemerow, G. R. (1993). Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 promote adenovirus internalization but not virus attachment. *Cell* 73(2), 309-19.
- Wickham, T. J., Tzeng, E., Shears, L. L., 2nd, Roelvink, P. W., Li, Y., Lee, G. M., Brough, D. E., Lizonova, A., and Kovessi, I. (1997). Increased in vitro and in vivo gene transfer by adenovirus vectors containing chimeric fiber proteins. *J Virol* 71(11), 8221-9.
- Willats, W. G. (2002). Phage display: practicalities and prospects. *Plant Mol Biol* 50(6), 837-54.
- Wu, E., Pache, L., Von Seggern, D. J., Mullen, T. M., Mikyas, Y., Stewart, P. L., and Nemerow, G. R. (2003). Flexibility of the adenovirus fiber is required for efficient receptor interaction. *J Virol* 77(13), 7225-35.

Wu, H., Seki, T., Dmitriev, I., Uil, T., Kashentseva, E., Han, T., and Curiel, D. T. (2002). Double modification of adenovirus fiber with RGD and polylysine motifs improves coxsackievirus-adenovirus receptor-independent gene transfer efficiency. *Hum Gene Ther* 13(13), 1647-53.

**X**

Xia, D., Henry, L. J., Gerard, R. D., and Deisenhofer, J. (1994). Crystal structure of the receptor-binding domain of adenovirus type 5 fiber protein at 1.7 Å resolution. *Structure* 2(12), 1259-70.

Xia, H., Anderson, B., Mao, Q., and Davidson, B. L. (2000). Recombinant human adenovirus: targeting to the human transferrin receptor improves gene transfer to brain microcapillary endothelium. *J Virol* 74(23), 11359-66.

**Y**

Young, L. S., Searle, P. F., Onion, D., and Mautner, V. (2006). Viral gene therapy strategies: from basic science to clinical application. *J Pathol* 208(2), 299-318.

**Z**

Zeng, H., Wei, Q., Huang, R., Chen, N., Dong, Q., Yang, Y., and Zhou, Q. (2007). Recombinant adenovirus mediated prostate specific enzyme pro-drug gene therapy regulated by prostate specific membrane antigen PSMAEP enhancer/promoter. *J Androl*.

Zhang, J., Spring, H., and Schwab, M. (2001). Neuroblastoma tumor cell-binding peptides identified through random peptide phage display. *Cancer Lett* 171(2), 153-64.

Zhang, Y., and Bergelson, J. M. (2005). Adenovirus receptors. *J Virol* 79(19), 12125-31.

Zhang, Y., Chen, J., Zhang, Y., Hu, Z., Hu, D., Pan, Y., Ou, S., Liu, G., Yin, X., Zhao, J., Ren, L., and Wang, J. (2007). Panning and Identification of a Colon Tumor Binding Peptide from a Phage Display Peptide Library. *J Biomol Screen*.

Zhang, Y., Yu, J., Unni, E., Shao, T. C., Nan, B., Snabboon, T., Kasper, S., Andriani, F., Denner, L., and Marcelli, M. (2002). Monogene and polygene therapy for the treatment of experimental prostate cancers by use of apoptotic genes bax and bad driven by the prostate-specific promoter ARR(2)PB. *Hum Gene Ther* 13(17), 2051-64.



Índex de taules  
i figures



**ÍNDEX DE TAULES****Introducció**

Taula I.1.- Càlcul dels casos nous anuals dels principals tipus de càncer a Catalunya en homes (1998-2005).....	5
Taula I.2.- Classificació dels estadis clínics dels carcinomes prostàtics segons el TNM (Tumour, Nodules, Metastasis).....	7
Taula I.3.- Probabilitat de càncer de pròstata associada als nivells de PSA detectats en sèrum. ....	8
Taula I.4.- Tractaments convencionals del càncer de pròstata segons l'estadi clínic .....	12
Taula I.5.- Característiques, avantatges i desavantatges dels vectors virals. ....	20
Taula I.6.- Promotors amb ús potencial per teràpia gènica del càncer de pròstata. ....	40

**Materials i Mètodes**

Taula M.1.- Oligonucleòtids emprats per a la introducció de les seqüències CTPQNTTMC, CYPSSRPLC, CPLHQRPMC i CFPPMFYDC a l'HI loop de la fibra de l'Ad5 mitjançant mutagènesi dirigida del gen de la fibra.....	54
Taula M.2.- Enzims de restricció emprats per a la comprovació del genoma viral dels adenovirus recombinants. ....	60
Taula M.3.- Seqüència dels oligonucleòtids emprats per a la comprovació per seqüenciació automàtica dels DNAs generats en aquest treball.....	70

**Resultats**

Taula R.1.- Relació de seqüències peptídiques obtingudes de les quatre rondes sobre les PC3MM2.....	83
Taula R.2.- Relació de seqüències peptídiques obtingudes de la quarta ronda sobre les PC3P.....	85
Taula R.3.- Homologia de les seqüències TPQNTTM, APLHRPM, YPSRSPL, PLSQRPM, DLPMHPM, PLHQRPM i FPPMFYD amb proteïnes humanes cel·lulars. ....	93
Taula R.4.- Anàlisi per citometria de fluxe dels nivells d'expressió del receptor CAR i d'integrines $\alpha_v$ a les línies cel·lulars PC3P, PC3MM2, MDA MB 435 Lung 2 i NP9.....	108

**Discussió**

Taula D.1.- Nombre de fags recuperats en cadascuna de les rondes de biopanning sobre les cèl·lules PC3MM2. ....	124
Taula D.2.- Relació de les 21 seqüències peptídiques diferents identificades en la quarta ronda de biopanning sobre les cèl·lules PC3MM2. ....	125
Taula D.3.- Relació de la freqüència d'aparició de les seqüències SIGYPLP, HEWSYLAPYPWF i HTFEPGV en el cribratge in vitro de llibreries de Phage Display sobre cèl·lules endotelials, cèl·lules WiDr i MTC. ....	126
Taula D.4.- Relació de les eficiències d'unió dels fags analitzats a les cèl·lules PC3MM2 ..	127

## ÍNDEX DE FIGURES

### **Introducció**

Figura I.1.- Anatomia del sistema urinari i reproductor masculí mostrant la pròstata, els testicles, la bufeta entre altres òrgans. ....	3
Figura I.2.- Tall sagital de la pròstata. ....	3
Figura I.3.- Esquema dels components cel·lulars de la glàndula prostàtica. ....	4
Figura I.4.- Esquema dels diferents graus de diferenciació d'un carcinoma prostàtic. ....	6
Figura I.5.- Representació dels estadis clínics del carcinoma prostàtic.....	8
Figura I.6.- Representació d'un model teòric de progressió tumoral de càncer de pròstata. ....	9
Figura I.7.- Representació d'un possible mecanisme de carcinogènesi de pròstata associat a la deficiència de p53 i Rb.....	10
Figura I.8.- Representació dels teixits i òrgans afectats per les metàstasis d'origen prostàtic. ....	11
Figura I.9.- Estructura de l'adenovirus. ....	24
Figura I.10.- Proteïnes estructurals de l'adenovirus. ....	24
Figura I.11.- Estructura de la fibra de l'adenovirus i del seu domini Knob.....	26
Figura I.12.- Transcripció del genoma de l'adenovirus. ....	27
Figura I.13.- Cicle infectiu de l'adenovirus. ....	27
Figura I.14.- Estratègies pel direccionament transduccional de vectors adenovirals.....	32
Figura I.15.- Estratègies de modificació genètica de les proteïnes de la càpside de l'adenovirus.....	35

### **Materials i Mètodes**

Figura M.1.- Representació esquemàtica d'un fag de la llibreria Ph.D.-C7C.....	49
Figura M.2.- Representació esquemàtica d'una ronda de <i>biopanning</i> . ....	50
Figura M.3.- Esquema de la incorporació de les seqüències a l'HI loop.....	53
Figura M.4.- Representació esquemàtica de la incorporació de les seqüències peptídiques a l'HI loop de la fibra de l'Ad5 mitjançant mutagènesi dirigida del gen de la fibra. ....	53
Figura M.5.- Representació esquemàtica de la recombinació homòloga per a l'obtenció del genoma de l'Ad5 amb les seqüències incorporades a l'HI loop de l gen de la fibra. ....	56

### **Resultats**

Figura R.1.- Representació esquemàtica del cribratge de la llibreria de <i>Phage Display</i> Ph.D.-C7C. ....	79
Figura R.2.- Fotografia típica d'una placa de LB agar de titulació.....	80
Figura R.3.- Representació del nombre de fags de la llibreria Ph.D.-C7C recuperats en cadascuna de les rondes de <i>biopanning</i> sobre les cèl·lules PC3MM2. ....	81

Figura R.4.- Representació del nombre de fags recuperats en la quarta ronda de biopanning sobre les cèl·lules PC3MM2 i PC3P. ....	82
Figura R.5.- Distribució de les freqüències de les seqüències peptídiques majoritàries seleccionades a través del cribratge de la llibreria de <i>Phage display</i> Ph.D.-C7C sobre la variant metastàtica PC3MM2. ....	86
Figura R.6.- Alineament per Clustal W 1.83 de les seqüències potencialment específiques pel reconeixement de les cèl·lules PC3MM2. ....	87
Figura R.7.- Diagrama de relació de les seqüències peptídiques potencialment específiques per la unió/reconeixement de les cèl·lules PC3MM2.....	88
Figura R.8.- Representació de les eficiències d'unió dels fags seleccionats a les línies i variants de càncer de pròstata. ....	98
Figura R.9.- Representació de la comparació de les eficiències d'unió dels fags seleccionats obtingudes sobre les cèl·lules PC3MM2 respecte les obtingudes sobre les cèl·lules PC3P. ..	99
Figura R.10.- Representació de les eficiències d'unió dels fags seleccionats a les línies no tumorals.....	100
Figura R.11.- Representació de la comparació de les eficiències d'unió dels fags seleccionats obtingudes sobre les cèl·lules PC3MM2 respecte les obtingudes sobre les cèl·lules no tumorals.....	101
Figura R.12.- Representació de les eficiències d'unió dels fags seleccionats a les línies tumorals d'origen no prostàtic. ....	101
Figura R.13.- Representació de la comparació de les eficiències d'unió dels fags seleccionats obtingudes sobre les cèl·lules PC3MM2 respecte les obtingudes sobre altres línies cel·lulars metastàtiques.....	102
Figura R.14.- Esquema del procediment seguit per a la incorporació de les nostres seqüències peptídiques a l'HI loop de la fibra de l'Ad5.....	104
Figura R.15.- Imatge de les cèl·lules HEK293 transfectades amb el genoma viral complet de l'AdTLCTPQ (a) i de l'AdTLCFPP (b). ....	105
Figura R.16.- Imatge de l'electroforesi de les proteïnes majoritàries de l'adenovirus.....	106
Figura R.17.- Representació de la infectivitat de l'AdTL a les cèl·lules HEK293, PC3P, PC3MM2, MDA MB 435 Lung 2 i NP9.....	109
Figura R.18.- Representació de l'anàlisi de la infectivitat dels adenovirus AdTL, AdTLCTPQ, AdTLCYPS i AdTLCPLH a les cèl·lules epitelials HEK293. ....	109
Figura R.19.- Representació de l'anàlisi de la infectivitat dels adenovirus AdTL, AdTLCTPQ, AdTLCYPS i AdTLCPLH a la línia humana de càncer de pròstata PC3P (a)) i a la seva variant metastàtica PC3MM2 (b)). ....	110
Figura R.20.- Representació de l'anàlisi de la infectivitat dels adenovirus AdTL, AdTLCTPQ, AdTLCYPS i AdTLCPLH a les cèl·lules de càncer de mama MDA MB 435 Lung 2. ....	111
Figura R.21.- Representació de l'anàlisi de la infectivitat dels adenovirus AdTL, AdTLCTPQ, AdTLCYPS i AdTLCPLH a les cèl·lules de càncer de pàncrees NP9.....	112
Figura R.22.- Representació de l'anàlisi de la infectivitat dels adenovirus AdTL, AdTLCTPQ, AdTLCYPS i AdTLCPLH en cèl·lules PC3MM2 prèviament tractades amb l'anti-CAR RmcB. ....	114
Figura R.23.- Representació de la biodistribució <i>in vivo</i> dels adenovirus AdTL, AdTLCTPQ, AdTLCYPS i AdTLCPLH en un model animal de càncer de pròstata. ....	115

Figura R.24.- Representació de les ràtios tumor/fetge i ganglis/fetge dels adenovirus recombinants. ....	116
Figura R.25.- Representació de l'acumulació del genoma dels adenovirus AdTL, AdTLCTPQ, AdTLCYPS i AdTLCPLH a fetge i tumor. ....	117