



Universitat Autònoma
de Barcelona

CENTRO DE BIOTECNOLOGÍA ANIMAL Y TERAPIA GÉNICA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

Caracterización del sistema *attB/attP- Φ C31* para la producción de adenovirus *gutless*

TESIS DOCTORAL

RAÚL ALBA FERNÁNDEZ

Bellaterra, 2007

Memoria presentada por el licenciado
RAÚL ALBA FERNÁNDEZ para optar
al grado de Doctor en Bioquímica y
Biología Molecular.

Esta tesis doctoral ha sido realizada
bajo la dirección del Dr. Miguel Chillón
Rodríguez en el Centro de
Biotecnología Animal y Terapia Génica
(CBATEG) de la Universidad Autónoma
de Barcelona.

RAÚL ALBA FERNÁNDEZ

MIGUEL CHILLÓN RODRÍGUEZ

JUNIO de 2007
BELLATERRA

A mis familiares y amigos. Por apoyarme incondicionalmente, por darme fuerzas y ayudar a perseguir mis sueños.

ABREVIATURAS

°C	Grados Celsius
Ψ	Señal de empaquetamiento del Adenovirus
A	Adenina
AAV	Virus Adeno-asociado
Ab	Anticuerpo
Ad	Adenovirus
Ad5	Genoma adenoviral de serotipo 5
ADNc	ADN copia
ARN	Ácido desoxiribonucleico
APC	Célula Presentadora de Antígeno
C	Citosina
CAR	Receptor de Adenovirus y virus Coxsackie B
cm	Centímetro
CAV-2	Adenovirus canino de serotipo 2
CMV	Citomegalovirus
CsCl	Cloruro de Cesio
CTL	Linfocitos T Citotóxicos
DMD	Distrofia Muscular de Duchenne
DTT	1,4-Dithiothreitol
E1-E4	Genes Tempranos del Adenovirus
EMSA	<i>Electroforetic Mobility Shift Assay</i>
FBS	Suero Fetal Bovino
G	Guanina
GFP	Proteína Verde Fluorescente
HEK	Riñón Embrionario Humano
HIV	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
ITR	Repeticiones Terminales Invertidas
IU	Unidades de Infección
Kpb	Kilopares de base
MCS	Sitio de Clonación Múltiple
MHC-I	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
Mix	Mezcla
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MMLV	Retrovirus murinos de Moloney
MTA	Acuerdo de Transferencia de Material
MOI	Multiplicidad de Infección
min	Minuto/s
NaCl	Cloruro de Sodio
ng	Nanogramo/s
pb	Pares de base
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PEG	Polietilenglicol
PEI	Polietilenimina
pm	Picomol/es
polyA	Secuencia de Poli-Adenilación

Abreviaturas

PP	Partículas Físicas
RCA	Adenovirus competente de replicación
RFP	Proteína Roja Fluorescente
rpm	Revoluciones por minuto
RSV	Virus del Sarcoma de Rous
(SCID)-X1	Inmunodeficiencia Severa Combinada para X1
SV40	Virus de Simio 40
SNC	Sistema Nervioso Central
T	Timina
U	Unidades
UV	Ultravioleta
μl	Microlitro
μg	Microgramo

AGRADECIMIENTOS

A lo largo de esta tesis he tenido la suerte de conocer y trabajar con muchas personas que han querido que este trabajo sea algo muy especial para mí y pueda cumplir el sueño de ser Doctor. Además, muchas de ellas me han enseñado que la ciencia no es camino fácil, más bien lo contrario, pero la pasión conjunta me ha unido a ellos para seguir adelante. Por esta razón y por todo lo que me han aportado, me gustaría agradecerles todo lo que han hecho por mí.

En primer lugar y de manera especial con mucho cariño, me gustaría agradecer a Miguel Chillón, mi director de tesis, el café que tomó conmigo la primera vez que hablamos de la tesis y la oportunidad de ser su primer becario. Miguel ha sido para mí un gran director, un gran amigo y a veces, un padre que siempre ha deseado lo mejor para mí. Podría decir que él me ha enseñado a pensar, a ser crítico, a pisar en el suelo, ya que mi ilusión por este trabajo siempre me hizo volar. Debo agradecerle también, que en los momentos de incertidumbre siempre me apoyara y en la actualidad, me ha dado las alas para seguir amando este trabajo como si empezara ahora mismo la tesis. Por todo esto y mucho más, me gustaría darle las gracias.

Con mucho cariño, quisiera agradecer el afecto e ilusión que muchos de los profesores de la carrera de Biotecnología me dieron durante 4 años. En especial, quisiera agradecer la paciencia que tuvo conmigo el coordinador de la carrera, Josep Vendrell, sin su ayuda los biotecnólogos no habiéramos pensado nunca en hacer un doctorado sin las becas que, por aquel entonces, no teníamos.

Me gustaría agradecer la oportunidad que me dio Inmacula Ponte y Pere Suau para empezar a trabajar en su laboratorio. Ellos me enseñaron por primera vez lo interesante que puede llegar a ser la investigación y el esfuerzo que supone.

También quisiera agradecer a la Dra. Fátima Bosch la oportunidad que me dio para trabajar en su laboratorio durante 2 años y haber podido empezar mi tesis

Agradecimientos

cuando todavía no tenía una poyata. Además, también quisiera agradecer a todas las personas de su grupo los momentos que me han dedicado para enseñarme todas las técnicas de laboratorio. En especial recuerdo, quisiera agradecer los tres meses maravillosos que trabajé con Malcom Watford, una persona que vive y disfruta de la ciencia y que es un placer compartir con él la poyata y conversaciones sin fin.

Dentro del grupo de investigación me gustaría agradecer la paciencia y las enseñanzas de la Dra. Mercè Monfar y por su gran contribución y tiempo a la supervisión de todos los *abstracts* y publicaciones que se han enviado tanto a congresos como a revistas. También, quisiera agradecerle a la Dra. Assumpció Bosch todo el tiempo que me ha dedicado para innumerables dudas cuando Miguel no estaba.

Quisiera agradecer de corazón a todas las personas que han compartido conmigo la poyata. Con mucho cariño quisiera recordar a Nuria, Toni, Dan, Nuria T., Gemma, Sergio y otros que dedicaron parte de su tiempo a ayudarme durante la tesis. Y como no a Adolfo, por su gran amistad. Sin él, esta tesis no hubiera sido igual, muchísimas gracias de corazón.

A Estel y Ester por su trabajo durante los primeros meses de la tesis y por los ratos buenos que hemos pasado juntos. A Lorena, por su dedicación durante las prácticas realizadas y a Judit, por su ayuda en el laboratorio. A Susana y José, por su ayuda en el p2 con las células. A Maria, por todas aquellas anécdotas y conversaciones que hemos tenido dentro del p2. También, me gustaría dar las gracias a Mercedes Segura, porque aunque no hayamos pasado mucho tiempo juntos, me ha dado su amistad y me ha demostrado lo excelente persona que es.

Durante mi estancia en Nueva York, tuve el honor de conocer a Patrick Hearing, persona formidable y gran jefe querido por todos. Gracias a él, he podido disfrutar muchísimo de la ciencia y he podido pasar tres meses maravillosos en una de las zonas más bonitas del mundo. Con especial cariño quisiera agradecer a Philomena Ostapchuk la oportunidad que me dio para vivir

en su casa, en Port Jefferson, y todo aquello que me enseñó. Además de las personas del grupo que tanto me aportaron y nunca olvidaré. Con cariño a Mary, Mark, Kasey, Amanda, Sharanya y Beverly, gracias por hacerme sentir realmente querido durante mi estancia en NY.

No puedo olvidarme de mis amigos los italianos, Michele y Matteo, ellos me han acogido como si fuera un hijo y un hermano para ellos en Ancona. Quisiera agradecer enormemente la estancia del día a día del laboratorio y por hacerme sentir tan cómodo dentro y fuera de él. También a Silvia, Paolo, Valentina, Paula y tantas otras personas que me mostraron su afecto durante mi estancia.

También he de agradecer toda la ayuda que he recibido del Dr. Eric Kremer y su grupo durante mi doctorado y mi estancia en Montpellier. Por su simpatía y grandes enseñanzas que me dio sobre el Ad canino. También, me gustaría dar las gracias a las chicas del BIACORE, Martin y Françoise, por todo su apoyo y dedicación durante aquella fantástica semana en Montpellier.

Me gustaría dar las gracias al grupo del Dr. Rubén Hernández que ha desarrollado toda la parte de las líneas celulares nuevas y a Stefan Kochanek y Florian Kreppel por su ayuda y conocimientos en la parte del *gutless*.

Como no, sin la ayuda de las personas que trabajan en la facultad de Veterinaria y del CBATEG esta tesis tampoco podría haberse realizado. Por ello, quiero recordar con cariño a todas las secretarias que me ayudaron, a los guardias de seguridad que me abrieron mil y una puertas durante los fines de semana, a los de mantenimiento y a las señoras de la limpieza por dejar el laboratorio limpio cada día.

Me gustaría dar las gracias al apoyo incondicional de mis grandes amigos, Santi y David, excelentes personas que siempre han estado ahí para darme las fuerzas y el ánimo que la tesis necesita. Vosotros sabéis que nuestra amistad durará para siempre.

Agradecimientos

Para finalizar, me gustaría agradecer a mi familia todo el apoyo moral que me han dado. A Gil, gran tío y amigo que ha dedicado muchas horas de su tiempo para nunca tuviera un problema. A mis abuelos, Genoveva, Primitivo y Basilia, por su cariño y apoyo durante toda su vida. A Mercè, por aportarme la salsa de la vida y apoyarme en todo lo que hago. A mi hermana Nuria, por su cariño y apoyo durante todos estos años. A mi padre Juan, porque siempre ha dado todo lo que tenía para que hoy pueda realizar esta tesis. Y finalmente a mi madre Lucía, la persona que más me ha ayudado a lo largo de mi vida, por su cariño y amor y por todo su empuje. A ellos va dedicada esta tesis.

Becas disfrutadas: Dursi FI2003-00367. 2005 BE 00487.

ÍNDICE

I. Resumen	1
II. Introducción	3
1. Terapia génica	3
1.1. Concepto y aplicación de la terapia génica	3
1.2. Métodos de administración génica	5
1.2.1. Terapia génica <i>ex vivo</i>	5
1.2.2. Terapia génica <i>in vivo</i>	5
1.2.3. Tipos de terapia génica según la clase de vector	6
1.2.3.1. Terapia génica viral	6
1.2.3.2. Terapia génica no viral	7
1.3. Actualidad de la terapia génica.	7
2. Adenovirus	11
2.1. Biología del Adenovirus	11
2.1.1. El genoma adenoviral	13
2.2. Ciclo viral del adenovirus	15
2.2.1. Internalización del Adenovirus en la célula	15
2.2.2. Replicación y transcripción adenoviral	16
2.2.2.1. Genes tempranos (“ <i>early</i> ”)	16
2.2.2.2. Replicación	17
2.2.2.3. Genes tardíos (“ <i>late</i> ”)	18
2.2.3. Empaquetamiento del Adenovirus	18
2.2.4. Maduración de la partícula adenoviral	20
2.2.4.1. Estadios o etapas de la maduración	21
3. Construcción de vectores adenovirales	24
3.1. Ligación directa <i>in vitro</i>	24
3.2. Recombinación homóloga en células HEK293	24
3.3. Recombinación homóloga en bacterias	25
3.4 Titulación del vector adenoviral	25
4. Vectores adenovirales	27
4.1. Adenovirus de 1ª generación	27
4.2. Adenovirus de 2ª generación	28

4.3. La respuesta inmune inducida por el Adenovirus	29
4.3.1. Respuesta inmune pre-existente	29
4.3.2. Respuesta inmune innata	30
4.3.3. Respuesta inmune celular	30
4.3.4. Respuesta inmune humoral contra el Ad	32
4.3.5. Respuesta inmune contra el gen terapéutico	32
4.4. Adenovirus de 3ª generación, <i>gutless</i> o adenovirus <i>helper</i> dependientes	33
4.4.1. ADN de relleno (ADN <i>stuffer</i>)	33
4.4.2. Producción de Adenovirus <i>gutless</i>	35
4.4.3. El sistema Φ C31- <i>attB/attP</i>	39
4.4.4. Respuesta inmune contra el Ad <i>gutless</i>	41
4.4.5. Ad <i>gutless in vivo</i>	42
III. Objetivos	46
IV. Resultados	47
1. Construcción de los genomas adenovirales <i>helper</i> y Ad controles	49
2. Caracterización de los Ad <i>helper</i> generados	51
2.1. Análisis de la estabilidad de los genomas generados	51
2.2. Amplificación del genoma adenoviral	52
2.3. Amplificación de los genomas adenovirales control Ad5/ <i>attP</i> y Ad5/RFP	52
2.4. Amplificación de genomas adenovirales <i>helper</i>	52
2.5. Determinación del ciclo viral de los vectores <i>helper</i> y Ad controles	53
2.6. Titulación de los diferentes vectores adenovirales	56
2.7. Producción de IU de Ad <i>helper</i> y controles a 36 y 56 horas	56
2.8. Cinética de replicación del genoma adenoviral	57
2.9. Replicación vs Producción viral	58
2.10. Cinética de producción proteica de los Ad <i>helper</i> y Ad controles	58
2.11. Amplificación de Ad <i>helper</i> en co-infección con Ad controles	61

2.12. Análisis del empaquetamiento y replicación viral	63
2.13. Determinación del título infeccioso del ensayo de empaquetamiento	65
2.14. Procesos de maduración	65
2.15. Análisis de las partículas virales halladas en los gradientes de CsCl	68
2.15.1. Análisis por microscopía electrónica de las partículas virales	69
2.15.2. Titulación de las bandas purificadas por CsCl	70
2.15.3. Análisis de la densidad de los virus purificados por CsCl	71
2.15.4. Análisis del contenido proteico de las cápsides Adenovirales	72
2.15.5 Análisis del contenido de ADN en las partículas Adenovirales	73
2.15.6. Análisis por Western Blot de las proteínas VII, <i>penton</i> y L1-52/55K	74
2.15.7 Análisis de la entrada del genoma viral al núcleo celular	77
2.15.8. La secuencia <i>attB</i> es la secuencia responsable del retraso en el ciclo viral	78
2.15.9. Genomas virales con una segunda señal de empaquetamiento pueden normalizar los niveles de partículas infecciosas	78
2.16 Estudios de EMSA (<i>Electroforetic Mobility Shift Assay</i>)	80
3. Generación de nuevas líneas celulares con las recombinasas Cre y Φ C31.	83
3.1 Generación del plásmido que contiene la recombinasa Φ C31 y resistencia a zeozina	84
3.2. Generación de la línea celular HEK-293/Cre.FC31 y N52.E6/Cre.FC31	84
3.3. Análisis de la actividad de las recombinasas Cre y Φ C31	84

3.4. Análisis de la actividad de escisión de la señal de empaquetamiento de los diferentes <i>Ad helper</i> por Southern Blot	86
3.5 Análisis de escisión de Ψ en el adenovirus <i>helper</i> Ad5/FC31.Cre	87
4. Amplificación de <i>Ad gutless</i>	88
4.1 Construcción del plásmido pRAF3.2 Δ E1-RFP	88
4.2 Amplificación del vector <i>gutless</i>	89
4.2.1 Producción de <i>Ad gutless</i> en función de la dosis de plásmido utilizado	90
4.2.2 Transfección de <i>Ad gutless</i> a las 40 y 60 horas	91
4.2.3 Amplificación de <i>Ad gutless</i> desde plásmido y virus	92
4.3 Amplificación de <i>Ad gutless</i> : 1 ^{er} paso de amplificación	93
4.4 Amplificación de <i>Ad gutless</i> : 2 ^o paso de amplificación	94
4.5 Amplificación de <i>Ad gutless</i> : 3 ^{er} paso de amplificación	94
4.6 Paso final de amplificación de <i>Ad gutless</i>	96
4.6.1 Amplificación de <i>Ad gutless</i> : Paso final de amplificación en células HEK293	96
4.6.2 Amplificación de <i>Ad gutless</i> : Paso final de amplificación en células HEK293/Cre.	97
4.7 Resumen del proceso de amplificación del <i>Ad gutless</i> FK7 con el <i>Ad helper</i> Ad5/FC31.Cre-RFPc	98
4.8 Análisis del genoma del <i>Ad helper</i> Ad5/FC31.Cre-RFPc en las producciones finales de <i>Ad gutless</i>	98
4.9 Análisis del extremo 5' del <i>Ad helper</i> en el proceso de producción de <i>Ad gutless</i>	100
4.10 Secuenciación de las bandas amplificadas	101
5. Inversión de la señal de empaquetamiento	102
5.1 Generación de <i>Ad helper</i> con señal de empaquetamiento invertida	102
5.2 Amplificación del <i>Ad helper</i> Ad5/FC31.Cre. Ψ^R .	103
5.3 Análisis del empaquetamiento del adenovirus Ad5/FC31.Cre. Ψ^R	103

5.4 Análisis de la recombinación homóloga por Ψ del Ad5/FC31.Cre. Ψ^R con el Ad control Ad5/RFP	105
5.5 Análisis de la recombinación homóloga por la señal de empaquetamiento entre Ad <i>gutless</i> pKCZ y Ad <i>helper</i> Ad5/FC31.Cre. Ψ^R	105
V. Discusión	110
1. Generación de los vectores adenovirales <i>helper</i> y controles	110
2. Caracterización de los vectores adenovirales <i>helper</i> generados	112
2.1 Los Ad <i>helper</i> generados presentan un ciclo adenoviral retrasado de 56-60 horas	112
2.2 La cinética de replicación del genoma adenoviral y de producción de proteínas no está afectada	113
2.3 Los Ad <i>helper-attB/attP</i> generados tienen afectado el proceso de empaquetamiento del genoma viral	114
2.4 La maduración de los Ad <i>helper</i> es más lenta como consecuencia del retraso en el empaquetamiento del genoma viral	116
2.5 La secuencia <i>attB</i> clonada en el extremo 5' de la señal de empaquetamiento es la causante del retraso en el ciclo viral	120
2.6 La secuencia <i>attB</i> une específicamente diferentes factores celulares que podrían impedir el proceso de empaquetamiento del genoma adenoviral	121
3. Generación y caracterización de nuevas líneas celulares con las recombinasas Cre y Φ C31	122
3.1 Los clones celulares HEK293/Cre.FC31 presentan un potencial de producción adenoviral similar a la línea celular HEK293	122
4. Amplificación de Ad <i>gutless</i>	123
4.1 Amplificación del vector <i>gutless</i> FK7 con el vector <i>helper</i> Ad5/FC31.Cre	124

4.2 Los genomas del Ad <i>gutless</i> FK7 y <i>helper</i> Ad5/FC31.Cre recombinan por la señal de empaquetamiento Ψ	127
5.- Inversión de la señal de empaquetamiento	128
VI. Conclusiones	131
VII. Materiales y métodos	133
Materiales	133
1. Cepas Bacterianas	133
2. Plásmidos	133
3. Vectores virales	133
4. Cultivos <i>in vitro</i>	133
5. Tabla de cebadores	134
Métodos	135
1. Obtención de ADN plasmídico	135
1.1 Minipreparaciones de ADN plasmídico	135
1.2 Maxipreparaciones de ADN plasmídico	136
1.3 Preparación de bacterias quimiocompetentes	136
2. Modificación y purificación de ADN plasmídico	136
2.1 Enzimas de restricción, ligación y fosfatasa alcalina	136
2.2 Electroforesis en gel de agarosa	137
2.3 Purificación de fragmentos de ADN	137
3. Obtención de los vectores adenovirales	138
3.1 Técnicas de clonación	138
3.1.1. Clonación mediante Timina/Adenina	138
3.1.2. Clonación mediante topoisomerasa (pCR-XL-TOPO)	138
3.1.3. Recombinación homóloga en bacterias	138
3.1.4. Recombinación homóloga en células HEK-293	139
3.2. Preparación/Purificación del genoma adenoviral para su transfección en células HEK293	140
3.3 Amplificación de fragmentos de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	141
3.4 Mutagénesis dirigida	142

4. Cultivos <i>in vitro</i>	142
4.1. Subcultivo de células	142
5. Amplificación y titulación de los vectores adenovirales	143
5.1 Amplificación de los vectores adenovirales	143
5.1.1. Transfección de los plásmidos adenovirales	143
5.1.2. Crecimiento de los vectores adenovirales	144
5.2. Purificación de vectores virales de 2 ^a generación	144
5.3. Titulación de los vectores adenovirales	145
6. Caracterización del ciclo viral de los adenovirus <i>helper</i>	145
6.1. Determinación del ciclo viral	145
6.2. Análisis de la cinética de replicación viral mediante Dot Blot	146
6.2.1. Montaje del Dot Blot y aplicación de las muestras	146
6.2.2. Marcaje y detección de sondas	146
6.2.3. Hibridación y revelado	147
6.3. Análisis de la cinética de producción proteica mediante FACS	147
6.4. Ensayo de empaquetamiento	148
6.4.1. Extracción de ADN viral desde virus purificado o lisado viral	148
6.4.2. Preparación de ADN de alto peso molecular	148
6.4.3. Southern Blot	149
6.4.3.1. Protocolo de Southern Blot	150
6.4.3.2. Transferencia de ADN por capilaridad a membrana	150
6.5. Gel de electroforesis de poli-acrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE), Tinción de plata y Western Blot	150
6.5.1. Gel de electroforesis de poli-acrilamida en dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE)	152
6.5.2. Tinción de plata de proteínas virales	152
6.5.3. Western Blot e inmunodetección	153

6.6. Ensayo de EMSA (<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i>)	155
6.6.1. Preparación de extractos nucleares	155
6.6.2. Preparación del gel y de la muestra	156
6.6.3. Preparación de la sonda	158
6.6.3.1 Unión/Hibridación de oligonucleótidos	158
6.6.4. Detección de la sonda	158
6.7. Microscopía electrónica de partículas adenovirales	159
6.8. Determinación de la densidad de las partículas virales purificadas	159
6.9. Ensayo de la entrada de ADN al núcleo celular	159
7. Generación de nuevas líneas celulares con las recombinasas Cre y Φ C31	159
7.1. Generación del plásmido que contiene la recombinasa Φ C31 y resistencia a zeozina	159
7.2. Análisis de la actividad de las recombinasas Cre y Φ C31	160
7.3. Análisis de la actividad de escisión de la señal de empaquetamiento de los diferentes <i>Ad helper</i> en líneas restrictivas con Cre y Φ C31	160
VIII. Bibliografía	161

I. RESUMEN

El Ad es el vector más utilizado en ensayos clínicos con humanos. Para evitar la respuesta inmune celular inducida por los Ad de 1ª y 2ª generación, se han generado los vectores de 3ª generación, también llamados *gutless* o *helper* dependientes. Para producir estos vectores se necesitan tres elementos fundamentales: un Ad *gutless* con un gen terapéutico o marcador de interés; un Ad *helper* que aporte las proteínas virales necesarias *in trans* y; una línea celular permisiva para la producción de Ad. Los Ad *gutless*, al no contener ninguna región viral codificante, no generan respuesta inmune celular y tienen una capacidad de hasta 36 Kpb. Se ha demostrado que la expresión de los genes que incorporan puede durar toda la vida del organismo. Sin embargo, si bien presentan grandes ventajas, su uso en ensayos clínicos con humanos todavía no ha sido viable debido a dos grandes inconvenientes: la contaminación por Ad *helper* y su producción a gran escala. Para solventar el problema de la contaminación por Ad *helper*, en este trabajo se propone un nuevo sistema de generación de Ad *gutless* basado en la recombinasa Φ C31-*attB/attP*. Los Ad *helper* generados llevan flanqueada su señal Ψ por las secuencias *attB/attP*. Φ C31 es una recombinasa unidireccional con lo que una vez realizada su función, al escindir la señal de empaquetamiento, evita la reacción inversa. Esta característica supone una ventaja frente a otras recombinasas como Cre ó FLPe. Sorprendentemente, al incorporar la secuencia *attB* entre el extremo ITR del Ad y su señal de empaquetamiento, los Ad *helper* generados alargan su ciclo viral hasta las 56-60 horas, sin embargo, ello no afecta la replicación eficiente del genoma viral y la producción de proteínas virales. Asimismo, se ha demostrado que tanto el proceso de empaquetamiento como el de la maduración de la partícula viral están afectados. Se ha observado que la clonación de una segunda señal de empaquetamiento en el extremo 3' normaliza los niveles de producción de los Ad controles, confirmando así que el genoma no queda retenido en ninguna región nuclear. Ensayos de EMSA han mostrado que diferentes proteínas celulares se unen a la secuencia *attB* y probablemente la unión de una de ellas impida el correcto empaquetamiento del genoma adenoviral. Por todo ello, el empaquetamiento diferencial por tiempo de los Ad *helper-attB/attP* generados ha sido aprovechado para la producción de Ad *gutless* acotando su producción

I. Resumen

a las 36 horas (tiempo en el que un Ad control completa su ciclo viral). Sin embargo, en las producciones de Ad *gutless*, los niveles de contaminación por Ad *helper* fueron elevados y éstos aumentaban significativamente en los sucesivos pasos de amplificación. El análisis del extremo 5' del Ad *helper* confirmó que éste recombinaba con el Ad *gutless* por la señal de empaquetamiento perdiendo las secuencias de recombinación y así su capacidad de empaquetarse más lentamente. Sin embargo, la inversión de la señal de empaquetamiento supuso la demostración de que este efecto es fácilmente evitable lo que convierte al Ad *helper* Ad5/FC31.Cre. Ψ^R en una buena herramienta para la producción de Ad *gutless*.

II. INTRODUCCIÓN

1. TERAPIA GÉNICA

Los recientes avances en las áreas de la bioquímica, la biología molecular (tecnología del ADN recombinante) y la secuenciación del genoma humano han permitido conocer las causas y las bases moleculares de un gran número de enfermedades humanas [1, 2]. Ello ha impulsado el desarrollo, en las últimas décadas, de la biomedicina, disciplina que se ha especializado en el desarrollo de diferentes técnicas y terapias, tanto a nivel celular como génico, para el tratamiento de diferentes enfermedades.

En la actualidad, la esperanza de vida de la población humana ha aumentado notablemente, con lo que es más factible la aparición del cáncer y enfermedades neurodegenerativas. Hasta hoy en día, la medicina tradicional, el uso de fármacos o la cirugía han sido las técnicas empleadas para dar cura a muchas de las enfermedades humanas. Sin embargo, frecuentemente, esta terapia no es suficiente. Para curar una enfermedad genética cabe corregir la carencia o disfunción génica en aquellas células o tejidos de manera eficiente, y es por esta razón, por la que solamente ha sido posible tratar los síntomas de estas enfermedades. Junto con las células madre, una de las soluciones que ha suscitado más esperanza para las enfermedades de base genética ha sido la terapia génica.

1.1. CONCEPTO Y APLICACIÓN DE LA TERAPIA GÉNICA.

La terapia génica es una de las disciplinas de la biomedicina que ha permitido desarrollar técnicas y protocolos para el tratamiento de enfermedades humanas. La terapia génica consiste en la introducción de ácidos nucleicos (ADN o ARN), con finalidad terapéutica, en una célula o tejido diana para aumentar o disminuir la expresión génica de uno o varios genes. Además del gen, dentro de esta definición se deben de incorporar todas aquellas unidades genéticas que puedan normalizar la expresión génica del paciente como los shRNAi (*short hairpins* RNA de interferencia), los RNAi, las secuencias antisentido o los quimeroplastos. De esta manera, conociendo la causa por la

II. Introducción

cual un individuo manifiesta una enfermedad genética, es factible pensar en una posible terapia, gracias a la introducción de ácidos nucleicos que permitan corregir la alteración y de esta manera, tratar con éxito la enfermedad [3-6]. Por otro lado, además de las enfermedades genéticas, actualmente, el concepto de terapia génica se extiende a otras enfermedades como el cáncer, gracias al uso de vectores oncolíticos [7] o genes suicidas y a enfermedades infecciosas como el caso del SIDA (Síndrome de Inmuno-Deficiencia Adquirida) [8].

En las últimas décadas, el desarrollo y experimentación de la terapia génica ha ido aumentando a lo largo de los años debido a la aparición de nuevos vectores, a una mayor bioseguridad del vector, al aumento de la eficiencia de transferencia génica y a las mejoras en las técnicas de producción a gran escala. Hasta la actualidad, se han realizado más de 1260 ensayos clínicos en humanos (figura1), de los cuales 13 están en fase II-III y 27 en fase III (<http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical/>).

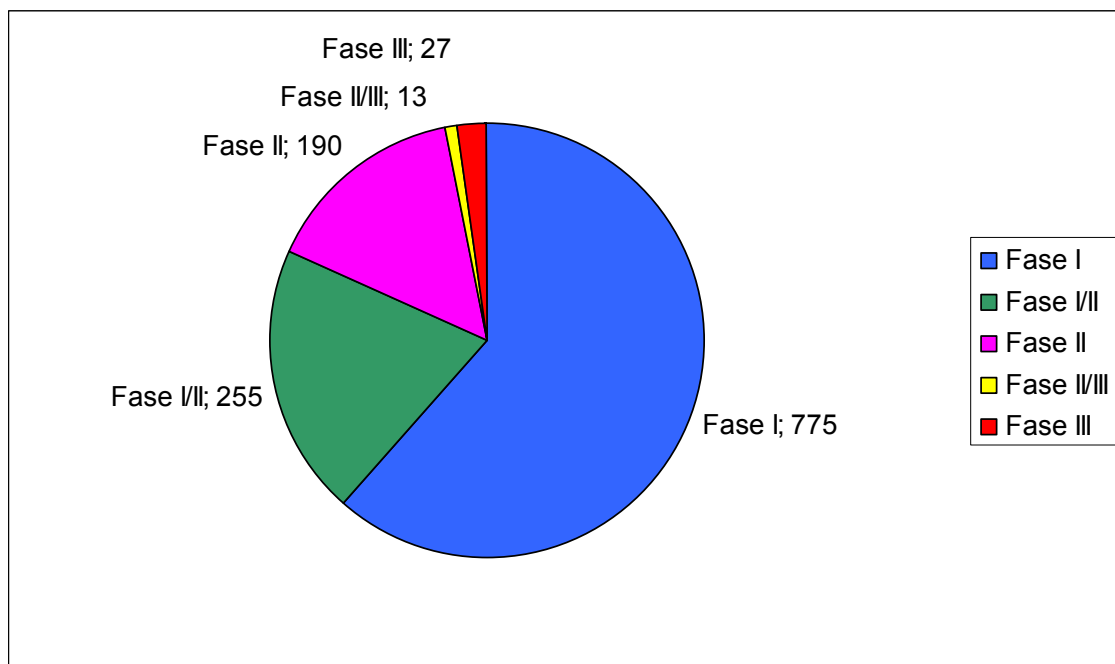


Figura 1. Fases de ensayos clínicos para protocolos de terapia génica.

En general, el tratamiento de la mayoría de enfermedades genéticas requiere la expresión de un gen concreto durante toda la vida del paciente. Por ello, el desarrollo de vectores bioseguros, que permitan la expresión eficiente y

específica del transgén durante largos periodos de tiempo y que no provoque, a su vez, la respuesta inmune del paciente es imprescindible para que estos vectores puedan utilizarse en protocolos de terapia génica *in vivo*.

1.2. MÉTODOS DE ADMINISTRACIÓN GÉNICA

La terapia génica se diferencia en dos grandes clases según su método de administración: La terapia génica *ex vivo* y la terapia génica *in vivo*.

1.2.1. Terapia génica *ex vivo*.

La terapia génica *ex vivo* consiste en la extracción de células dianas del paciente para su posterior transducción y selección *in vitro*. Una vez se tienen las células transformadas con el material genético de interés, éstas son implantadas en el paciente. Esta terapia presenta grandes ventajas ya que las células suelen estar transducidas en un alto porcentaje, y además, al ser del propio paciente, no son rechazadas por el organismo. En este caso, los vectores utilizados para esta terapia suelen ser integrativos (MLV, Lentivirus, etc), ya que las células suelen pasar por numerosos ciclos de división celular. Sin embargo, si se desea una expresión transitoria, se utilizan vectores no integrativos (Adenovirus, AAV, etc). La terapia génica *ex vivo*, esta siendo muy estudiada desde la aparición de las células madre pluripotenciales, las cuales permiten la regeneración de tejidos u órganos.

1.2.2. Terapia génica *in vivo*.

A diferencia de la terapia génica *ex vivo*, la terapia génica *in vivo* consiste en la transducción de las células diana mediante vectores (virales o no virales) directamente en el paciente (figura 2). Su éxito dependerá de la especificidad del vector por la célula diana y su eficiencia de transducción.

1.2.3. Tipos de terapia génica según la clase de vector

Los vectores de terapia génica se dividen en dos grandes clases: a) los vectores virales y b) los vectores no virales.

II. Introducción

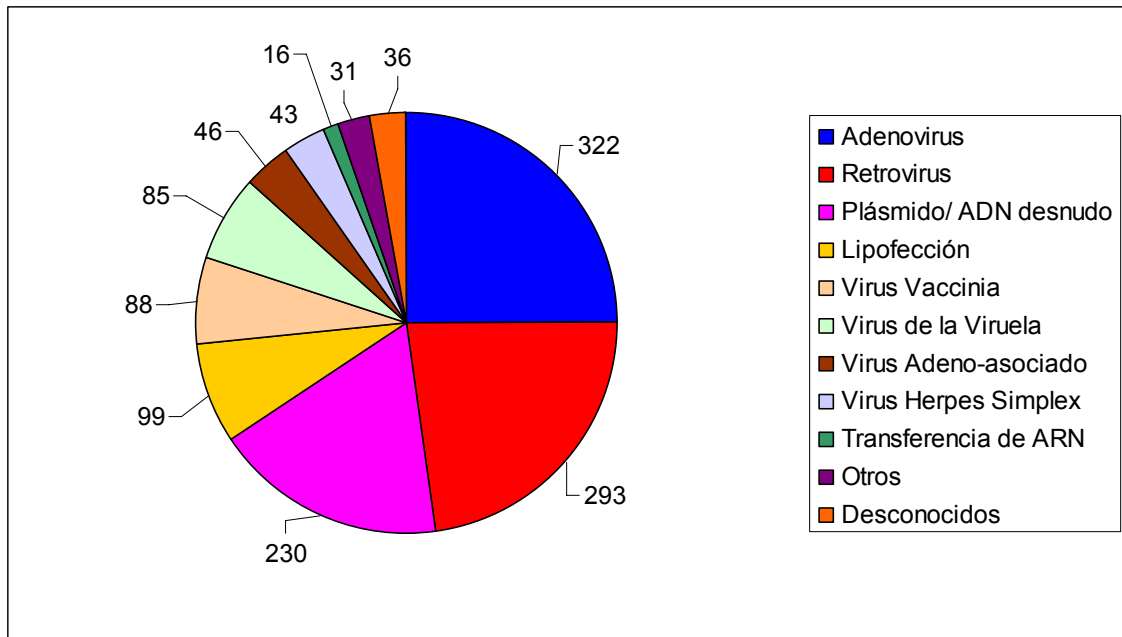


Figura 2. Vectores para terapia génica expresados en número total (<http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical/>).

1.2.3.1. Terapia génica viral.

Desde hace millones de años, los virus han co-evolucionado con su huésped, es por ello que son los vectores más eficientes que existen en la actualidad para la transferencia de material genético. Sin embargo, presentan algunas complicaciones debido a su alta respuesta inmune, producción de alto coste y, en algunos casos, gran dificultad técnica para su producción y escalado a nivel industrial, además de posibles problemas de bioseguridad.

La terapia génica viral consiste en la introducción de material genético mediante el uso de vectores virales, los cuales presentan un tropismo específico para diferentes tipos celulares, con lo que se permite una mayor eficiencia de transferencia hacia el órgano diana. Entre los vectores virales más utilizados se encuentran el retrovirus MMLV (Retrovirus de leucemia murina de Moloney), el adenovirus (Ad), el virus adenoasociado (AAV), el lentivirus y los virus herpes. El retrovirus MMLV ha sido el vector clásico de elección en la mayoría de ensayos clínicos. Sin embargo, en la actualidad los Ad son los vectores de mayor elección en clínica, aumentando el número de protocolos 2.5 veces desde el año 1999 (86 protocolos) hasta el año 2006 (305 protocolos) (<http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical/>).

1.2.3.2. Terapia génica no viral.

La terapia génica no viral transporta el gen de elección mediante vectores de origen físico-químico, lo que permite una fácil producción, una menor respuesta inmune y no ofrece limitación en cuanto a la longitud del gen de interés. Sin embargo, a pesar de su alta bioseguridad, su aplicación *in vivo* todavía está lejana debido a su poca especificidad por el tejido diana y a su baja eficiencia de transducción. Dentro de la terapia génica no viral, podemos distinguir entre: a) métodos de transferencia química, los cuales permiten la formación de complejos con el ADN por interacción de cargas y b) métodos de transferencia física como el caso de la electroporación [9], la biobalística y el sistema hidrodinámico donde se realiza una inyección intravenosa que por sobre-presión permite que el ADN inyectado penetre en los tejidos.

La elección del vector para transferir material genético a un órgano o tejido diana no es sencilla ya que el vector escogido debe variar en función de las necesidades terapéuticas de cada enfermedad, así como de las características de las células dianas propias. En estos momentos, una parte importante de la investigación en el campo de la terapia génica está destinada al descubrimiento y caracterización de nuevos virus y al desarrollo de nuevos vectores virales. De esta manera, la batería de sistemas de transferencia génica es cada vez mayor y por lo tanto, la elección del vector viral se ajusta, cada vez más, a las necesidades de cada enfermedad [10].

El vector ideal debería de tener las siguientes propiedades: gran eficiencia de transferencia del material genético utilizado; especificidad por el órgano diana; baja o nula inmunogenicidad; gran duración de la expresión del transgén; fácil producción y manipulación genética; fácil purificación; bajo precio de fabricación; y fácil escalado y control para su producción a nivel industrial.

1.3. ACTUALIDAD DE LA TERAPIA GÉNICA.

El éxito de la terapia génica en ensayos clínicos con humanos depende del desarrollo de vectores que garanticen la expresión del transgén eficientemente, sin causar efectos secundarios. En la actualidad, se acepta que no existe

II. Introducción

todavía un vector ideal que permita su aplicación para el tratamiento de todas las enfermedades genéticas. Aunque el número de ensayos clínicos de fase I y II es elevado (<http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical/>), tan solo unos pocos protocolos han llegado a fase III. Algunos ejemplos de ensayos clínicos que han llegado a fase III son: la inmunodeficiencia severa combinada (SCID)-X1 [11-13] y SCID-ADA [14, 15], la deficiencia para ornitina transcarbamilasa (OTC) [16], la hemofilia causada por factor IX [17-19] y algunas estrategias para combatir el cáncer [7, 20-22]. Algunos de estos protocolos han tratado los síntomas de la enfermedad con éxito como en el caso del SCID-X1. Sin embargo, no todos los protocolos han tenido éxito para todos los pacientes [23] y en algunos casos, algunos pacientes han seguido tomando la medicación adecuada para su enfermedad o han perdido la vida [24].

La inmunodeficiencia severa combinada por adenosina deaminasa (SCID-ADA) fue la primera enfermedad genética tratada con terapia génica en el año 1990 [15]. Este primer protocolo fue realizado a dos pacientes utilizando un vector retroviral con el gen ADA, transfectándolo en células T de sangre. Tras el trasplante de las células transducidas, los pacientes recuperaron los niveles normales de células T aunque siguieron tomando su medicación para la enfermedad. A raíz del primer protocolo, se han llevado a cabo 5 ensayos clínicos, con un total de 11 pacientes, utilizando diferentes vectores y protocolos de transferencia junto con el uso de las células madre [25].

En el año 2000, se inició un nuevo protocolo de terapia génica para 11 pacientes que padecían la enfermedad de SCID-X1. Para ello, se utilizó una estrategia de terapia génica *ex vivo* con un retrovirus en células madre del propio paciente. Desafortunadamente, en Octubre de 2002, Marina Cavazzana-Calvo y Alain Fischer suspendieron la terapia para los pacientes de SCID-X1 por consecuencia de la aparición de niveles anormales de glóbulos blancos en uno de los pacientes [12]. Este incremento descontrolado de células del sistema inmune provocó una leucemia, debido a la integración del genoma del vector en la región del gen MLO2, oncogén frecuentemente sobreexpresado en leucemias de células T [23]. Al suspender el protocolo, la alternativa inicial a la terapia génica era el trasplante de médula ósea. Sin

embargo, su realización no siempre era posible debido a la necesidad de un donante compatible.

En el campo de los adenovirus, el protocolo de terapia génica para enfermedades genéticas que tuvo mayor repercusión se realizó utilizando un vector de 2ª generación, sin las regiones E1 y E4, para el tratamiento de la deficiencia por ornitina transcarbamilasa (OTC). Los primeros estudios realizados en ratón y primates no humanos dieron buenos resultados, con lo que se pensó en su uso en ensayos clínicos con humanos [26]. Así, se realizó una administración del vector Ad de 2ª generación en 17 pacientes adultos con deficiencia parcial por OTC. Al desconocer la dosis adecuada para este protocolo, se administraron dosis desde 2E9 hasta 6E11 partículas físicas por kilogramo. Como resultado, 7 de los 17 pacientes mostraron actividad para el transgén, sin embargo todos los pacientes desarrollaron respuesta inmune celular y una alta respuesta inmune humoral contra el virus, lo que sugirió que los niveles bajos de expresión del transgén eran debidos a la dosis insuficiente del vector, y de este modo la corrección metabólica no pudo ser observada [16].

Con los resultados obtenidos de este ensayo, en Septiembre de 1999 se administró el mismo vector a un joven de 18 años inyectando en la arteria hepática una dosis de 6E11 partículas formadoras de placa por kilogramo. En aproximadamente 18 horas, el paciente desarrolló una fuerte respuesta inflamatoria sistémica, coagulación intravascular y fallo múltiple de órganos llevando al paciente a la muerte 98 horas tras la administración del vector [24]. Este ensayo demostró que los ensayos clínicos en animales no podían predecir los inconvenientes de la terapia en humanos o la variación entre paciente y paciente, y por consiguiente, era necesario una mayor experimentación en cuanto el estudio de la respuesta inmune con el vector adenovirus.

II. Introducción

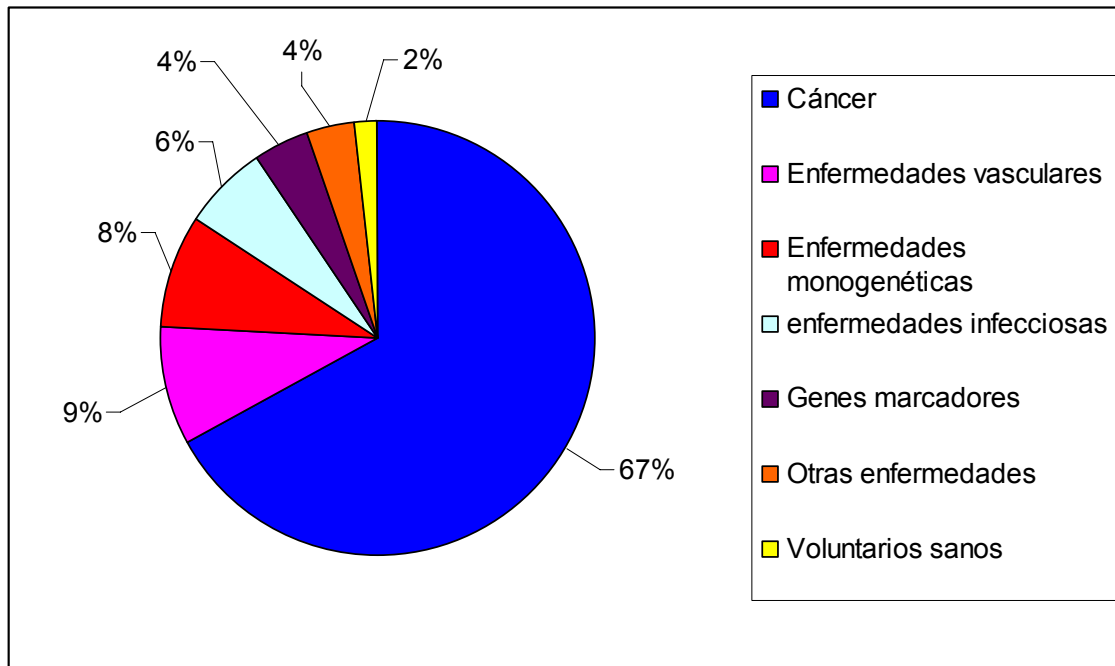


Figura 3. Porcentaje del tipo de indicación de los ensayos clínicos para terapia génica (<http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical/>).

En la actualidad el 67% del total de ensayos clínicos con humanos están dedicados al cáncer (figura 3). Para el tratamiento de esta enfermedad por terapia génica, el vector adenoviral oncolítico ha sido uno de los vectores utilizados. Esta terapia surgió, en el año 1996, cuando se modificó el genoma del adenovirus eliminando la región E1B-55K para que sólo pudiera replicar en aquellas células que tenían alterada la vía de la proteína p53 [27], como es el caso de muchos tipos celulares cancerosos. Sin embargo, este vector no se puede propagar en células normales, ya que al infectar la célula, puede entrar en apoptosis (en ausencia del gen E1B-55K) y de este modo, evitar la propagación del vector a las células sanas colindantes. Este vector adenoviral es conocido como dl1520 y es el nombre del producto farmacéutico conocido como Onyx-015 [28]. El uso del vector adenovirus Onyx-015 en ensayos clínicos con humanos ha sugerido la necesidad de una mayor potencia y selectividad para las células cancerosas, ya que éstas no presentan en muchos casos el receptor para el Adenovirus de serotipo 5 (receptor CAR). A pesar de la eficacia reducida de este vector en ensayos I y II, en China se ha lanzado el primer producto farmacéutico para terapia génica con una versión del Onyx-015 llamado H101 (Gendicine), el cual no tiene la región E3 [29].

Aunque los vectores no virales son menos eficientes en cuanto a su eficiencia de transferencia génica por la célula diana, se está proponiendo el uso de vectores integrativos que puedan insertar la copia del ácido nucleico, de forma específica, en regiones del genoma que no comporten un riesgo de mutagénesis. Este ha sido el caso de la integrasa Φ C31 [30], que integra fragmentos acompañados de una secuencia de 285 pb llamada *attB* en sitios específicos del genoma (pseudo-*attP*) [31-33]. También, se ha propuesto el uso de transposones [34, 35], los AAV recombinantes [36] o las nucleasas de dedos de Zinc [37].

2. ADENOVIRUS

2.1 BIOLOGÍA DEL ADENOVIRUS.

Los primeros adenovirus humanos fueron aislados por Rowe y col. en 1953 a partir de glándulas adenoides humanas y amígdalas [38]. Enders y colaboradores propusieron el grupo adenovirus en 1956 [39] y posteriormente fue aceptado por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus. Los adenovirus pertenecen a la familia Adenoviridae, donde se distinguen dos géneros: Mastadenovirus y Aviadenovirus. El género Mastadenovirus incluye las especies humano, simio, bovino, equino, porcino, ovino, canino y zarigüeya. El adenovirus fue ampliamente utilizado en las fuerzas armadas americanas como vacuna, donde se confirmó que producía gran número de síndromes respiratorios febriles [40, 41]. Estudios epidemiológicos confirmaron que los adenovirus provocan una pequeña proporción de las enfermedades respiratorias en la población general y un 7-10% en niños [40, 42]. Desde entonces, se han descrito más de 100 especies diferentes identificadas a partir de mamíferos, reptiles y aves manteniendo todos ellos una composición química y estructura arquitectónica similar [43]. Los adenovirus humanos se clasifican en 6 subgrupos (A-F) por su capacidad de hemaglutinación [43], los cuales se dividen en diferentes serotipos por sus propiedades inmunológicas. Los Ad pertenecientes al serotipo 2 y 5 (subgrupo C) son los Ad más estudiados y más ampliamente utilizados [44].

II. Introducción

Los adenovirus presentan una cápside icosaédrica (20 superficies triangulares y 12 vértices) sin envuelta de aproximadamente 70-90 nm y una densidad de flotación en CsCl de 1.33-1.34 g/cm³ [45-47]. La cápside está formada por 3 proteínas mayoritarias: la proteína *hexon*, la proteína *penton* y la proteína *fiber* [48, 49]. Las proteínas hexónicas (720 unidades) conforman la mayor parte de la superficie de la cápside, unidas en trímeros. Las proteínas pentónicas (240 unidades) se localizan en los vértices, donde se prolonga la proteína *fiber* que está compuesta por tres elementos básicos: el extremo N-terminal *tail* que se encaja al “*penton base*” o vértice, la parte central “*shaft*” con motivos repetitivos de 15 residuos aproximadamente [50] y el dominio C-terminal *knob* que se une al receptor celular y promueve la internalización de la partícula viral.

Además de las proteínas mayoritarias, el adenovirus presenta proteínas minoritarias que sirven para acomodar y estabilizar el genoma en la cápside [51]. Las proteínas estructurales del virión se designan desde la proteína II hasta la XII, de acuerdo al peso molecular que presentan en geles de poliacrilamida SDS-PAGE [52]. Las proteínas IIIa, VI, VIII y IX, están asociadas a la proteína *hexon*, mientras que las proteínas V, VII, mu (X), XI y XII sirven para dar anclaje al genoma viral [49] (Véase figura 4).

Además de las proteínas estructurales, el Ad presenta proteínas no estructurales que le permiten desarrollar diferentes etapas de su ciclo viral. Dentro de estas etapas podemos encontrar, el escape del endosoma gracias a la proteasa adenoviral [53], la liberación del genoma adenoviral de la cápside, la replicación de la cadena de ADN viral gracias a la actividad de las proteínas TP, DBP y AdPol y el empaquetamiento del genoma dentro de la cápside gracias a las proteínas IVa2 y L155K entre otras [54, 55].

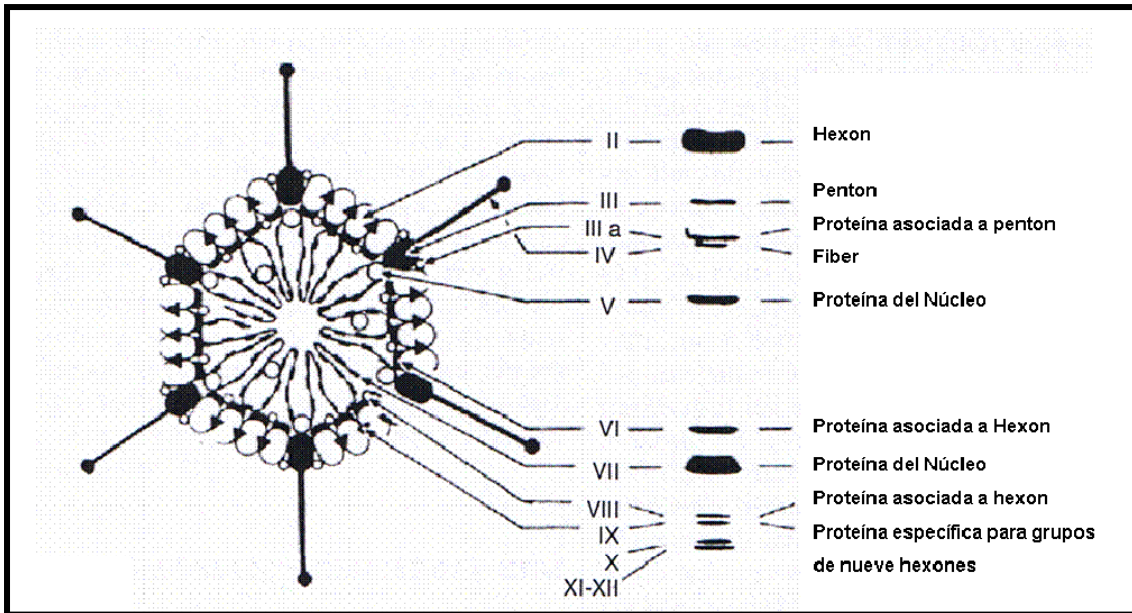


Figura 4. Polipéptidos del virión adenoviral en gel de electroforesis de poliacrilamida (SDS-PAGE) y su posición en la cápside viral (Adaptado de [56]).

2.1.1. El genoma adenoviral.

El genoma del adenovirus está compuesto por aproximadamente 35-36 Kpb. de ADN de doble cadena lineal sumamente condensado [57]. Concretamente, el genoma del Adenovirus humano de serotipo 5 (Ad5) contiene 35938 pb y está totalmente secuenciado. Su secuencia se encuentra, en detalle, en el banco génico de la base de datos NCBI (*The National Center of Biotechnology information: AC_000008, human adenovirus type 5, complete genome*).

El genoma adenoviral está unido a las proteínas adenovirales V y VII, las cuales le sirven como anclaje para un correcto empaquetamiento dentro de la cápside. En los extremos de la cadena de ADN se encuentran dos secuencias terminales invertidas llamadas ITR (*Inverted Terminal Repeats*) de entre 103 y 165 pb [58]. Justo en esta región, en los extremos ITR, se une la proteína TP (*Terminal Protein*), la cual estabiliza la doble cadena y permite la replicación del genoma viral [59]. A 200 nucleótidos del extremo 5' se localiza la señal de empaquetamiento (Ψ), secuencia que dirige el empaquetamiento del genoma viral gracias a su interacción con diversas proteínas virales y celulares.

II. Introducción

El genoma adenoviral está dividido en genes *early* (E1-E4), los cuales se transcriben en las primeras fases del ciclo, justo antes de la replicación del ADN viral, y los genes *late* (L1-L5), transcritos en una fase más tardía (producción proteica y empaquetamiento) (figura 5). Además, el genoma adenoviral codifica para una o dos secuencias llamadas VA-RNA (virus-associated RNA) transcritos por la RNA polimerasa III. Los adenovirus humanos pertenecientes a los subgrupos A, B2 y F transcriben un único VA-RNA mientras que los subgrupos B1, C, D y E transcriben dos [60]. Los VA-RNA, de aproximadamente 160 nucleótidos, permiten el control de la traducción eficiente del genoma viral e inhiben la síntesis proteica de la célula [61].

El genoma del adenovirus tiene un espacio genético muy comprimido, ya que en sus 36 Kpb se dan las tres pautas de lectura y los genes se transcriben desde 5' hacia 3' y viceversa, lo que lo convierte en un excelente ejemplo de espacio genético limitado para la producción eficiente del máximo número de proteínas.

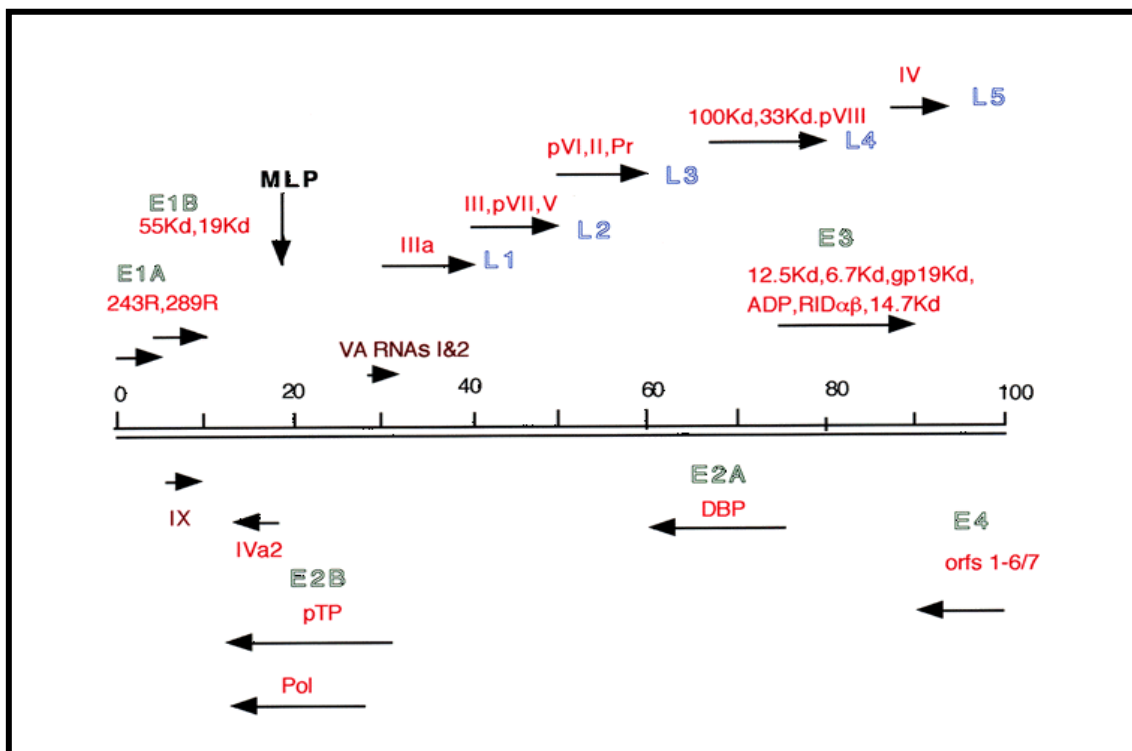


Figura 5. Mapa del genoma del Adenovirus de serotipo 5. Las regiones “*early*” están descritas como flechas E1-E4 y las regiones “*late*” están descritas como flechas L1-L5. (Adaptado de [44].)

2.2 CICLO VIRAL DEL ADENOVIRUS

2.2.1. Internalización del Adenovirus en la célula.

El adenovirus infecta la célula diana gracias a la interacción de varias proteínas de su cápside con diversos receptores y proteínas celulares. En el caso del Ad5, la proteína “*fiber*” reconoce mayoritariamente un receptor de 46KDa conocido como CAR (*Coxsackie and adenovirus receptor*) [62]. Al igual que el Ad5, el virus Coxsackie reconoce el mismo receptor para su internalización en la célula, aunque interacciona con él por diferentes epítopos [63]. El receptor CAR se puede encontrar en muchos órganos y tejidos humanos como hígado, corazón, pulmón y cerebro [64]. El receptor CAR funciona como molécula de adhesión entre célula y célula en la superficie basolateral de células epiteliales [65]. Se ha sugerido que el exceso de proteína *fiber* producida durante el ciclo del Ad, actúa rompiendo las conexiones que ofrece el receptor CAR entre célula y célula promoviendo la difusión eficiente del virus entre tejidos [66].

Además del receptor CAR, los diferentes serotipos de Ad utilizan otros receptores como los glicosaminoglicanos heparan sulfato, CD46, CD80/86, y ácido siálico, entre otros, para internalizarse en la célula tal y como se muestra en la tabla 1 [67]. A parte del receptor, el Ad5 reconoce las integrinas $\alpha v \beta_3$ o $\alpha v \beta_5$, las cuales interaccionan con el *penton base* (por los motivos RGD) facilitando la internalización del virus en la membrana celular [68, 69].

Receptor	Serotipo
CAR	Ad2, Ad4, Ad5, Ad12, Ad15, Ad19p, Ad31 y Ad41
CD46	Ad3, Ad11, Ad14, Ad16, Ad21, Ad35, Ad37 y Ad50
Ácido Siálico	Ad8, Ad19a y Ad37
CD80/86	Ad3
Heparan Sulfato	Ad2 y Ad5

Tabla 1. Tabla de receptores celulares del adenovirus y los serotipos que los utilizan [67].

II. Introducción

La internalización del Adenovirus activa diferentes procesos celulares mediante diferentes cascadas de fosforilación y defosforilación de proteínas. Concretamente, el reclutamiento de las integrinas por parte de la proteína *penton* activa diferentes señales celulares, incluyendo la activación de la quinasa fosfatidil-inositol PI3-K y las GTPasas Rho [70], la p130^{CAS} [71], las cuales reorganizan la estructura del citoesqueleto e inician la internalización de la partícula viral hacia el núcleo.

El adenovirus utiliza la endocitosis mediada por receptor como vía de entrada a la célula. El virus queda envuelto por una invaginación de la membrana plasmática que va recubriéndose por la proteína clatrina, formando, de este modo, una vesícula que posteriormente se fusiona con el endosoma [72, 73]. El endosoma es un mecanismo de defensa celular frente a material exógeno que entra en la célula. Por consiguiente, el adenovirus ha de liberar su material genético, conjuntamente con proteínas de la cápside, antes de su degradación por proteasas lisosómicas [74-76]. A medida que el endosoma va avanzando hacia el núcleo, el virus que contiene queda expuesto a un pH ligeramente ácido (pH=5.5 aproximadamente) lo que es suficiente para iniciar la disrupción de la cápside. En aproximadamente 30-60 minutos el genoma del Ad puede llegar al núcleo. Así, se ha descrito que la interacción de la partícula viral con los microtúbulos de la célula, gracias a la dinaína [77, 78], puede jugar un papel importante para su transporte al núcleo y finalmente traspasar la membrana nuclear por un complejo de poro [79-81].

2.2.2. Replicación y transcripción adenoviral.

2.2.2.1. Genes tempranos (“early”)

Una vez el genoma adenoviral ha llegado al núcleo, prepara a la célula para poder replicar su cadena de ADN de manera segura y posteriormente, producir todas las proteínas necesarias para la formación de nuevos viriones. En primer lugar, necesita simular la entrada en fase S del ciclo celular para proveer un buen ambiente replicativo. En segundo lugar, el genoma adenoviral necesita expresar las proteínas de replicación, las cuales se unirán a las proteínas celulares necesarias para el inicio de la replicación de la cadena de ADN.

Finalmente, el Ad protege a la célula de la posible respuesta inmune celular para facilitar la difusión y replicación del adenovirus dentro del organismo.

Previamente a la replicación viral, el genoma adenoviral transcribe alrededor de 25 genes tempranos (E1-E4), los cuales actúan secuencialmente en diferentes etapas del ciclo viral para permitir la replicación del genoma de forma eficiente. Los genes E1A activan la cascada de todos los demás genes virales ya que sólo es necesario la presencia de factores celulares para su transcripción. Además, las proteínas E1A inhiben la replicación celular [82], lo que contribuye a una replicación del genoma viral mucho más eficiente. La región E1B codifica para las proteínas que inhiben la apoptosis y preparan el ambiente intranuclear para la replicación adenoviral (E1B 55K y E1B 19K) [83]. El gen E2 codifica para las proteínas de replicación del Ad (AdPol, TP y DBP) [84]. La región E3 codifica para las proteínas que evitan la respuesta inmune celular y de esta manera, el adenovirus permanece el tiempo necesario para completar el ciclo infectivo (E3gp-19K y ADP (E3-11.6K) entre otras) [85, 86]. En esta región se encuentra la proteína de muerte adenoviral (ADP) que ayuda a lisis de la célula, de forma programada, al final del ciclo [87, 88]. Esta proteína se expresa desde el inicio del ciclo viral pero actúa justo al final del proceso [89], lo que deja muchas preguntas abiertas sobre otras posibles funciones. Finalmente, la región E4 codifica para 7 marcos abiertos de lectura o ORFs (Open Reading Frames) con funciones claramente diferentes. Entre estas funciones se encuentran la participación en la replicación del genoma viral [90], “splicing” [91, 92], transporte del mRNA (RNA mensajero) [93], inhibición de la síntesis proteica celular [94], regulación de la apoptosis [95] y lisis de la célula [96].

2.2.2.2. Replicación

La síntesis del genoma adenoviral requiere de la participación de 3 proteínas virales: la AdPol (polimerasa adenoviral), la pTP (pre-Terminal protein) [97] y la DBP (ADN *binding protein*), todas ellas codificadas por la región E2 del adenovirus [59]. La DBP actúa en diferentes niveles ya que ayuda a la replicación del genoma viral y a la unión de factores celulares que incrementan la replicación [98]. Además, la DBP se une a la cadena de una sola hebra, lo que protege al genoma viral frente a nucleasas celulares [99]. Por otro lado, la

II. Introducción

proteína pTP se une a la proteína AdPol de forma estable, lo que es imprescindible para un inicio eficiente de la replicación y de la posterior elongación de la cadena [100]. Asimismo, además de las proteínas virales de replicación, los factores celulares NF1/CTF (*nuclear factor 1/Nuclear transcription factor*), NFII y NFIII/Oct-1 incrementan hasta 200 veces la replicación del Ad en la célula [101], lo que los hace imprescindibles para una infección rápida y eficiente. La conjunción de todas estas proteínas inicia la elongación de la cadena de ADN a partir de los ITR, en ambos extremos del genoma viral, replicando de forma simétrica ambas cadenas de forma organizada [100].

2.2.2.3. Genes tardíos (“late”)

Los genes tardíos son transcritos por la acción del promotor MLP (*Major Late Promoter*), a partir del cual se genera un transcrito de aproximadamente 30.000 nucleótidos que se poliadenila y por *splicing* alternativo, genera hasta 18 transcritos divididos en 5 familias de mRNAs tardíos (L1-L5) [102]. Básicamente, las proteínas transcritas en las regiones tardías participan en la formación de la cápside del Ad, el empaquetamiento del genoma adenoviral, el ensamblaje final de la partícula viral infecciosa y en la lisis de la célula infectada.

2.2.3. Empaquetamiento del Adenovirus.

El empaquetamiento del Adenovirus es un proceso de múltiples etapas donde intervienen diferentes proteínas tanto virales como celulares. El empaquetamiento del Ad se produce de forma polar ya que en el extremo 5' del Ad se halla la señal de empaquetamiento (Ψ) por donde se inicia el proceso. Concretamente, la señal Ψ se localiza entre los nucleótidos 198 y 358 del genoma en el caso del Ad5 [103]. Se ha descrito que la señal de empaquetamiento del Ad5 está compuesta por 7 regiones repetitivas llamadas “A-repeats” [104]. Estas regiones tienen un motivo de secuencia característico: 5'-TTTGN₈CG-3', el cual está conservado entre diferentes serotipos de Ad [105, 106]. Entre los 7 “A-repeats”, los más importantes para el Ad de serotipo 5 son los A1, A2, A5 y A6, ya que se ha descrito que por su localización y secuencia son los más críticos en cuanto al empaquetamiento [106, 107]. Se

ha demostrado que cada *A-repeat* es independiente de los demás y por ello, se han generado secuencias de empaquetamiento artificiales con algunos de los *A-repeats* ya existentes con eficiencias de empaquetamiento similares al adenovirus salvaje [107, 108]. Asimismo, la posición de la señal de empaquetamiento es flexible tanto en el número de *A-repeats* que contiene como en su localización, ya que puede hallarse tanto en el extremo 3' como en el 5' del genoma [103]. Lo que es totalmente necesario para el proceso de empaquetamiento es que la señal Ψ se encuentre en los primeros 600 nucleótidos, aproximadamente, del extremo del Ad. Si la señal de empaquetamiento se localiza a una mayor distancia del extremo ITR, el genoma adenoviral pierde su capacidad de empaquetamiento [103].

Se han descrito hasta 12 proteínas virales que intervienen en el proceso de empaquetamiento, entre las cuales se encuentran las proteínas IVa2, L1 52/55K, L4 100K, L4 33K y L4 22K. Además, en este proceso intervienen factores nucleares que se unen a la señal de empaquetamiento como el Oct-1 y el COUPTF1 [55, 109-111]. La proteína IVa2 interactúa con la secuencia CG del *A-repeat* [54] y genera un complejo proteico con la proteína L1 52/55K [112-114], el cual es imprescindible para el correcto proceso de empaquetamiento [115-117]. En esta unión de proteínas a los *A-repeats*, se ha descrito recientemente que también interviene la proteína L4-22K, la cual interacciona con el motivo TTTG [118]. Asimismo, se ha publicado que la proteína L1 52/55K interacciona con la señal de empaquetamiento en ausencia de la proteína IVa2 *in vivo* [119], con lo que se sugiere que la proteína L4-22K podría reclutar a L1 52/55K en el proceso de empaquetamiento, ya que esta proteína, individualmente, no se une a la señal Ψ . La unión de todas estas proteínas a la señal de empaquetamiento genera un complejo proteico que guía al genoma adenoviral a uno de los vértices de la cápside por donde se inicia el empaquetamiento (figura 6).

Se postula que la entrada del genoma viral dentro de la cápside es un proceso que comporta gasto energético donde podría intervenir una ATPasa que puede localizarse en la proteína IVa2 [55]. Una vez el genoma adenoviral se encuentra dentro de la cápside, se va acomodando gracias a proteínas propias

II. Introducción

del adenovirus que le sirven de anclaje [49], como es el caso de la proteína VII precursora (pVII) que actúa en este nivel [120]. Una vez el genoma del Ad está empaquetado y anclado dentro de la cápside viral, la partícula viral se cierra y madura pasando por diferentes estadios [121].

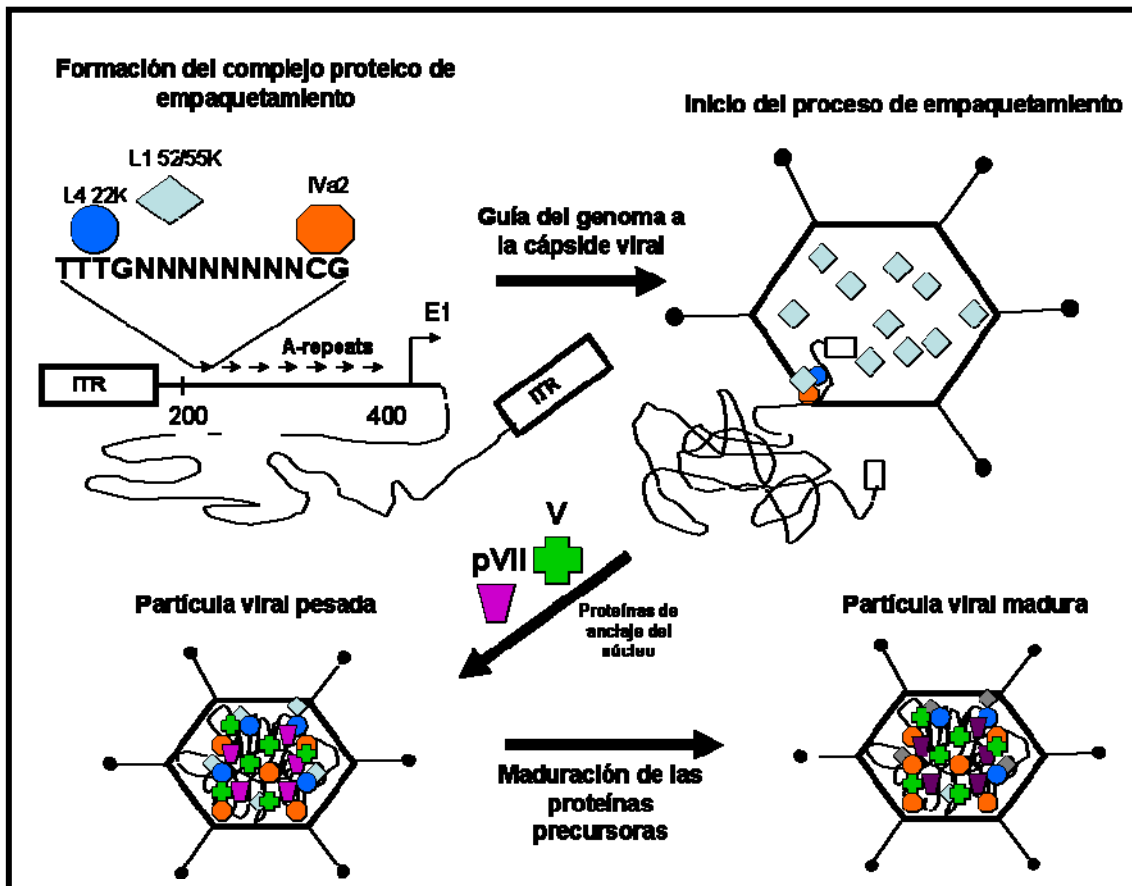


Figura 6. Esquema de las diferentes etapas de empaquetamiento y maduración de la partícula adenoviral.

2.2.4. Maduración de la partícula adenoviral.

Una vez el genoma adenoviral se encuentra dentro de la cápside, el ADN ha de acomodarse y condensarse de manera eficiente, uniéndose a diferentes proteínas que intervienen como anclaje. De manera significativa, el genoma adenoviral se ancla sobre las proteínas V y VII tal y como se muestra en la figura 4. La partícula adenoviral ha de madurar desde una partícula joven o inmadura hasta convertirse en una partícula infecciosa. Para ello, el adenovirus sintetiza su propia proteasa, proteína que interviene directamente sobre el desarrollo de la infectividad de la partícula adenoviral [122, 123]. La proteasa adenoviral, también llamada Adenaína [124], se transporta dentro de la cápside, con aproximadamente 10-50 copias por partícula [53, 125], y actúa de

forma específica, degradando 6 proteínas precursoras (IIIa, pVI, pVII, pVIII, X (mu) y pTP) [122, 126-128]. La existencia de los productos degradados dentro de la cápside adenoviral, es consistente con la idea del transporte de la proteasa en la cápside del Ad [53].

La proteasa adenoviral se sintetiza a partir del gen L3 y tiene un peso molecular de 23 KDa. Se postula que la Adenaína se sintetiza de forma inactiva y necesita de cofactores para su activación [129]. La adenaína actúa en presencia del ADN viral, degradando un péptido viral de 11 aa de la proteína pVI (pVIc), el cuál se une a la proteasa y la activa finalmente para iniciar la proteólisis de los péptidos adenovirales precursores [130]. Asimismo, se ha descrito que la Adenaína no sólo actúa en las fases finales del ciclo viral, sino que podría tomar parte en diferentes etapas del ciclo viral [131]. Se ha publicado que esta proteasa digiere la citoqueratina 18, reorganizando de este modo el citoesqueleto celular. Esta acción sobre el citoesqueleto debilita la integridad de la célula y promueve la liberación del virus lisando la célula [132, 133]. Esta teoría ha sido refirmada por otros autores que postulan el mismo efecto de la proteasa sobre el citoesqueleto celular conjuntamente con la inhibición de proteínas celulares que puedan reparar el citoesqueleto por la nueva síntesis de queratina [134]. Otra de las proteínas que actúan en las últimas fases del ciclo viral es la proteína ADP (*Adenovirus Death Protein*) o E3-11.6K. Esta proteína es necesaria para una lisis celular eficiente y una posterior liberación de las partículas virales al exterior de la célula [87]. En adenovirus mutantes para la proteína ADP (*Adadp*), los virus permanecen en el núcleo de la célula y no se liberan al exterior de manera eficiente [87, 88]. En las últimas etapas de la infección viral (30-40 horas post-infección), la proteína ADP se localiza en la membrana del núcleo y en el aparato de Golgi, lo que localizaría su función, de muerte celular, en la membrana nuclear.

2.2.4.1. Estadios o etapas de la maduración

En una infección viral productiva con adenovirus se generan diferentes clases de partículas, producto de diferentes estadios de empaquetamiento y maduración de la partícula viral siguiendo un orden establecido [135, 136]. La

II. Introducción

separación de los diferentes estadios de empaquetamiento se efectúa por ultracentrifugación utilizando gradientes de CsCl o gradientes de sacarosa.

El primer estadio corresponde a las cápsides vacías y se encuentra en la parte superior de los gradientes de CsCl [137-139]. Este estadio contiene todas las proteínas mayoritarias de la cápside, conjuntamente con proteínas de anclaje al genoma viral en la cápside. Aunque el ensamblaje del virión ocurre en el núcleo, la trimerización de la proteína hexónica empieza en el citoplasma, donde se asocia la proteína 100K antes de su translocación al núcleo [140]. Se postula que los trímeros de proteína *hexon* son translocados al núcleo conjuntamente con la proteína pVI [141]. En primer lugar, hexones, pentones y proteína IX se ensamblan conjuntamente con las proteínas 100K, pVIII y pVII para formar una partícula “pre-viral” con una densidad de 1.285 g/cm^3 en gradiente de CsCl. Se ha postulado que las proteínas 100K, pVIII y pVII podrían ser los pilares para el inicio de la formación de la estructura icosaédrica del adenovirus [142].

Diversos autores también denominan a este primer estadio: partícula ligera (“*Light particle*”) o partícula incompleta [143], pero en este caso los autores permiten que estas partículas puedan contener parte del genoma adenoviral o estar totalmente vacías de ADN. A este intermedio de empaquetamiento se unen secuencialmente las proteínas IIIa, 50K, 39K, 28K y pVI para llegar a una densidad en gradiente de CsCl de $1.295\text{-}1.315 \text{ g/cm}^3$ [142, 144].

En el siguiente intermedio desaparecen las proteínas 100K, 39K y 28K y a su vez, el genoma viral entra en la cápside aumentando la densidad de la partícula viral. Este estadio corresponde al intermedio pesado (“*heavy intermediate*”) y tiene una densidad de flotación en CsCl de 1.37 g/cm^3 . La proteína V y pVII indican la presencia del genoma adenoviral dentro de la cápside [145].

En este intermedio de empaquetamiento, la proteasa adenoviral actúa sobre algunas de las proteínas que ayudan a compactar el genoma viral y las degrada para acabar de ajustar y ensamblar la cápside viral [121]. La partícula adenoviral pierde parte de su densidad debido a la acción de su proteasa.

Anderson y colaboradores demostraron que 3 de los polipéptidos que se encuentran en el virión final provienen de proteínas precursoras: VI, VII [122] y VIII [146]. La proteína VI de peso molecular 24 KDa proviene del precursor pVI (27 KDa). La proteína VII de 18.5 KDa proviene del precursor pVII (21 KDa) y finalmente la proteína VIII de 13 KDa proviene del precursor pVIII (26 KDa). A partir de estos estudios fue posible esclarecer una posible teoría sobre el proceso de empaquetamiento y maduración de la partícula adenoviral en los estadios finales. Una vez ha entrado el ADN y la proteasa adenoviral ha actuado sobre sus precursores, la partícula pesada pasa a ser una partícula viral joven (densidad de 1,34-1.35 g/cm³) [143] donde se pueden encontrar parte de los precursores proteolizados y parte no proteolizados. En este estadio, desaparece la proteína 50K que se intercambia por la proteína V y se van procesando los precursores IIIa, VI, VII, VIII, X y pTP (*DNA-Terminal Protein*) [70] para generar finalmente la partícula viral madura e infecciosa de 1.345 g/cm³. Se postula que los fenómenos de maduración ocurren en el transcurso de 3 a 5 horas para la completa formación del virión infeccioso [147].

Se ha descrito que la proteína L1 52/55K es necesaria para el ensamblaje final del virión maduro [116, 148]. Esta proteína se encuentra presente en cápsides vacías. Cuando el genoma viral entra en la cápside, la adenina degrada a la proteína L1 52/55K y ésta desaparece de la cápside, dejando únicamente los productos de su proteólisis [149]. Asimismo, esta proteína se localiza fuera de las zonas de replicación del genoma adenoviral, indicando que el ensamblaje del virión ocurre en un compartimento nuclear diferente al de la replicación del genoma adenoviral [148].

Aunque se han realizado diversos estudios para averiguar los mecanismos de la maduración del Ad, todavía se desconocen muchos de los aspectos que intervienen en este proceso y a su vez, todavía no se ha descrito a qué proteínas adenovirales corresponden algunos de los polipéptidos que se encuentran en la cápside viral en el transcurso de los diferentes estadios de su maduración.

3. CONSTRUCCIÓN DE VECTORES ADENOVIRALES

El genoma del adenovirus, transfectado directamente en células permisivas, permite la generación de nuevos viriones sin la necesidad de su cápside proteica [150]. Ello ha facilitado desarrollar técnicas y protocolos para la generación de nuevos vectores adenovirales con múltiples modificaciones genéticas. Básicamente, se pueden diferenciar tres protocolos de construcción del genoma adenoviral: la ligación directa *in vitro*, la recombinación homóloga en células HEK293 y la recombinación homóloga en bacterias [151].

3.1. LIGACIÓN DIRECTA *IN VITRO*.

El primer protocolo utilizado para la construcción de vectores adenovirales fue el sistema de ligación directa *in vitro* con bacterias. Este sistema consiste en la clonación directa, mediante ligación, del fragmento de interés (gen o secuencia de ADN) en un plásmido que contiene el genoma del adenovirus. Aunque simple, este método presenta gran dificultad ya que son escasas las dianas de restricción únicas localizadas en el genoma viral. Además, la clonación de fragmentos pequeños de ADN (0.5-3 Kpb) en plásmidos grandes (35-36 Kpb) es muy poco eficiente. El método de ligación directa requiere, frecuentemente, el uso del ensayo en placa para el aislamiento de clones positivos, debido a que muchos de los genomas amplificados suelen resultar adenovirus salvajes o por otro lado, nulos en cuanto a la expresión del transgén clonado.

3.2. RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA EN CÉLULAS HEK293

Debido a la gran dificultad que comportaba el método de la ligación directa *in vitro* con genomas de alto peso molecular, en 1981, Stow diseñó un nuevo método para la construcción de genomas adenovirales [152]. Posteriormente, en 1994, Graham y colaboradores mejoraron el método basándose en el uso de dos plásmidos [153], el primer plásmido contenía todo el genoma viral a excepción del gen E1 y la señal de empaquetamiento, y el segundo plásmido (lanzadera) conteniendo un ITR, la señal de empaquetamiento y una secuencia

homóloga al primer plásmido. Una vez se ha clonado el gen de interés en el plásmido lanzadera, ambos plásmidos se co-transfectan en células HEK293 para la generación del vector.

3.3. RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA EN BACTERIAS

Este método está basado en la recombinación homóloga de dos plásmidos, en forma lineal, utilizando la cepa de *E. coli* BJ5183 (recBCsbcBC) que permite realizar la recombinación homóloga entre los dos fragmentos [154, 155]. El plásmido que contiene el genoma adenoviral presenta dos dianas de restricción (*PacI* ó *PmeI*), las cuales flanquean el origen de replicación del plásmido y una resistencia a antibiótico. De este modo, al abrir el plásmido por *PacI* ó *PmeI*, se libera el genoma, en forma lineal, para ser transfectado en células permisivas (HEK293). El segundo plásmido contiene el extremo 5' del genoma viral con el extremo ITR, la señal de empaquetamiento y una región homóloga al genoma viral correspondiente a 3-4 Kpb de la región E2. En este segundo plásmido lanzadera se clonan los genes o fragmentos de interés. Una vez comprobada la inserción del fragmento en el plásmido lanzadera, ambos plásmidos son digeridos por enzimas de restricción y co-transformados en *E. coli* BJ5183 donde se lleva a cabo la recombinación homóloga.

3.4. TITULACIÓN DEL VECTOR ADENOVIRAL

En el caso de los vectores adenovirales, las unidades de mayor relevancia son las partículas físicas y las unidades infecciosas. Generalmente, el título físico (PP: *Physical particles*) se cuantifica midiendo la absorbancia de la muestra a una longitud de onda de 260 nm después de la lisis del virión [156, 157]. Con este método se cuantifica la cantidad de genomas virales que contiene una preparación.

El título infeccioso, en Ad de 1^a y 2^a generación, es la concentración de partículas capaces de infectar células HEK293 y causar efecto citopático *in vitro*. Este valor suele expresarse en IU/mL. El ratio PP/IU es una medida

II. Introducción

importante ya que representa la fracción de virus que es infecciosa. La FDA recomienda un ratio menor de 30:1 para realizar ensayos clínicos [158].

Cabe destacar que uno de los inconvenientes asociados a la titulación de vectores adenovirales es la estandarización de protocolos para la determinación del título físico e infeccioso. Diferentes grupos de investigación pueden utilizar diferentes métodos de cuantificación, los cuales dificultan la comparación de resultados entre laboratorios. Además, el título puede variar en función de las condiciones de almacenaje y stock, de la línea celular utilizada y del clon de cada laboratorio [159-161]. Uno de los errores clásicos es el uso del coeficiente de extinción molar del genoma de Ad salvaje, el cual contiene un genoma de 35.9 Kpb [162, 163]. El coeficiente de extinción molar varía en función del tamaño que presente el genoma del vector. Si no se toman en cuenta estos factores, la cuantificación del título de la muestra puede variar considerablemente.

Por ello, en el campo del adenovirus se han intentado evitar todos estos inconvenientes asociados a la titulación de vectores gracias al uso del material de referencia adenoviral (ARM) [164]. El ARM es una preparación de adenovirus humano de serotipo 5 totalmente caracterizada. Su título físico es de $5.8E11$ PP/mL y su título infeccioso de $7E10$ IU/mL. El ratio PP/IU es de 8.3:1.

En el caso de los adenovirus *gutless*, al no contener ninguna región viral codificante, no producen efecto citopático, con lo que, en ausencia de genes marcadores, no es posible determinar su título infeccioso. Gracias al ARM se puede extrapolar el título infeccioso por la co-infección de ambas muestras en placa. En primer lugar se cuantifica el número de partículas físicas de ambos vectores por Southern Blot. A posteriori, se co-infectan ambos vectores en células HEK293 y se extrae el ADN celular a las 4 horas tras la infección para realizar la misma técnica de Southern Blot. De este modo, con la técnica de Southern Blot podemos cuantificar el título infeccioso del vector *gutless* comparándolo con el título del ARM y su título físico [165].

4. VECTORES ADENOVIRALES

4.1. ADENOVIRUS DE 1ª GENERACIÓN

Los Ad están asociados a patologías bien descritas y poco importantes [40]. Aun y así, para evitar la propagación de estos vectores y sus efectos adversos para un posible uso en terapia génica, se han de generar vectores deficientes en cuanto a su replicación. Los vectores de 1ª generación son deficientes para la región E1, que es la primera región del Ad que se transcribe y da paso a las diferentes etapas de transcripción y replicación (figura 7) [166]. De esta manera, el vector permite una capacidad máxima de 5.1 Kpb para introducir secuencias de ADN o un gen terapéutico. Posteriormente, para incrementar la bioseguridad de estos vectores, se eliminó la región E3, con lo que se aumentó su capacidad de incorporación de material genético hasta 8.2 Kpb. La región E3 juega un papel importante en la evasión de mecanismos de defensa del huésped frente al Ad y no es fundamental para su replicación [167]. Sin embargo, aún siendo prescindible, la región E3 puede ser beneficiosa para la administración de vectores adenovirales *in vivo*, ya que se ha descrito que la esta región o el gen E3-gp19K pueden incrementar la persistencia del transgén en algunos modelos de roedor [168, 169].

Estos vectores, al ser deficientes en las regiones E1 y/o E3, deben ser amplificados en líneas celulares que permitan su propagación. La primera línea generada para la producción de vectores adenovirales fue la línea celular HEK293, la cual fue transformada con un fragmento del Ad que contenía la región E1 [170]. Esta línea permite la replicación de adenovirus en altos títulos, sin embargo, durante el crecimiento de estos vectores, se generan partículas RCA (*Replication Competent Adenovirus*) debido a la recombinación homóloga entre zonas del vector y el fragmento de Ad clonado de la célula [171, 172]. De este modo, se generan partículas de Ad capaces de replicar gracias a la incorporación del gen E1. Para evitar la generación de partículas RCA se generaron nuevas líneas celulares como las PER.C6 [173], 911 [174] y N52.E6 [175] con la finalidad de aumentar la bioseguridad de estos vectores. Las líneas celulares PERC.6 y N52.E6 contienen una región mínima del gen E1, con lo

II. Introducción

que se evita la posibilidad de recombinación homóloga entre la célula y el vector.

Los vectores de 1ª generación, si bien no pueden replicar, generan una significativa respuesta inmune *in vivo* debido a la expresión residual de genes virales. Esto se debe a la activación de la respuesta inmune celular mediada por linfocitos T citotóxicos que, a su vez, elimina las células transducidas y con ello la expresión del transgén [176-180]; [176, 181].

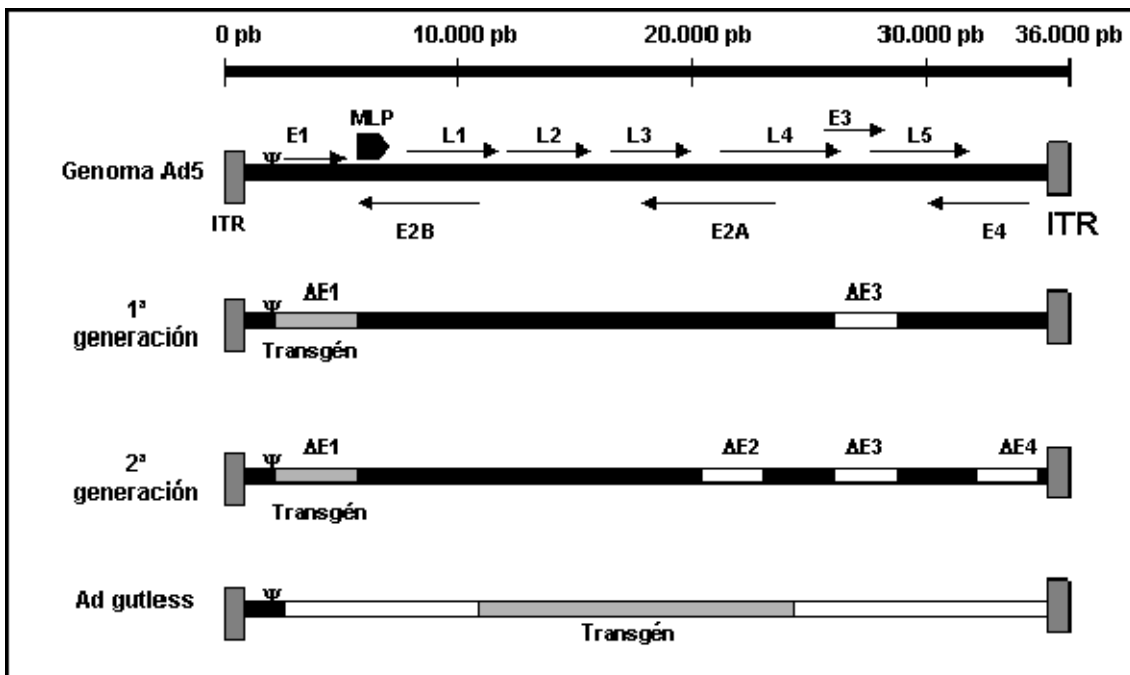


Figura 7. Mapa del genoma de Ad serotipo 5 (en la parte superior) con las diferentes generaciones de vectores adenovirales. Las regiones *early* están representadas por las zonas E1-E4 y las regiones *late* por L1-L5. MLP: *Major Late Promoter*. Ψ: Señal de empaquetamiento. Adaptado de [182].

4.2. ADENOVIRUS DE 2ª GENERACIÓN

La respuesta inmune contra el Ad impide su utilización para el tratamiento de enfermedades genéticas crónicas. Para evitar los inconvenientes de la respuesta inmune, se combinaron diferentes eliminaciones de regiones *early* (E1 y/o E3) conjuntamente con la eliminación de las regiones *early* E2 [183, 184] y E4 [181, 185, 186] con lo que disminuía la expresión residual de proteínas virales [181, 187-191].

Como consecuencia de la eliminación de más regiones *early*, se aumentó la capacidad del Ad hasta 14 Kpb [188, 189]. Los vectores deficientes para la región E2 no pueden replicar ya que en esta zona se encuentran las proteínas de replicación del Ad (DBP, AdPol y TP). Los resultados obtenidos con los vectores de 2ª generación que carecen de la región E4 son menos claros ya que los autores han publicado diferentes resultados en cuanto a la toxicidad, respuesta inmune del virus y la duración del transgén [192, 193].

La propagación de vectores de 2ª generación, carentes en varios genes *early*, requirió la generación de nuevas líneas celulares capaces de aportar *in trans* los genes necesarios para la replicación viral [184, 194-196]. Aunque se generaron grandes expectativas con estos vectores, su aplicación *in vivo* continuó aportando los mismos inconvenientes asociados a los Ad de 1ª generación [167, 186].

4.3. LA RESPUESTA INMUNE INDUCIDA POR EL ADENOVIRUS

4.3.1. Respuesta inmune pre-existente

El Ad2/5 es un virus muy común en la población humana ya que tiene una incidencia importante en resfriados comunes y en conjuntivitis [40]. Debido a ello, en el 90% de la población humana existe una respuesta inmune humoral previa contra las proteínas virales de la cápside [197]. Asimismo, la administración de vectores adenovirales de primera generación, en protocolos de terapia génica, ha comportado la eliminación de la expresión del gen terapéutico a las 2-3 semanas tras la administración del vector [187, 198-200]. Para evitar la respuesta inmune pre-existente, las estrategias actuales se basan en el uso de diferentes serotipos de Ad [201] o en el uso Ad no humanos [202].

Además de la respuesta inmune pre-existente, la respuesta inmune provocada por el Ad se divide en 3 clases: a) respuesta inmune innata [203] b) respuesta inmune humoral y c) respuesta inmune celular [197].

II. Introducción

4.3.2. Respuesta inmune innata

Una vez que el Ad entra en el organismo, se activa la respuesta inmune innata [198, 203]. Este sistema se compone de un conjunto constitutivo e inducible de elementos (como defensinas, proteasas, factores coagulantes, citoquinas y el complemento entre otros) incluyendo barreras físicas y químicas [203]. Esta respuesta activa genes inflamatorios y recluta macrófagos, neutrófilos y células NK (*Natural Killer*), los cuales eliminan el 80-90% del virus en las primeras 24 horas [204]. La respuesta inflamatoria es claramente dosis-dependiente y ocurre independientemente de la transcripción viral de genes [205]. El Ad induce la expresión de un gran número de genes inflamatorios como TNF- α , IL-6, IL-1 β , IFN- γ y IL-12, entre otros [198, 206]. Además, la ingestión del Ad por macrófagos y/o células de Kupffer provoca una activación de señales inflamatorias, lo que extiende la señal de daño tisular y efecto sistémico [207, 208].

Una de las funciones más importantes del sistema inmune innato es el reconocimiento de patrones a través de un gran número de receptores tanto a nivel intracelular como extracelular [209]. La familia de receptores más estudiada es la correspondiente a los receptores “*Toll-like*” (TLR) [210]. La unión del virus con estos receptores TLR dispara una cascada de eventos que limita y erradica la infección viral [211, 212]. De los diferentes TLRs (10 tipos), el TLR9 reconoce específicamente ADN de doble cadena ajeno como es el caso del genoma adenoviral [213].

4.3.3. Respuesta inmune celular

La respuesta inmune celular aparece entre los 4 y 7 días después de la entrada del Ad en el organismo (figura 8). Esta respuesta se activa cuando las CPA (Células Presentadoras de Antígeno) captan partículas de Ad, y las procesan en pequeños péptidos o proteínas del virión que posteriormente serán presentados en su membrana celular vía MHC-I (*Major Histocompatibility Complex I*) [197]. Posteriormente, las células T CD8⁺ se unen a estos péptidos y se activan transformándose en CTL (Linfocitos T citotóxicos). Estos últimos eliminarán las células que contengan en su superficie los péptidos del Ad presentados [214] y con ello pondrán fin a la expresión del transgén de interés.

La unión entre MHC-I y el linfocito T $CD8^+$ está mediada por la interacción entre la molécula $CD28$ (del linfocito T $CD8^+$) y $B7$ (de la CPA) [215]. Conjuntamente, se activan las células T *helper* $CD4^+$ (*helper* 1), las cuales secretan IL-2 (interleuquina 2) e $INF-\gamma$ (interferón gamma) que diferenciarán las células T $CD8^+$ en linfocitos T citotóxicos [216]. A diferencia de las $CD8^+$, estas células reconocen epítomos del virión presentados mediante el MHC-II en la superficie de las CPA.

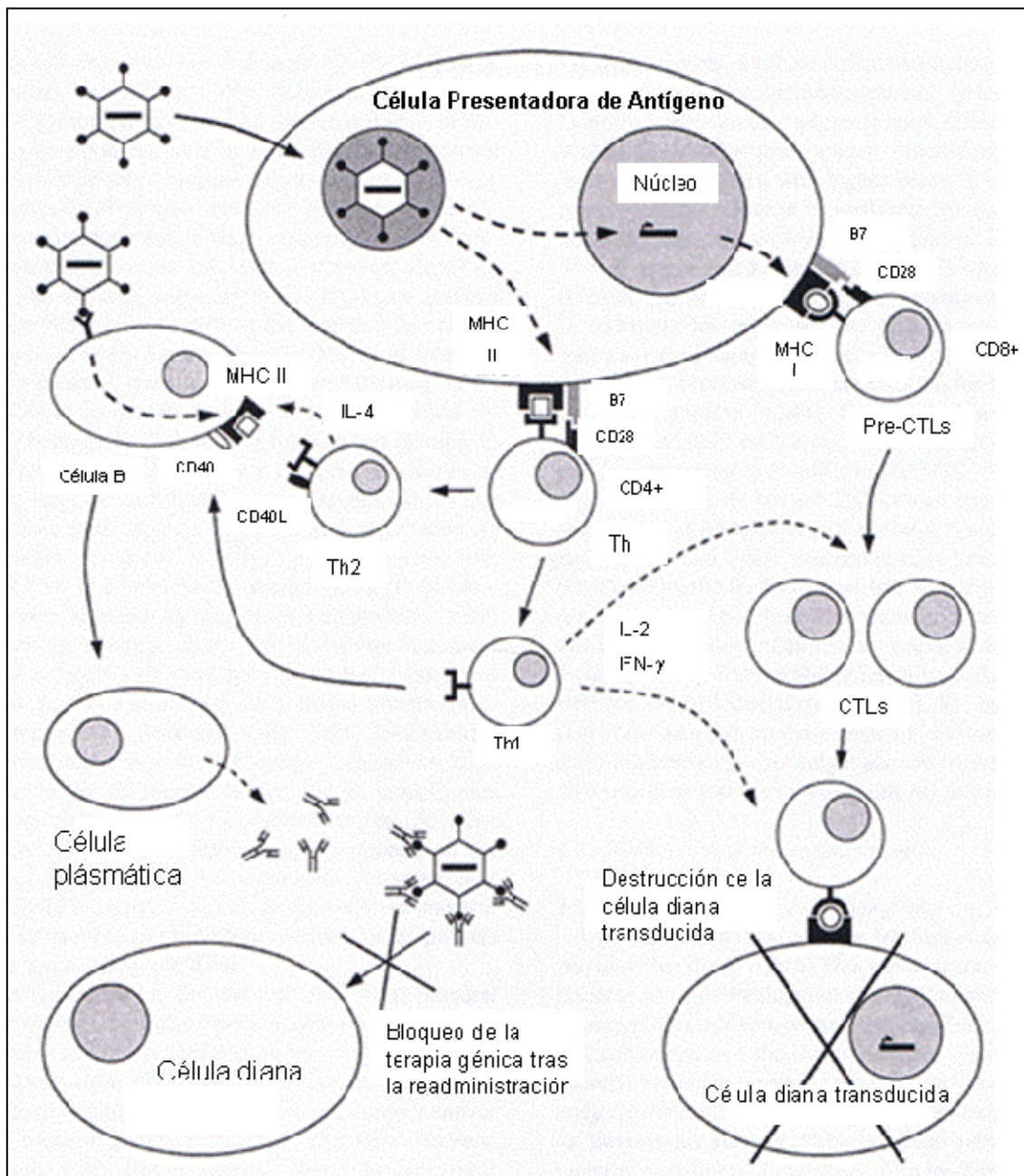


Figura 8. Esquema de la activación de la respuesta inmune provocada por el Adenovirus. Adaptado de [197].

II. Introducción

Los Ad pueden combatir la respuesta inmune celular gracias al gen E3-gp19K, que retiene los antígenos del MHC en el retículo endoplasmático evitando, de esta manera, el proceso de reconocimiento [217]. Además, los productos del gen E4 del Ad inhiben la respuesta citolítica de los CTL [218].

4.3.4. Respuesta inmune humoral contra el Ad

La respuesta inmune humoral se inicia cuando el Ad se une a las inmunoglobulinas de membrana de la célula B [197]. Posteriormente, se presentan péptidos del Ad por vía MHC-II a las células T *helper* Th2 CD4⁺ que producen citoquinas como la IL-4, IL-5, IL-6 y IL-10, las cuales harán diferenciar la célula B en una célula plasmática que generará anticuerpos (Ab) específicos contra la cápside del Ad [219]. Estos Ab dificultan posteriores readministraciones del vector. Una vez el genoma adenoviral ha entrado en la célula diana, los anticuerpos no pueden eliminar la célula transducida y el genoma puede persistir dentro de la célula si sus proteínas no son presentadas en membrana por el sistema MHC-I [199].

La respuesta inmune humoral está especializada en reconocer al virus gracias a los Ab y eliminarlo gracias a la acción de los macrófagos. Por esta razón, la administración repetida de vectores adenovirales requiere la inmunodepresión del individuo para mantener la expresión del transgén [178, 220]. Este hecho es cierto siempre y cuando la dosis administrada del Ad sea lo suficientemente alta, ya que dosis bajas del vector permiten administrar una dosis de tolerancia, con lo que no se activa la respuesta inmune.

4.3.5. Respuesta inmune contra el gen terapéutico

Una vez el vector Ad ha superado todas barreras físicas y los componentes del sistema inmune humoral y celular, el vector adenoviral puede expresar el transgén incorporado en su genoma de forma prolongada. De esta manera, el paciente adquiere la expresión del gen deseado y los efectos de su enfermedad pueden ser paliados. Sin embargo, si es la primera vez que se expresa en el organismo, el sistema inmune puede reconocer la nueva proteína como un agente extraño. De esta manera, la proteína puede generar anticuerpos, ser neutralizada por el sistema inmune y perder el efecto

terapéutico deseado [221, 222]. Para evitar los posibles efectos secundarios debidos a la expresión del transgén en todos los tejidos infectados por el Ad, es aconsejable el uso de promotores específicos que expresen el gen de interés únicamente en el órgano o célula diana. De esta manera, se ha descrito que aumenta la duración de la expresión del transgén [223, 224].

4.4. ADENOVIRUS DE 3ª GENERACIÓN, GUTLESS O ADENOVIRUS HELPER DEPENDIENTES

Para evitar los problemas de inmunogenicidad provocados por el Ad, se han generado los Ad de 3ª generación también llamados *gutless*, *helper* dependientes (HD-Ad), o de alta capacidad (HC/Ad *High-Capacity*/Ad) [225-231]. Este vector ha tenido nombres muy diversos en función de las propiedades de su genoma o sus características de amplificación. La razón por la cual se llaman *gutless* es porque se han eliminado todas sus regiones virales codificantes; *helper* dependientes, porque dependen de un Ad *helper* para poder producirse; y *High-Capacity* porque admiten insertos de hasta 36 Kpb.

Los Ad *gutless* mantienen únicamente los extremos ITR (5' y 3') de su genoma y la señal de empaquetamiento (Ψ), que es esencial para el ensamblaje final del virión (figura 7). Además del gen (marcador o terapéutico), se utiliza un ADN de relleno (ADN *stuffer*) para completar las 36 Kpb necesarias del genoma adenoviral [163]. Al no contener ninguna región viral codificante, el Ad *gutless* no puede producirse por si solo y necesita de la ayuda de un Ad *helper* que le aporte "*in trans*" las proteínas adenovirales necesarias para su producción [229]. Para evitar la propagación del Ad *helper* que contamina las preparaciones de Ad *gutless*, se utilizan diferentes estrategias que reducen la capacidad de empaquetamiento del Ad *helper* frente al Ad *gutless*. Gracias a la ausencia de genes virales, el Ad *gutless* evita la respuesta inmune celular, con lo que se aumentan los niveles y tiempo de expresión del transgén [232-242].

4.4.1. ADN de relleno (ADN *stuffer*)

La cápside del Ad puede albergar un tamaño de genoma entre el 75-105% del genoma salvaje [162, 201, 225, 230, 243]. Debido a la eliminación de toda

II. Introducción

región viral codificante, es necesario añadir ADN de relleno con el que sustituir las 36 Kpb eliminadas. De este modo, se debe utilizar un ADN *stuffer* que, junto al gen de interés, alcance una capacidad de entre 27.5 y 37.8 Kpb [163]. Inicialmente, se pensó que lo único importante del ADN que se utilizaba como relleno, era el tamaño adecuado para un correcto empaquetamiento. Por ello, los primeros ADN de relleno fueron escogidos de fuentes de ADN fáciles de obtener, como es el caso del bacteriófago lambda, levadura, bacteria y ADN no humano, en general [163].

Sin embargo, el ADN *stuffer* juega un papel muy importante en la estabilidad del Ad *gutless in vivo* [244]. Las primeras administraciones de Ad *gutless in vivo* con ADN *stuffer* proveniente de bacteriófago lambda resultaron en una fuerte respuesta inmune contra la célula transducida [201, 232]. Esto era debido a que pequeños péptidos generados por el ADN *stuffer* (bacteriófago lambda) eran procesados y presentados en la membrana celular, con lo que se inducía una respuesta inmune celular mediada por CTL. Por ello, se empezó a utilizar ADN *stuffer* con secuencias intrónicas de genoma humano, que favorecían la persistencia del transgén *in vivo* [201]. Con este propósito, se han utilizado secuencias intrónicas del gen HPRT (*Hypoxanthine-guanine PhosphoRibosylTransferase*), el cual contiene regiones MAR (*Matrix Attachment Regions*), que aportan una mayor estabilidad al genoma adenoviral en la célula *in vivo*. Diferentes secuencias de otros *loci*, como es el caso del gen HSU (locus HSU71148), AFO (locus AF011889) y ER (región del receptor beta de estrógenos) se han utilizado con resultados similares o mejorados [244].

Sin embargo, no todas las secuencias intrónicas son apropiadas para formar parte del ADN *stuffer* del Ad *gutless*. Para escoger el ADN *stuffer*, el ADN candidato debería seguir las siguientes características: a) no contener regiones codificantes, b) no ser rico en regiones repetitivas (como es el caso de las regiones Alu), c) evitar regiones donde se dan, con mayor facilidad, procesos de recombinación, d) evitar regiones que puedan interferir con la expresión del transgén, e) evitar regiones inmunogénicas y f) elegir regiones que contengan, en la medida de lo posible, secuencias MAR que estabilizan el genoma

adenoviral en el núcleo y permiten la expresión del transgén durante largos periodos de tiempo [244].

4.4.2. Producción de Adenovirus *gutless*

Para amplificar el Ad *gutless* es recomendable el uso de una línea celular que pueda restringir el crecimiento del Ad *helper* respecto al Ad *gutless*. La separación de ambos vectores es imprescindible para obtener un vector sin contaminación de Ad *helper*. Las estrategias utilizadas para minimizar la contaminación por Ad *helper* han evolucionado en los últimos 10 años desde la separación física por centrifugación [225], el uso de recombinasas específicas que permitan eliminar la señal de empaquetamiento del Ad *helper* [229], hasta la mutación específica de la señal de empaquetamiento del Ad *helper* para reducir su ensamblaje [245-247].

La idea de producir Ad *gutless* surgió por primera vez gracias a estudios previos donde se produjeron Ad híbridos con parte de genoma adenoviral y parte de genoma del virus SV40 (*Simian Virus 40*) [248]. Los genomas híbridos podían producirse gracias a la coinfección de un Ad salvaje, el cual aportaba todas las funciones requeridas para amplificar el vector híbrido. Gracias a estos estudios, se hipotetizó la posibilidad de producir Ad sin secuencias adenovirales expresando diferentes transgenes.

Inicialmente, se utilizó la centrifugación en gradiente de CsCl para la separación de los vectores adenovirales [225]. El Ad, *gutless* parcialmente, no contenía diversas regiones codificantes para varios genes (L1, L2, VAI+II y la pTP) y contenía un *cassette* de expresión para un gen marcador. El crecimiento del Ad salvaje permitía la propagación de ambos Ad, sin restricción de crecimiento para ninguno de ellos. Sin embargo, después de purificar ambos vectores, se detectaron niveles altos de contaminación del Ad salvaje y diversas recombinaciones entre ambos [225]. Aunque el primer sistema propuesto no resultó eficiente para una producción óptima de Ad *gutless*, este estudio dio paso a múltiples sistemas que permitieron la producción de Ad *gutless* con la idea de utilizar este vector en ensayos clínicos con humanos.

II. Introducción

Seguidamente, se propuso otro sistema para intentar evitar la propagación del *helper* con la máxima eficiencia de producción del Ad *gutless*. En este sistema se mutó la señal de empaquetamiento del Ad *helper* para evitar su producción. Gracias a este sistema y a la separación por CsCl, la contaminación de Ad *helper* fue del 1% [249]. Se ha descrito la existencia de *A-repeats* de mayor importancia en la señal de empaquetamiento y su mutación repercute directamente sobre la eficiencia de ensamblaje de la partícula viral [107]. De este modo, la señal Ψ puede ser modificada eliminando regiones específicas, para poder restringir el crecimiento del Ad *helper* durante la producción de Ad *gutless*. De forma similar, la modificación de la señal Ψ ha reducido considerablemente la contaminación de Ad *helper* en el caso de Ad *gutless* caninos [202, 247].

La señal de empaquetamiento juega un papel estructural en el cual intervienen diferentes proteínas con las que se acompaña la cadena de ADN a la cápside viral [55]. La modificación de dicha señal y su localización pueden hacer disminuir la capacidad del Ad para empaquetarse [103]. Una de las aproximaciones utilizadas para reducir aún más la contaminación de Ad *helper*, fue la reversión de la señal de empaquetamiento, ya que los genomas recombinados por Ψ , al ser mayores de 38 Kpb no pueden empaquetarse [250].

El sistema que ha aportado la mayor eficiencia para reducir la contaminación de Ad *helper*, consistió en la escisión específica de la señal de empaquetamiento por recombinasas. La señal Ψ se flanqueó por secuencias *loxP*, que eran reconocidas específicamente por la recombinasa Cre, la cual era expresada por la línea celular HEK293/Cre [229] (figura 9). Cuando ambos Ad, *helper* y *gutless* eran co-transfectados en esta línea celular, la recombinasa Cre escindía la señal Ψ del Ad *helper*, con lo que dicho genoma no podía empaquetarse (figura 9). Sin embargo, sí podía aportar *in trans* las proteínas necesarias para la producción del Ad *gutless*. La media de contaminación de

Ad *helper* variaba entre 0.1-10%, con lo que todavía era necesario reducir aún más dicha contaminación para un posible uso en clínica.

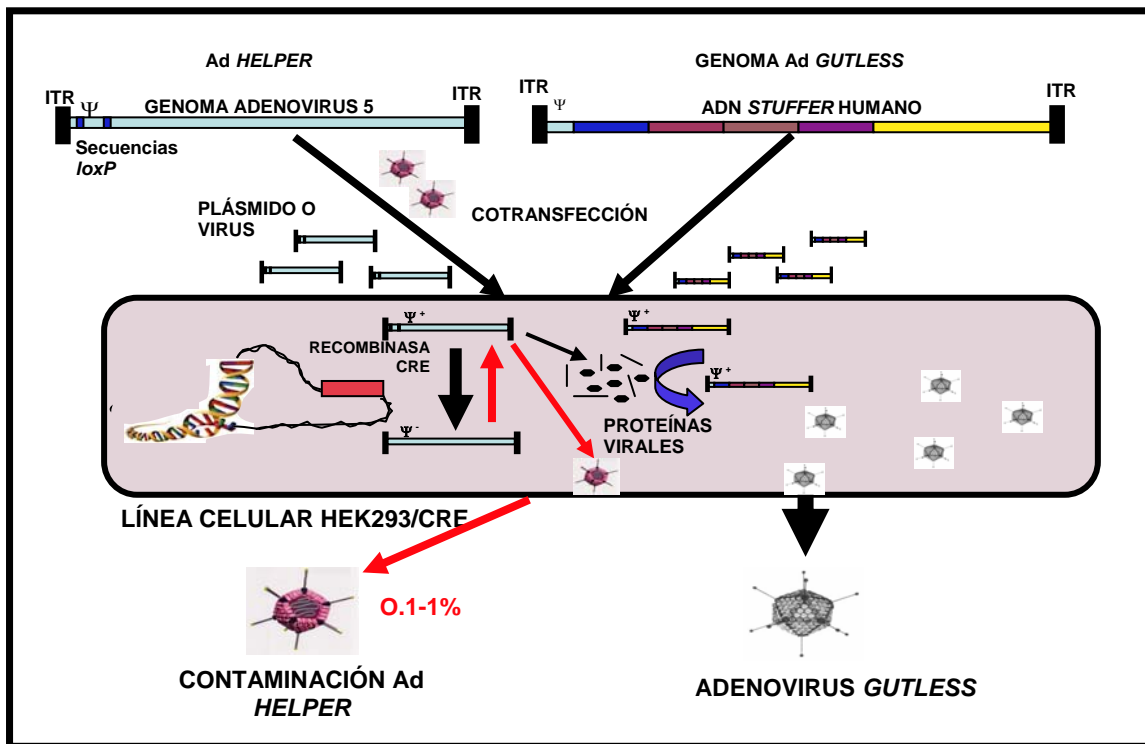


Figura 9. Generación de Ad *gutless* mediante el sistema Cre-loxP.

Aunque se han utilizado varios sistemas variando el genoma del Ad *gutless*, el Ad *helper*, la línea celular o el protocolo, ha sido difícil amplificar el Ad *gutless* hasta altos títulos con baja contaminación del Ad *helper*. De esta manera, habitualmente ha sido posible obtener bajas cantidades del vector para administrarlo a un número reducido de animales en experimentos *in vivo* o para ensayos con animales pequeños, como el caso del ratón.

Otro de los sistemas propuestos fue el uso un Ad *helper* mejorado con la señal de empaquetamiento invertida conjuntamente con el uso de protocolos más refinados para la producción a mayor escala con células en suspensión. El inconveniente de los bajos títulos de producción ha podido ser resuelto, en parte, gracias al uso de sistemas de células en suspensión donde se adaptó la célula HEK293/Cre al crecimiento en estas condiciones. Con este método se produjeron más de 10^{13} partículas virales a partir de 3 litros de cultivo en un tiempo de dos semanas. La productividad específica fue >10.000 partículas

II. Introducción

virales/célula con una contaminación del 0.4-0.1% de Ad *helper*. Después de centrifugar el virus en gradientes de cloruro de Cesio, la contaminación por Ad *helper* disminuyó hasta un 0.02-0.01% [245].

Con la misma finalidad, se ha utilizado la recombinasa FLPe, proveniente de levadura, que reconoce específicamente señales *frt*. Se generaron líneas celulares HEK293/FLPe y HEK293/CreFLPe [250, 251] junto con Ad *helper* cuya señal Ψ estaba flaqueada por secuencias *frt*. Las recombinasas Cre y FLPe tienen eficiencias de escisión similares. Sin embargo, el uso de la doble línea celular HEK293/CreFLPe no supuso ninguna ventaja en el aumento de la eliminación de la señal Ψ .

Otra de las aproximaciones utilizadas para reducir la contaminación de Ad *helper*, se basa en la selección por tamaño y estabilidad de Ad *helper* deficientes de proteína IX. La proteína IX parece tener un papel multifuncional en el ciclo del Ad [252]. A parte de jugar un papel estructural en la cápside del Ad, asociada a la proteína *hexon*, la proteína IX actúa como activador transcripcional y reorganiza proteínas celulares. Además, juega un papel importante en la estabilidad de genomas de alto peso molecular (35-37.5Kb) [252]. Gracias a estos estudios, se generaron Ad *helper* de alto peso molecular (>35 Kpb) y Ad *gutless* de bajo peso molecular (27-30 Kpb), los cuales podían crecer en líneas productoras de pIX (HEK293/pIX) sin restricción de tamaño [253]. Una vez producidos ambos Ad, en sucesivas amplificaciones, el Ad *helper* era eliminado en líneas HEK293/Cre(-pIX). Sorprendentemente los Ad *helper* podían empaquetarse en ausencia de la pIX, aunque eran incapaces de formar infecciones en placa, alcanzando niveles de contaminación del 0.2%, similares al sistema Cre-*loxP* [253].

También, se han utilizado virus alternativos que aportan *in trans* las proteínas necesarias para el empaquetamiento del Ad como es el caso del sistema de *herpes simplex virus-1* [254] y el baculovirus [255]. En el caso del amplicón de *herpes simplex virus-1*, la ventaja propuesta por los autores es la obtención de un Ad *gutless* libre de virus herpes gracias a la eliminación del amplicón por extracción con fenol o por su inactivación por calor. Sin embargo, este sistema

presenta baja eficiencia de producción y su escalado es técnicamente difícil [254]. En el caso del sistema del baculovirus, se generan virus recombinantes que contienen los genes adenovirales. De este modo, el baculovirus aporta las proteínas *in trans* permitiendo la propagación del Ad *gutless*. Este sistema aumenta hasta cien veces el título del vector en cada paso de amplificación. Sin embargo, el sistema con baculovirus genera altos porcentajes de partículas RCA, con lo que todavía se está mejorando para dar el paso a la producción a gran escala [255].

Además, también se ha propuesto el uso de líneas celulares que contengan toda la región viral codificante del Ad. Sin embargo, la toxicidad asociada a las proteínas virales no ha permitido generarlas aunque ya se ha generado una línea celular que contiene todos los genes *early* y vectores con estas regiones eliminadas [256].

Para que un sistema de producción de Ad *gutless* pueda ser utilizado a gran escala es necesario que permita producir altos títulos de Ad *gutless*, evitando el máximo de contaminación por Ad *helper* y la aparición de partículas RCA. Otra de las aproximaciones que también puede minimizar la contaminación por Ad *helper* es la elección de recombinasas unidireccionales que eviten la reincorporación de la señal de empaquetamiento en el genoma adenoviral. Con este fin, en este trabajo se ha propuesto el uso de la recombinasa unidireccional Φ C31.

4.4.3. El sistema Φ C31-*attB/attP*.

El sistema de producción de Ad *gutless* que ha reducido con mayor eficiencia la contaminación por Ad *helper* ha sido el sistema de la recombinasa *Cre-loxP*. Sin embargo, una de las limitaciones de los sistemas *Cre-loxP* o también, el sistema FLPe-*frt* es que presentan actividad bidireccional. En condiciones de alta concentración de enzima, la reacción de la recombinasa puede actuar escindiendo la señal de empaquetamiento o volviéndola a introducir por las mismas secuencias, con lo que es difícil reducir el nivel de la contaminación por Ad *helper* por debajo del 0.1% [229]. El uso de recombinasas unidireccionales,

II. Introducción

puede suponer una gran ventaja para ayudar a reducir estos niveles [33]. La recombinasa Φ C31, proveniente del bacteriófago *Streptomyces* Φ C31, es funcional tanto en células procariotas como en células de mamífero y humanas [30]. Reconoce específicamente secuencias llamadas *attB* y *attP*, las cuales son diferentes en cuanto a secuencia y número de nucleótidos. Al recombinar las secuencias *attB* y *attP* entre sí, la recombinasa Φ C31 genera 2 secuencias nuevas llamadas *attR* y *attL*. Estas nuevas secuencias, en células de mamífero, no son reconocidas por la recombinasa Φ C31, con lo que el sistema sólo puede actuar en una sola dirección. En presencia de factores específicos de recombinación en su huésped, la recombinasa Φ C31 sí puede utilizar las secuencias *attR* y *attL* para recombinar [33], pero al no estar presentes en el núcleo de las células de mamífero, el proceso no es factible [1].

Una de las aplicaciones de la recombinasa Φ C31 en terapia génica ha sido su uso como elemento integrativo de genes terapéuticos, de manera específica, ya que integra el transgén de elección en secuencias pseudo-*attP* del genoma humano. Sin embargo, recientemente se ha descrito que la integrasa Φ C31 induce aberraciones cromosómicas en fibroblastos primarios humanos [257, 258]. Aunque su uso en ensayos clínicos con humanos se ha parado debido a la toxicidad que presenta en células de mamífero, es de resaltar que su uso como sistema en la tecnología de producción de Ad *gutless* no es un inconveniente. Para resolver los problemas asociados a la inespecificidad de esta integrasa en células humanas, se ha propuesto el uso de una nueva integrasa modificada, más específica por la secuencia de interés y con menos efectos adversos [259, 260] o con más eficiencia para el genoma de ratón [261].

Uno de los puntos críticos para que un sistema de recombinasas pueda reprimir con alta eficiencia la producción de Ad *helper*, es poder mantener una alta expresión de la recombinasa a nivel nuclear. Sin embargo, los niveles de la recombinasa no deberían ser muy elevados ya que facilitaría la aparición de cortes en el ADN celular y la célula no sobreviviría. Por lo tanto, se ha de alcanzar un compromiso entre la actividad de la recombinasa y su posible

toxicidad celular. En este sentido, se han descrito líneas celulares estables que expresan niveles de Φ C31 elevados que además muestran niveles similares de actividad a la recombinasa Cre en células HEK293 (figura 10) [262]. Con ello, se ha pensado en la utilización de un sistema de producción de Ad *gutless* con Ad *helper* que lleven flanqueada su señal de empaquetamiento con señales *attB* y *attP* para ser producidos en líneas celulares HEK293/ Φ C31.

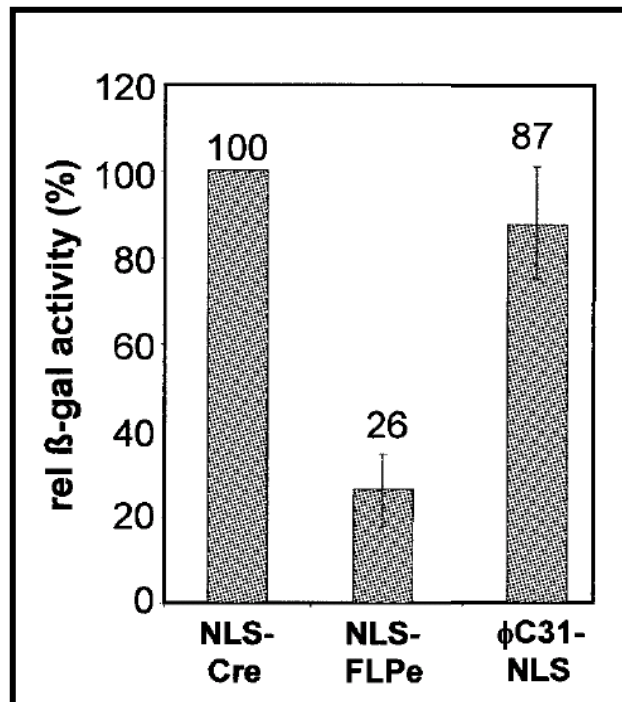


Figura 10. Comparación de la actividad de recombinación de Cre con otras recombinasas. Adaptado de Andreas y colaboradores [262].

4.4.4. Respuesta inmune contra el Ad *gutless*.

Diversos estudios *in vivo* realizados en ratón y primates, sugieren la posibilidad de que, en ausencia de respuesta inmune celular, el genoma adenoviral del vector *gutless* podría permanecer estable en el núcleo de la célula [171, 179, 201, 263] y de esta manera prolongar la expresión del transgén en comparación con los Ad de 1^a generación [201, 232, 233, 236, 264, 265]. Sin embargo, el Ad *gutless* no puede evitar la respuesta inmune humoral contra proteínas de la cápside.

Debido a que la respuesta inmune innata generada por los Ad *gutless* es la misma que la producida por Ad de 1^a generación [266], se están buscando

II. Introducción

nuevas estrategias para evitar esta respuesta. Con esta finalidad, recientemente se ha demostrado que el uso de poli-etilenglicol (PEG) reduce la respuesta inmune innata por parte del Ad [267, 268] puesto que permite reducir la captación del Ad por parte de las células de Kupffer y macrófagos *in vivo*, sin reducir la transducción de la partícula viral y de esta manera aumentar la biodistribución del vector [268].

Paradójicamente, se ha descrito que los Ad *gutless* son más eficientes que los Ad de 1ª generación en vacunación. Los Ad *gutless*, al inducir una menor respuesta inmune celular, proporcionan una mayor expresión del transgén contra el cual se quiere inmunizar [269]. Por ello, se han convertido en uno de los vectores de elección en el campo de la vacunación.

La naturaleza del transgén también influye de manera significativa en la duración de la expresión. Los genes completos se ha demostrado que permiten unos mayores niveles y tiempo de expresión respecto a los ADNc (copia) [108, 232]. Teniendo en consideración que los Ad *gutless* pueden albergar una capacidad de hasta 36 Kpb, facilitan la incorporación de genes completos y con ello, la expresión prolongada del gen de interés. Además, el uso de promotores constitutivos permite la expresión del transgén en células APC, lo que activa la respuesta inmune contra el gen terapéutico utilizado [201]. Por ello, el uso de promotores específicos puede ayudar a reducir la respuesta inmune contra el gen de interés.

4.4.5. Adenovirus *Gutless in vivo*.

Los Ad *gutless* han sido administrados *in vivo* a diferentes tejidos como hígado [239, 270], músculo [271], sistema nervioso central [238], retina [2], pulmón [272] y útero [273] en diferentes modelos animales como ratón, rata, perro y primates no humanos (babuinos). Inicialmente, el uso del Ad *gutless* en animales pequeños como el ratón dio buenos resultados ya que la expresión del transgén podía observarse durante toda la vida del animal [108, 232, 274]. Asimismo, en modelos animales más grandes, se ha descrito que el Ad *gutless* puede prolongar la expresión del transgén por más de un año en babuinos (figura 11), aunque el nivel de expresión va disminuyendo al cabo del tiempo

debido a la tasa de replicación celular y al recambio por nuevas células [201, 275].

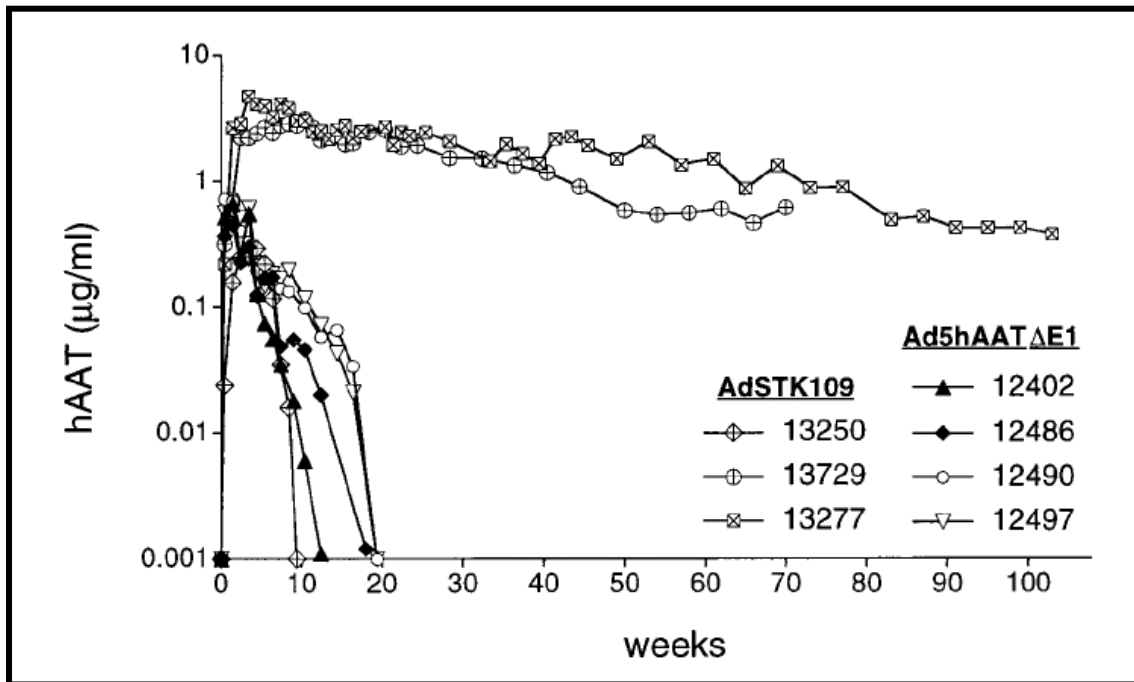


Figura 11. Expresión del gen hAAT tras la administración de un vector *gutless* en hígado. Adaptado de Morral y colaboradores [201].

Debido a que el Ad2/5, por vía sistémica, presenta una alta eficiencia de transfección por el hígado, la mayoría de estudios con Ad *gutless* han escogido el hígado como órgano diana, el cual es, además, un órgano muy atractivo para terapia génica debido a la estructura fenestrada de su endotelio, lo que permite que el Ad pueda contactar con las células del parénquima [276]. Aunque una parte importante de la carga viral administrada sistemáticamente puede llegar al hígado, los adenovirus pueden interaccionar también con células de la sangre, lo que inhibe la actividad infectiva del virus [277-279]. En hígado, los Ad *gutless* se han utilizado para tratar diferentes enfermedades como la hemofilia A, diabetes y deficiencia de OTC entre otras [233, 241, 257, 270, 280-282]. En todos los casos, los niveles de expresión y duración del transgén siempre fueron superiores en comparación a los Ad de 1ª generación.

El sistema nervioso central (SNC) es también un órgano muy atractivo para estudios con Ad *gutless*, ya que las neuronas no se replican, y por esta razón,

II. Introducción

si se transfectan neuronas *in vivo*, la expresión del transgén podría mantenerse durante largos periodos de tiempo, incluso toda la vida del animal. La administración requiere romper la barrera hemato-encefálica, con lo que el vector no se debería readministrar. A pesar de la inmunoprotección del SNC, los Ad de 1ª generación sólo mantienen la expresión del transgén 2 meses después de su administración [238]. Sin embargo, el uso del vector *gutless* mejora la persistencia del transgén hasta un año [247]. Es necesario destacar que los Ad caninos de serotipo 2 (CAV-2) tienen un tropismo claramente neuronal, ya que pueden infectar específicamente neuronas y permiten transporte axonal retrógrado. Además, infectan pocas células de la glia y oligodendrocitos [283], por lo que los vectores *gutless* CAV-2 son buenos candidatos para SNC y para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

El músculo es también uno de los tejidos más interesantes de tratar en estudios con Ad *gutless* ya que comprende un 40% de la masa total del cuerpo, está altamente vascularizado y además, las fibras esqueléticas pueden ser transducidas *in vivo*. Las miofibras presentan una duplicación celular lenta, lo que garantiza una expresión estable en el tiempo. Concretamente, la enfermedad de elección para estudios con Ad *gutless* es la Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) [240, 284]. Esta enfermedad se caracteriza por la deficiencia de distrofina, la que induce una inestabilidad en la membrana de las células y la degeneración de las fibras musculares. El ADNc de la distrofina tiene 14 Kpb, por ello ha sido inviable su uso en Ad de 1ª generación debido a su gran tamaño. Sin embargo, los Ad *gutless* han permitido la clonación de hasta dos copias del ADNc del gen de la distrofina humana en el genoma del Ad *gutless* [271], permitiendo una expresión prolongada de hasta 6 meses. Aunque la expresión del transgén fue prolongada, los niveles disminuyeron en un 51% al final del experimento. Se especula que la expresión del cDNA humano resultó en una respuesta inmune contra el transgén debido a la expresión constitutiva del promotor. Sin embargo, cuando el vector se administró en ratones inmunodeficientes SCID no se observó tal respuesta y prolongó la expresión del transgén [285]. En un estudio similar, Dudley y

colaboradores pudieron obtener expresión del transgén durante un año con una significativa mejora de la resistencia de las fibras [240].

En resumen, los Ad *gutless* ofrecen un gran número de ventajas como vectores de terapia génica *in vivo* frente a los Ad de 1ª y 2ª generación. La ausencia de genes virales reduce considerablemente la respuesta inmune que provocan y permiten reducir la dosis administración. Su gran capacidad permite la clonación de genes de hasta 36 Kpb. Son virus no integrativos, con lo que se evita la mutagénesis insercional y pueden permanecer episomales expresando el transgén durante largos periodos de tiempo. Sin embargo, si bien tienen un elevado número de ventajas, su uso en ensayos clínicos con humanos todavía es cuestionable porque aún no se ha desarrollado un sistema eficiente para su producción a gran escala con niveles bajos de contaminación con Ad *helper*.

III. OBJETIVOS

En este trabajo se ha desarrollado una nueva tecnología para la producción de *Ad gutless* basada en el uso de las recombinasas Cre y Φ C31. Para ello, se han planteado los siguientes objetivos:

1.- Generación de una familia de *Ad helper* flanqueando su señal de empaquetamiento por secuencias de recombinación para las recombinasas Cre y Φ C31.

2.- Caracterización de los vectores adenovirales *helper* generados.

3.- Estudio de los mecanismos implicados en el empaquetamiento diferencial de los *Ad helper-attB/attP* respecto a un *Ad* control de 1ª generación.

4.- Generación de nuevas líneas celulares con las recombinasas Cre y Φ C31.

5.- Optimización de la producción de *Ad gutless* con los *Ad helper-attB/attP*.

6.- Análisis de la inversión de la señal de empaquetamiento para reducir la recombinación entre *Ad helper* y *Ad gutless*.

IV. RESULTADOS

Para la realización de este trabajo ha sido necesario la generación *de novo* de toda una batería de herramientas para la producción de Ad *gutless*. En primer lugar, se ha generado una familia de Ad *helper* flanqueando su señal de empaquetamiento por secuencias de recombinación para Φ C31 y Cre. A continuación, se ha caracterizado la naturaleza de los Ad *helper* generados tanto a nivel de ciclo viral, producción viral, cinética de replicación, cinética de producción de proteínas, maduración viral y capacidad infectiva. Además, se han generado nuevas líneas celulares con las recombinasas Cre y Φ C31 con las que se puede trabajar en la producción de Ad *gutless* y así evitar al máximo la contaminación por Ad *helper*. Finalmente, se han caracterizado y optimizado cada uno de los pasos del proceso de amplificación de un Ad *gutless*, lo que ha permitido realizar un proceso de producción utilizando dos líneas celulares distintas. Sin embargo, debido a la aparición de niveles elevados de partículas *helper* contaminantes a causa de la recombinación entre Ad *gutless* y Ad *helper* a través de la señal Ψ , se ha construido un nuevo Ad con la señal Ψ invertida y demostrado que evita la recombinación entre el Ad *gutless* y Ad *helper* permitiendo así la producción de los Ad *gutless* libres de Ad *helper*.

1. Construcción de los genomas adenovirales *helper* y Ad controles

Para la generación de los Ad *helper* y Ad controles nos basamos en el genoma adenoviral de serotipo 5 (Ad5), flanqueando su señal de empaquetamiento con diferentes combinaciones de secuencias de recombinación para las recombinasas Cre (*loxP*) y Φ C31 (*attB/attP*). El genoma adenoviral Ad5 está clonado en el plásmido pKP1.4 que contiene toda la región viral codificante con la excepción de parte de la región E1 y parte de la región E3. Asimismo, como plásmido lanzadera, se ha utilizado el plásmido pTG-6600 que contiene los 4262 nucleótidos iniciales del plásmido pKP1.4.

- Para eliminar la región de clonación múltiple (MCS) del plásmido pTG-6600, éste se digirió con los enzimas *EcoRI* y *MfeI* generando 3

IV. Resultados

fragmentos de 5310, 616 y 183 pb. Los fragmentos de 5310 y 616 pb fueron religados para generar el plásmido pTG-6600 Δ CMV.

- El plásmido pBCPB⁺ fue digerido por *SpeI* para obtener la secuencia de recombinación *attP* (221 nucleótidos). La banda de 221 pb fue clonada en el plásmido pTG-6600 Δ CMV digerido por *SpeI* para generar el plásmido pTG-6600 Δ CMV*attP*.
- Los plásmidos pKS-RSV/GFP y pTG-6600 Δ CMV*attP* fueron digeridos por las dianas *SalI* y *SpeI* y la banda de GFP fue ligada al plásmido pTG-6600 Δ CMV*attP* para generar el plásmido pRAF2.1 (pTG-6600 Δ CMVGFP*attP*).
- A continuación, se realizó mutagénesis dirigida contra la diana *SgrAI* en la posición 189 del Ad, ya que el enzima *SgrAI* tiene una alta actividad estrella. La mutagénesis dirigida se realizó con los cebadores MutDIR*Agel* y MutREV*Agel* para introducir la diana *Agel* y generar el plásmido pTG-6600(*Agel*) Δ CMVGFP*attP*.
- Las secuencias de recombinación *attB+loxP* fueron clonadas en el vector pGEMT-easy para generar el plásmido pGEMT-*attBloxP* utilizando los cebadores *attBloxP*-DIR y *attBloxP*-REV. Los plásmidos pGEMT-*attBloxP* y pTG-6600(*Agel*) Δ CMVGFP*attP* fueron digeridos por la diana *Agel* y posteriormente, la banda de 140 pb fue clonada en *Agel* para generar el vector pRAF5.1.
- A continuación, el plásmido pRAF5.1 fue digerido por la diana *NotI* para eliminar la región *loxP*, y seguidamente religado para generar el plásmido pRAF1.2.

- La secuencia *loxP*+GFP fue amplificada utilizando los cebadores *loxPGFP*-DIR y *loxPGFP*-REV sobre el plásmido pKS-RSV/GFP. La banda amplificada se clonó en el plásmido pGEMT-easy para generar finalmente el plásmido pGEMT-GFP/*loxP*. El producto de PCR fue digerido por la diana *SaI* y clonado en el plásmido pRAF5.1 digerido por *SaI* y *XhoI* para generar el plásmido pRAF4.1.
- Asimismo, se realizó una nueva PCR con los cebadores *loxP*-GFP-DIR/*SpeI* y *loxP*-GFP-DIR/*SaI* utilizando el plásmido pGEMT-*loxPGFP* para amplificar una banda 1.7Kpb. Esta banda digerida por las dianas *SpeI* y *SaI* se clonó en el plásmido pRAF5.1 digerido por las dianas *SpeI* y *SaI* para generar finalmente el plásmido pRAF3.2.
- Para reducir la probabilidad de aparición de partículas RCA, se eliminó toda región viral codificante de la región E1 en los plásmidos pRAF1.2, pRAF4.1 y pRAF3.2. Para ello, se realizó mutagénesis dirigida contra la diana *AflI* del plásmido pTG-6600 en la posición 2016 para introducir la diana *XhoI* con los cebadores 6600*XhoI*DIR y 6600*XhoI*REV y así generar el plásmido pTG-6600/*XhoI*. El plásmido pTG-6600/*XhoI* se digirió por la diana *XhoI* para eliminar una banda de 486 pb y se religó para generar el plásmido pTG-6600 Δ E1.
- Los plásmidos pTG-6600 Δ E1, pRAF1.2 y pRAF3.2 fueron digeridos por las dianas *XhoI* y *PacI* para extraer una banda de 4101 pb del pTG-6600 Δ E1 y clonarla en la banda de aproximadamente 2.3-2.4 Kpb de los plásmidos pRAF1.2 y pRAF3.2 y de este modo, generar los plásmidos pRAF1.2 Δ E1 y pRAF3.2 Δ E1.
- A continuación, se realizó una PCR sobre el plásmido pKS-RSV/GFP, para amplificar el *cassette* de GFP con la secuencia *loxP* (1.7Kpb), con los cebadores *loxP*/GFP-DIR y *loxP*/GFP-REV. El plásmido pRAF5.1 se

IV. Resultados

digirió con *SalI* y *XhoI* y se ligó a la banda de PCR amplificada y digerida por *SalI* para generar el plásmido pRAF4.1ΔE1.

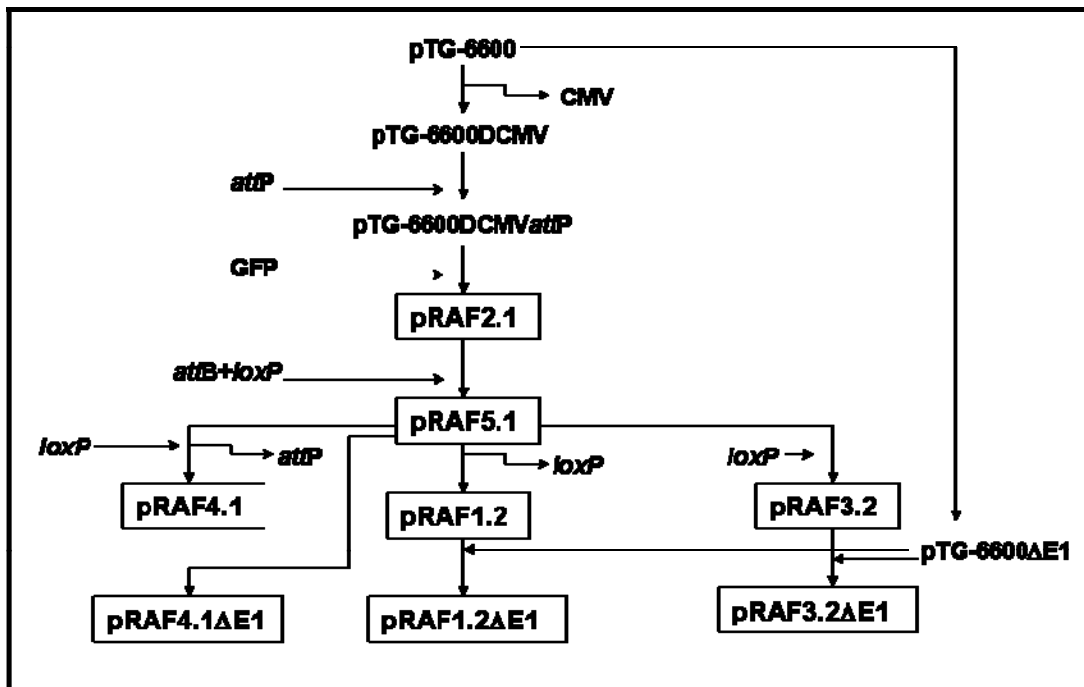


Figura 12. Esquema de construcción de los diferentes plásmidos lanzadera.

- Para generar un genoma adenovirus control con un *cassette* para RFP (proteína roja fluorescente; con localización mitocondrial), los plásmidos pDSRed2-Mito y pTG-6600 fueron digeridos por las dianas *SnaBI* y *EcoRI*. La banda de 1149 pb del plásmido pDRed2-Mito fue ligada a la banda de 5685 pb del plásmido pTG-6600 para generar el plásmido pTG-6600/RFP.

Previamente a la recombinación homóloga, el plásmido pKP1.4ΔCMV fue digerido por la diana *SwaI* y los plásmidos pRAF2.1, pRAF5.1, pRAF1.2 ΔE1, pRAF4.1 ΔE1, pRAF3.2 ΔE1 (figura 12) y pTG6600/RFP fueron digeridos por diferentes dianas exteriores a la zona de de incorporación (*Fspl*, *XmnI* y/o *Asel*). Al realizar la recombinación homóloga en células BJ5183, se generaron los siguientes genomas *helper* y controles: pAd5/*attP*, pAd5/*loxP*.FC31, pAd5/FC31, pAd5/*attB*.Cre, pAd5/FC31.Cre y pAd5/RFP (figura 13). Para descartar cualquier posible mutación, se secuenciaron todas las construcciones desde el ITR5' hasta el nucleótido 5788 del Ad5, que era el último nucleótido

posible que permitía la recombinación homóloga entre ambos plásmidos (Servicio de secuenciación de la Universidad Autónoma de Barcelona, Bellaterra, España).

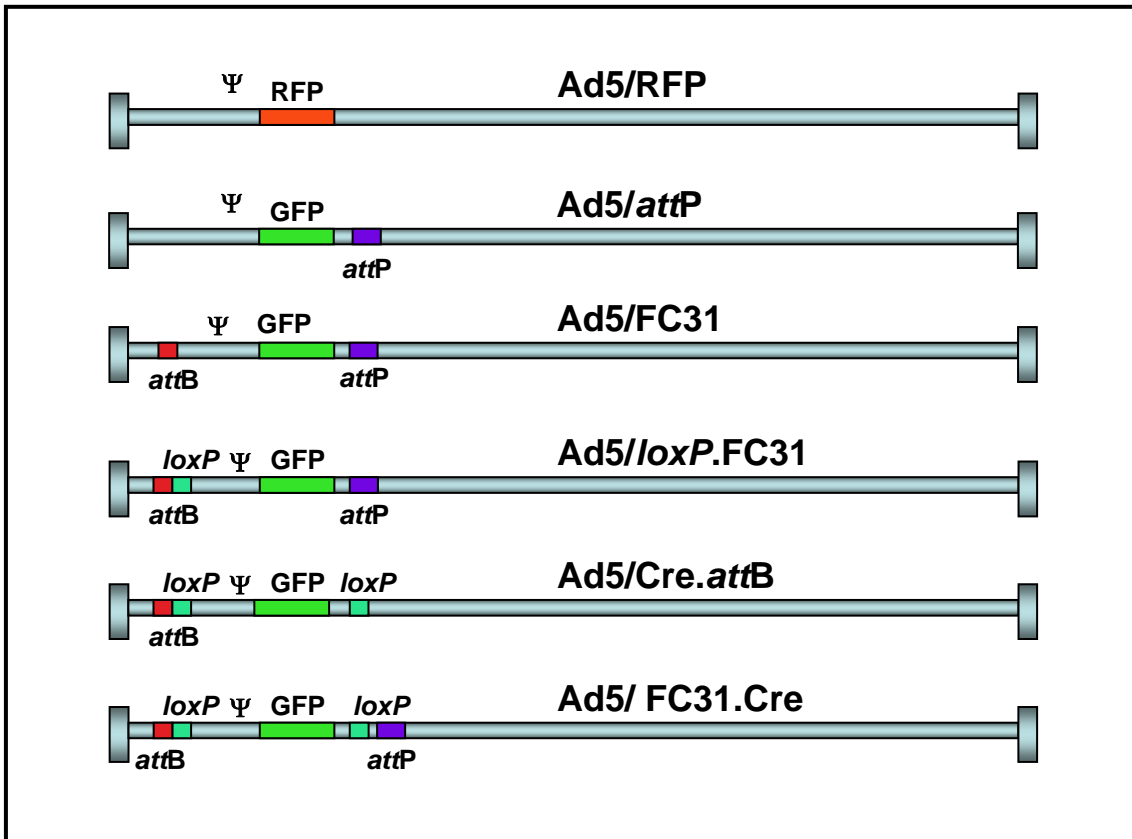


Figura 13. Esquema de las diferentes construcciones de genomas adenovirales *helper* y controles. Los gráficos no están a escala real.

2. Caracterización de los Ad *helper* generados

2.1 Análisis de la estabilidad de los genomas generados

Una vez generados los plásmidos de los diferentes vectores adenovirales, se analizó el patrón de bandas por diferentes dianas de restricción para el control de reorganizaciones génicas y asegurar la estabilidad del genoma adenoviral.

IV. Resultados

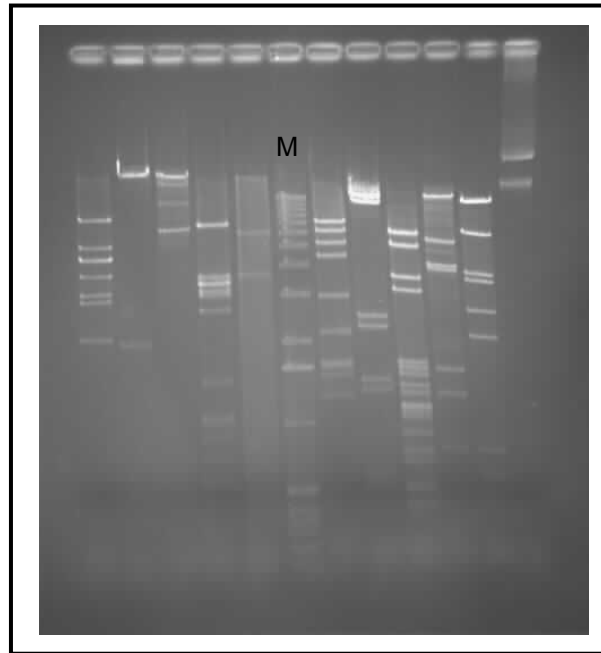


Figura 14. Patrón de digestión para diferentes enzimas de restricción del plásmido pAd5/FC31.Cre. De izquierda a derecha los enzimas de restricción utilizados fueron: *HindIII*, *PaeI*, *BamHI*, *PstI*, *EcoRI*, marcador 1Kb (M), *BglII*, *XhoI*, *PvuI*, *MfeI*, *Agel* y no digerido.

2.2 Amplificación del genoma adenoviral

Previamente a la producción del vector, se preparó el genoma adenoviral para su transfección en células HEK293. Los genomas adenovirales se abrieron por las dianas *PaeI* para eliminar el gen de resistencia a ampicilina y su origen de replicación y dejar libres los extremos ITR del Ad. A continuación, para amplificar el genoma viral, se transfectó el plásmido adenoviral con PEI (polietilenimina) en 1E6 células. A las 24 horas, se pudo observar la expresión del *cassette* de GFP o RFP por microscopía de fluorescencia.

2.3 Amplificación de genomas adenovirales control Ad5/attP y Ad5/RFP

A las 72 horas de la transfección, se recogieron las células + sobrenadante y se realizaron 3 ciclos de congelaciones/descongelaciones. Tras este primer paso, los siguientes ciclos de amplificación de los vectores Ad5/attP y Ad5/RFP fueron de 36 horas hasta alcanzar 20 placas de 15 cm en sucesivos pasos.

2.4 Amplificación de genomas adenovirales *helper*

En el caso de los Ad *helper*, tras las 72 horas de la transfección, no se observó amplificación del vector en el segundo paso de amplificación. El paso de transfección se repitió hasta 4 veces con el mismo resultado. Por esta razón, el

genoma adenoviral se amplificó hasta observar focos virales (efecto cometa). Tras 96 horas de transfección, se observó que los Ad podían generar nuevos viriones tras la aparición de focos virales como se observa en la figura 15. Posteriormente, tras diferentes pruebas de infección con los nuevos viriones generados, se observó que el ciclo adenoviral de los vectores *helper* era mayor a 36 horas y debía estar entre las 48-72 horas. Así, se amplificaron con ciclos de 72 horas hasta obtener 5 placas de 15 cm. De este modo, se pudo obtener una pequeña cantidad de virus, titularla y así, poder realizar diferentes experimentos y posteriormente, amplificarlos hasta obtener una preparación viral con títulos elevados.

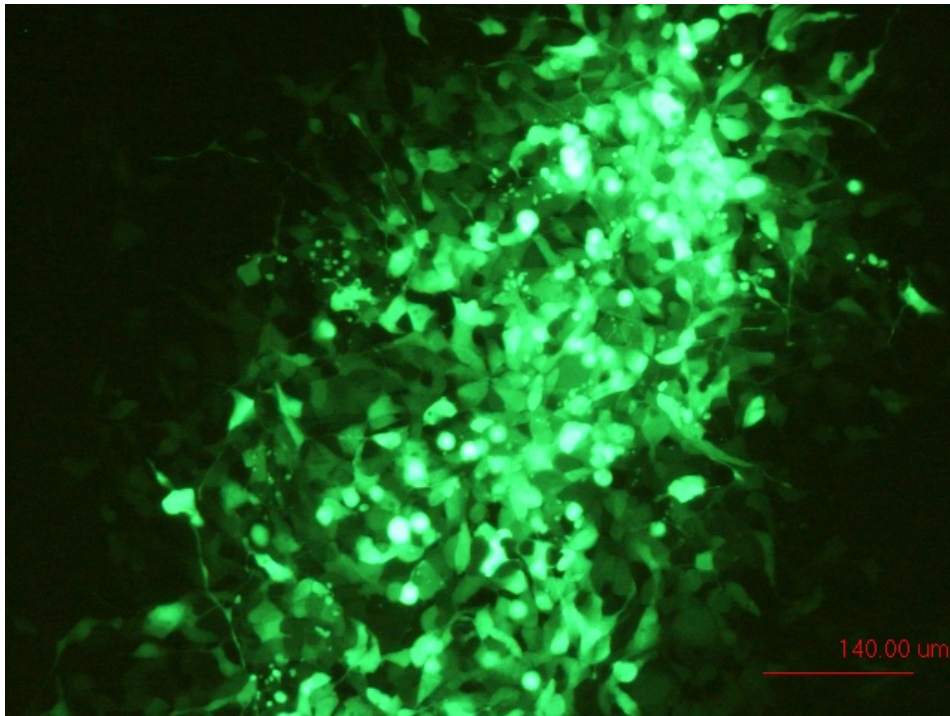


Figura 15. Foco viral o efecto cometa del vector viral Ad5//loxP.FC31.

2.5 Determinación del ciclo viral de los vectores *helper* y controles

Para producir los vectores Ad *helper* con títulos elevados era preciso conocer y determinar el intervalo de tiempo necesario para completar un ciclo vírico. Con este fin, se diseñó un experimento para determinar la producción de Ad cuantificando, a diferentes tiempos, los virus liberados al medio y los virus todavía en el interior de la célula. De este modo, se recogieron muestras cada 4 horas para observar la curva de producción del Ad en células HEK293.

IV. Resultados

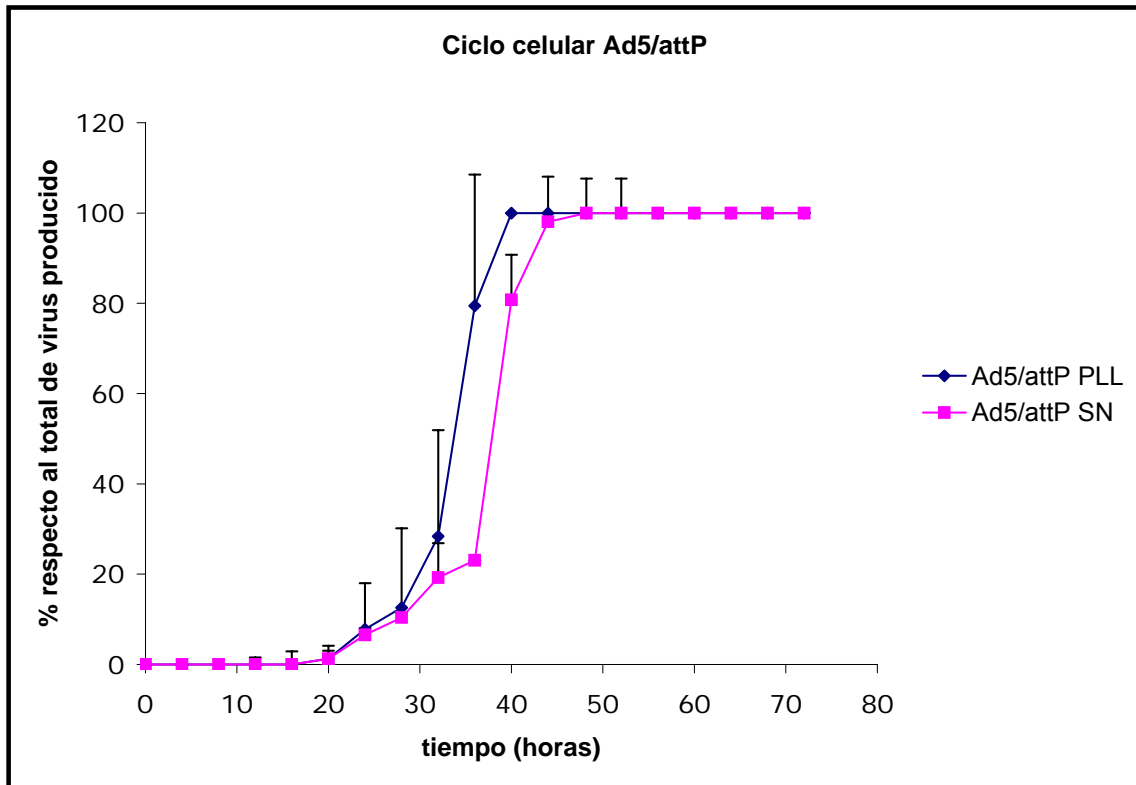


Figura 16a. Ciclo viral del Ad5/attP, mostrando virus obtenido de p ellet celular (PLL) y sobrenadante (SN). MOI=5, n=3.

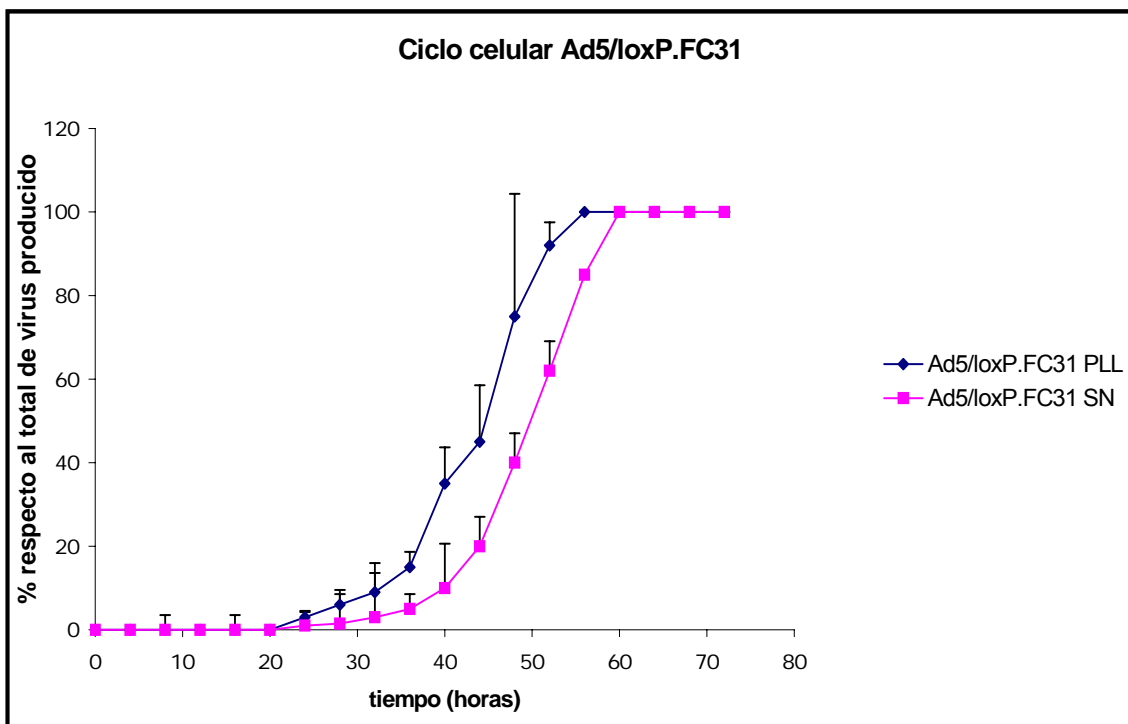


Figura 16b. Ciclo viral del Ad5/FC31.loxP, mostrando virus obtenido de p ellet celular (PLL) y sobrenadante (SN). MOI=5, n=3.

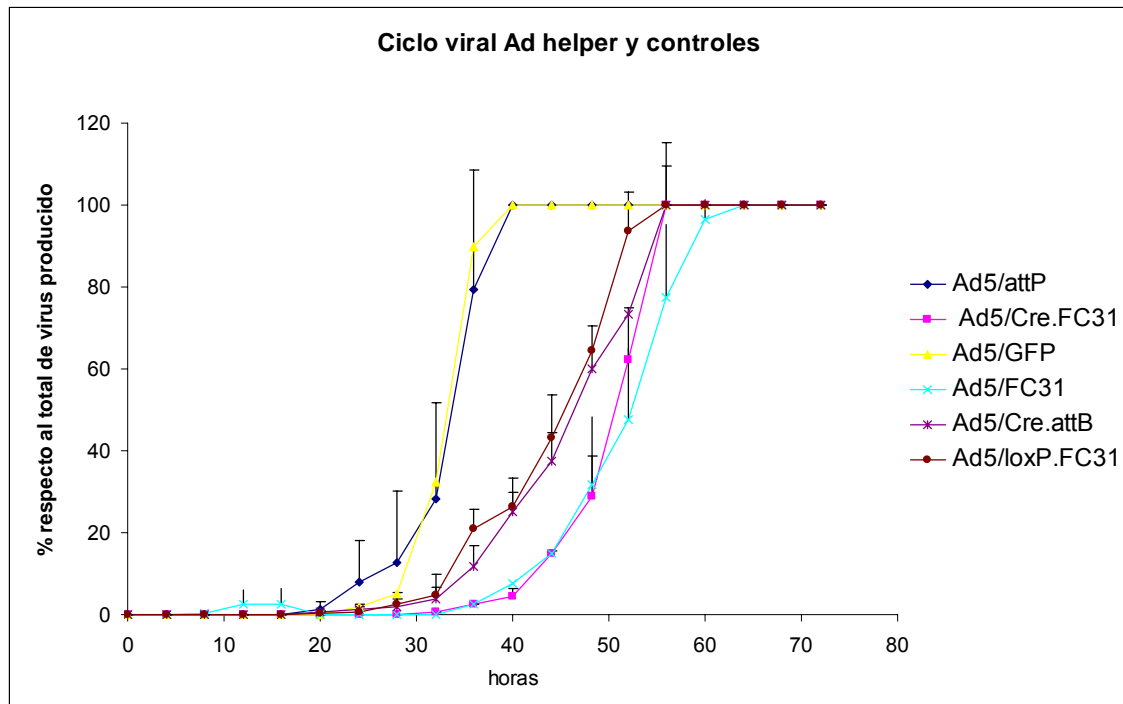


Figura 16c. Curvas de crecimiento de los diferentes vectores *helper* y controles. La cuantificación se ha realizado juntando virus tanto de pélet celular como de sobrenadante. MOI=5, n=3.

El virión maduro queda retenido dentro de la célula hasta la lisis final. Asimismo, cuando la célula lisa, libera partículas virales al medio y éstas vuelven a reinfectar las células colindantes. Por esta razón, definimos el final del ciclo viral como el tiempo al que el número de virus producidos alcanza un *plateau* después de un periodo de fase exponencial de amplificación de al menos 12 horas. El *plateau* es considerado cuando los valores no incrementan en comparación a los tiempos previos.

De este modo, podemos confirmar que los Ad controles muestran un ciclo viral de 36 horas, mientras que los Ad *helper* muestran un ciclo viral retrasado de hasta 56-60 horas (figura 16c). Gracias al conocimiento del tiempo del ciclo viral de los Ad *helper*, se modificaron, de forma adecuada, los protocolos de producción y se pudieron producir en altos títulos hasta una producción en 20 placas de 15 cm de células HEK293.

IV. Resultados

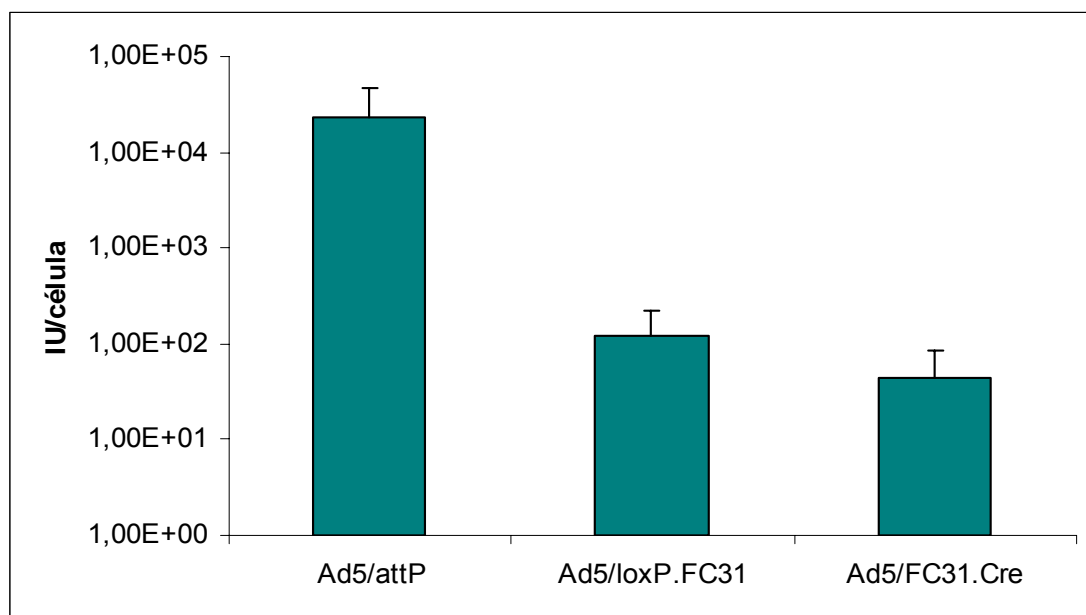
2.6 Titulación de los diferentes vectores adenovirales

Nombre	Título infeccioso (IU/mL)	Título físico (PP/mL)	Ratio PP:IU (PP/IU)	Tiempo de producción (horas)
Ad5/attP*	5.1E10	1.9E12	37.1	36
Ad5/RFP*	2.6E10	1.2E11	4.7	36
Ad5/FC31**	1.3E10	3.8E11	30.1	56
Ad5/loxP.FC31**	7.2E9	4.5E11	62.5	56
Ad5/Cre.attB**	2.6E10	5.9E11	23.0	56
Ad5/FC31.Cre**	5.0E9	4.3E11	86.8	56

Tabla 2. Título infeccioso y físico de los Ad *helper* y controles (*Ad control, **Ad *helper*).

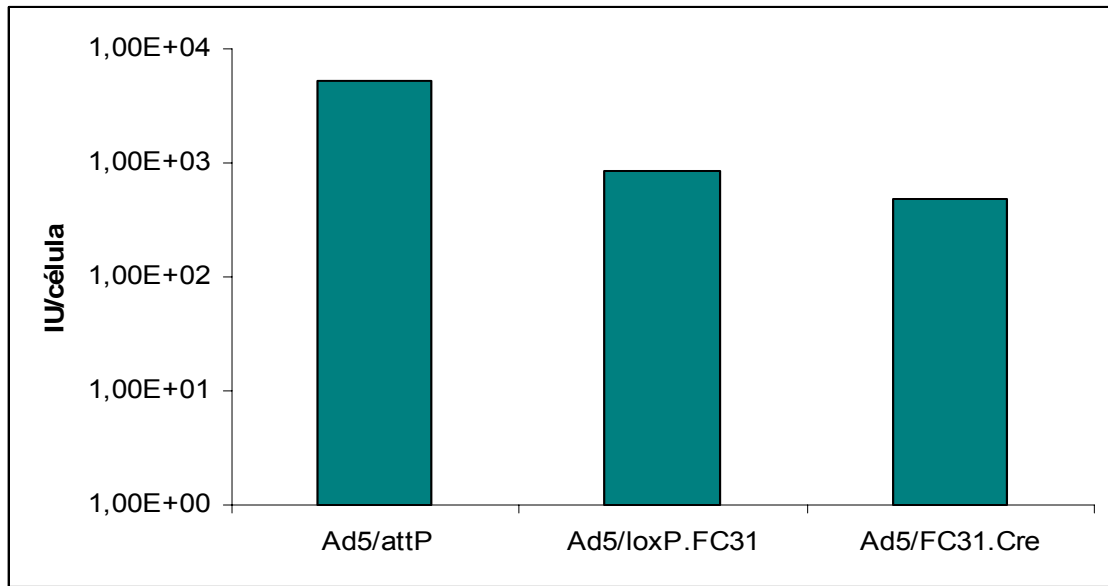
2.7 Producción de IU de Ad *helper* y controles a 36 y 56 horas

Una vez obtenidas las producciones de los diferentes vectores adenovirales, se pudieron realizar experimentos para comparar los niveles de producción a 36 horas (tiempo final para el Ad control) y 56 horas (tiempo final para los Ad *helper*). Para ello, se analizó el título infeccioso de las preparaciones en lisado crudo a las 36 horas y a partir de virus purificado a tiempo final de ciclo viral (36 o 56-60 horas).



IU/célula	23125,4	123,5	44,3
-----------	---------	-------	------

Figura 17a. Análisis del título infeccioso por célula a las 36 horas para los vectores Ad5/attP, Ad5/loxP.FC31 y Ad5/FC31.Cre en lisado crudo.



IU/célula (final de ciclo viral)	5333	866	466
IU totales preparaciones purificadas	16.0E10	2.6E10	1.4E10

Figura 17b. Análisis del título infeccioso por célula a tiempo final de ciclo viral para los vectores *Ad5/attP*, *Ad5/FC31.loxP* y *Ad5/FC31.Cre* a partir de virus purificado en CsCl.

Tal y como se observan en las figuras 17a y 17b, a las 36 horas, el Ad control *Ad5/attP* produjo del orden de 100 a 1000 veces más IU/célula que los Ad *helper*, tal y como habían predicho los estudios de ciclo viral. Sin embargo, a tiempo final de ciclo, 36 horas (*Ad5/attP*) ó 56-60 horas (*Ad5/loxP.FC31* y *Ad5/FC31.Cre*), los niveles de producción de los Ad *helper* se normalizaron hasta asemejarse a los niveles del Ad control *Ad5/attP*, siendo tan solo de 5 a 10 veces menores, lo que nos permitió producir los vectores *helper* con títulos razonablemente elevados.

2.8 Cinética de replicación del genoma adenoviral

Para descartar que la replicación del genoma del Ad *helper* estaba afectada, se diseñó un experimento para determinar la cantidad de ADN viral replicado a diferentes tiempos. De este modo, se analizó la replicación de ADN durante las últimas 12 horas de un ciclo normal (36 horas), infectando 1E6 células HEK293

IV. Resultados

con los adenovirus *Ad5/attP* y *ad5/loxP.FC31* (MOI=5 y n=3). Para detectar y cuantificar la cantidad de genoma viral replicado se utilizó la técnica de Dot Blot (figura 18a) extrayendo ADN de 1E5 células. La sonda utilizada (1597 pb) fue extraída por digestión del plásmido pKS/RSV-GFP por las dianas *SpeI* y *SalI*.

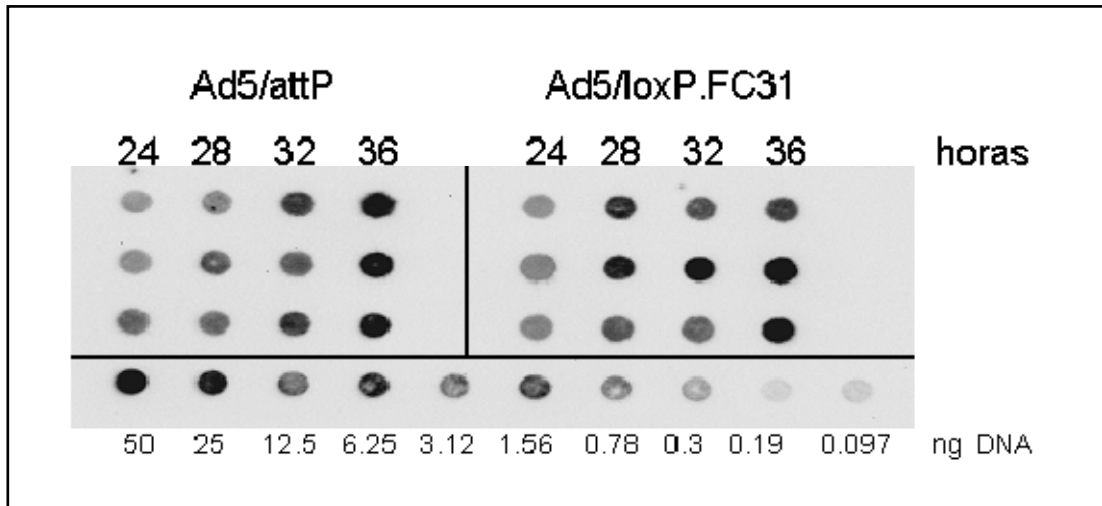


Figura 18a. Dot Blot para los vectores *Ad5/attP* y *Ad5/loxP.FC31* a las 24, 28, 32 y 36 horas tras su infección.

Vector viral	24 horas	28 horas	32 horas	36 horas
<i>Ad5/attP</i>	3,8	5,2	8,0	14,4
<i>Ad5/loxP.FC31</i>	4,3	8,7	10,1	14,1

Figura 18b. Nanogramos de genoma viral replicados de los vectores *Ad5/attP* (Ad control) y *Ad5/loxP.FC31* (Ad *helper*) a las 24, 28, 32 y 36 horas. Valores dados por el promedio de los 3 puntos analizados.

Tal y como se observa en la figura 18b, la cantidad de genoma viral replicado del Ad *helper* *Ad5/loxP.FC31* es similar al vector control *Ad5/attP* en todos los tiempos de estudio, confirmando que la cinética de replicación del ADN viral del Ad *helper* no está afectada.

2.9 Replicación vs Producción viral

Tras el ensayo de Dot Blot, se analizó la infectividad de las partículas virales producidas en el ensayo de replicación para comprobar si el genoma viral era empaquetado correctamente y así era capaz de generar nuevas partículas infecciosas. Para ello, se realizó una titulación por dilución límite en placa de 96 pozos para detectar el *cassette* de expresión de GFP por microscopía de fluorescencia.

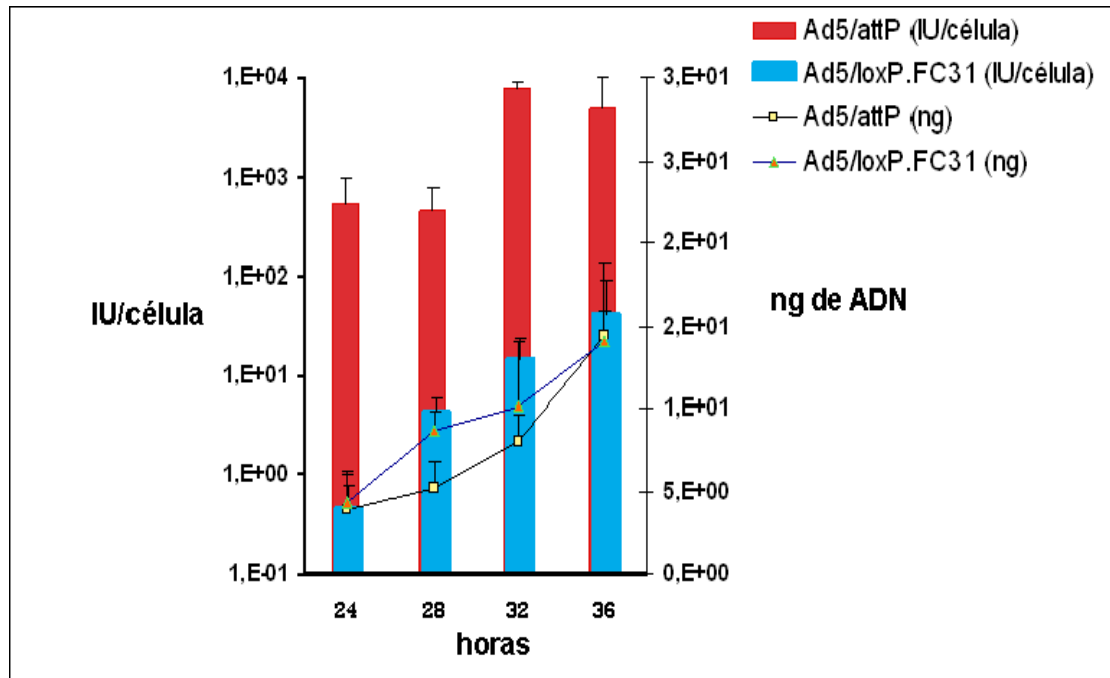


Figura 18c. Análisis comparativo entre el título infeccioso (en barras) y el nivel de ADN replicado (en líneas) de los vectores *Ad5/attP* y *Ad5/loxP.FC31* a 24, 28, 32 y 36 horas.

El ensayo de titulación nos muestra que, en todos los tiempos analizados, el adenovirus *helper* *Ad5/loxP.FC31* produce del orden de 2 a 3 logaritmos menos IU que el Ad control *Ad5/attP*, mientras que la replicación del ADN no se ve afectada en el proceso de ciclo viral (figura 18c). Estos resultados son consistentes con los obtenidos en los estudios de producción viral a las 36 horas mostrados anteriormente (figura 17a).

Aunque el genoma del Ad *helper* se replica correctamente, no puede producir cápsidas infecciosas eficientemente, lo que nos induce a pensar bien en un posible problema en la cinética de producción de proteínas o bien en el empaquetamiento y/o maduración del genoma adenoviral en la cápside.

2.10 Cinética de producción proteica de los Ad *helper* y Ad controles

Una de las principales funciones del Ad *helper* es el aporte de las proteínas virales para la replicación y empaquetamiento del Ad *gutless*. Sabiendo que el ciclo de los Ad *helper* se retrasa entre 14 y 24 horas, es relevante conocer si durante el proceso de ciclo viral, los Ad *helper* pueden aportar las proteínas virales en los tiempos y niveles necesarios. Así, se analizó: a) por FACS (*Fluorescence-Activated Cell Sorter*) la síntesis de la proteína del transgén (GFP) bajo un promotor constitutivo (RSV) a diferentes tiempos y; b) por

IV. Resultados

Western Blot una proteína de la cápside (*hexon*) bajo un promotor viral propio a las 24 horas.

Para el análisis de la proteína GFP, se infectaron 2E5 células HEK293 con los *Ad helper* (*Ad5/loxP.FC31* y *Ad5/FC31.Cre*) y *Ad control* (*Ad5/attP*) (MOI=2 y n=3). Se recogieron muestras a las 12, 24, 30 y 36 horas y se analizaron por FACS en el Servicio de Citometría del Instituto IBB-UAB.

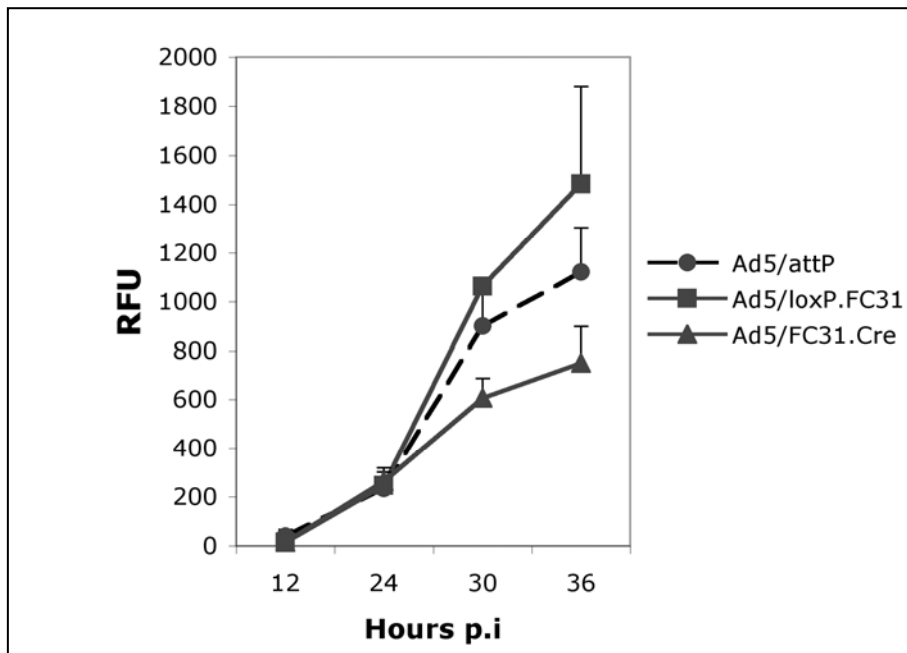


Figura 19. Análisis de la expresión del *cassette* de GFP del vector control *Ad5/attP* y de los vectores *helper* *Ad5/loxP.FC31* y *Ad5/FC31.Cre* a las 12, 24, 30 y 36 horas por FACS. RFU: Unidades relativas de fluorescencia.

Tal y como muestran los resultados del FACS de la figura 19, la cinética de producción proteica de los *Ad helper* es muy similar al *Ad control*. Solamente en las últimas horas (30-36 horas) se pueden observar diferencias en la expresión de la proteína GFP. En el caso del *Ad5/loxP.FC31*, incluso, la expresión del *cassette* de GFP es superior al del *Ad control*, evidenciando que no existe un problema en la cinética de producción de proteínas a partir de los genomas *helper* generados.

Para confirmar que las proteínas virales de la cápside podían producirse en niveles y tiempos similares al *Ad control*, se decidió analizar la proteína *hexon* (proteína principal y mayoritaria de la cápside), de diferentes *Ad helper* y *Ad control* a las 24 horas post-infección. Para ello, se infectaron 1E7 células

HEK293 con los vectores controles Ad5/ β gal y Ad5/*attP* y los vectores *helper* Ad5/*loxP*.FC31 y Ad5/FC31.Cre con una MOI=5 (n=1). La proteína *hexon* fue detectada mediante la técnica de Western Blot con un anticuerpo específico para la proteína *hexon* de Ad5 (Ab primario de ratón anti-*hexon* y Ab secundario de rata anti-ratón (conjugado HRP) del kit Adeno-X™ Rapid Titer).

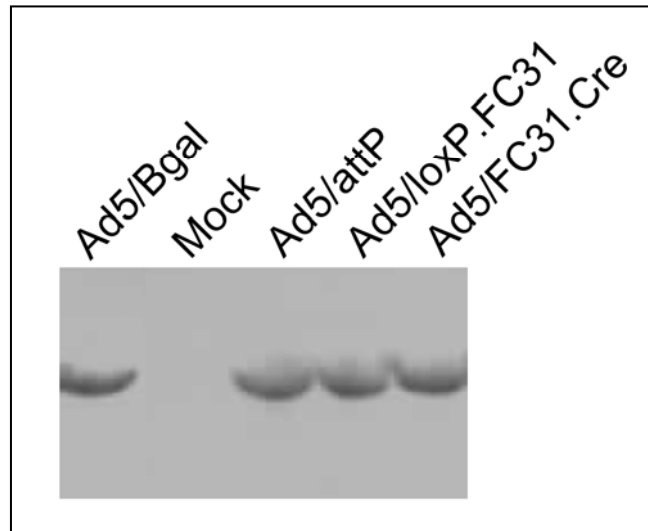


Figura 20. Western Blot de la proteína *hexon* a las 24 horas tras la infección de los adenovirus controles Ad5/ β gal y Ad5/*attP* y los Ad *helper* Ad5/*loxP*.FC31 y Ad5/FC31.Cre.

El análisis de Western Blot indica que la producción de proteína *hexon* a las 24 horas tras la infección de los diferentes virus es similar tanto en Ad *helper* como en Ad controles.

2.11 Amplificación de Ad *helper* en co-infección con Ad controles

Para determinar si la disponibilidad de proteínas virales no estaba afectada durante el ciclo viral de los Ad *helper* generados, se diseñó un experimento para comprobar si el aporte de las proteínas virales, por parte de un Ad control, podría normalizar el título de los Ad *helper* estudiados. Para ello, se infectaron 1E6 células HEK293, con una MOI=5, con: a) los Ad *helper* (Ad5/*loxP*.FC31, Ad5/FC31, Ad5/FC31.Cre) y Ad controles (Ad5/*attP* y Ad5/ β Gal) por separado, y b) los Ad *helper* y Ad5/*attP* co-infectados con el Ad control Ad5/ β gal que expresa el gen marcador para la beta-galactosidasa (MOI=5 cada uno). Las

IV. Resultados

muestras fueron analizadas 36 horas tras la infección o co-infección de los diferentes adenovirus.

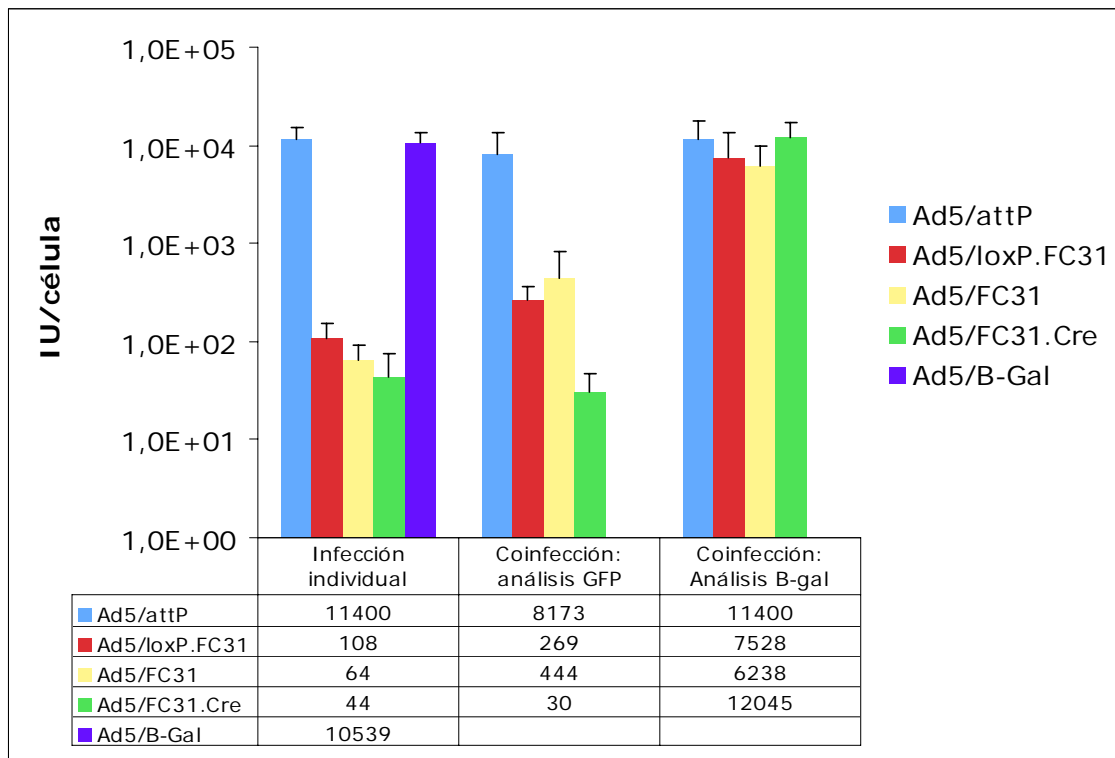


Figura 21. Experimentos de co-infección del Ad5/ β -Gal con diferentes combinaciones de virus (Ad5/*attP*, Ad5/*loxP*.FC31, Ad5/FC31 y Ad5/FC31.Cre, todos expresando GFP). La tabla muestra los valores de IU/célula representados en el gráfico.

Tal y como se observa en la figura 21, los Ad *helper* Ad5/FC31.*loxP*, Ad5/FC31 y Ad5/FC31.Cre tienen una producción viral de 2 a 3 logaritmos inferior en comparación a los Ad control (Ad5/*attP* o Ad5/ β -gal). Cuando se co-infectan el Ad control Ad5/*attP* y los diferentes Ad *helper* con el Ad5/ β -gal, los niveles del Ad5/*attP* se mantienen altos, mientras que los niveles de producción de los Ad *helper* siguen siendo del orden de 1.5 a 3 logaritmos inferiores al del Ad control. Al analizar los niveles de producción del Ad control (Ad5/ β -gal), sus niveles se mantuvieron altos en todas las muestras analizadas. Este experimento muestra primero, que los Ad *helper* no pueden normalizar su título aunque tengan un aporte extra de proteínas virales por parte de un Ad control; y segundo que el Ad control Ad5/ β gal no está afectado por la presencia de los

Ad helper, y que por lo tanto, las diferencias obtenidas en los títulos virales deben ser debidas a diferencias presentes en el genoma viral.

2.12 Análisis del empaquetamiento y replicación viral

Para estudiar si el bajo título de los *Ad helper* generados es causado por problemas en el empaquetamiento de los genomas virales, se realizó un ensayo de replicación y empaquetamiento de uno de los *Ad helper* (*Ad5/loxP.FC31*). Para ello, se infectaron por separado un *Ad* control (*Ad5/RFP*) y el *Ad helper Ad5/loxP.FC31* con una MOI=5 en 4E7 células HEK293. Por otro lado, con las mismas condiciones, estos dos virus se co-infectaron con una MOI=5 (cada uno de ellos). Se recolectó la muestra a las 36 horas y se extrajo el ADN de alto peso molecular y el ADN empaquetado en la cápside viral. El ADN de alto peso molecular corresponde al ADN que se encuentra dentro de la célula y por lo tanto, puede provenir de genomas empaquetados y/o de genomas no empaquetados. Para extraer el ADN exclusivamente empaquetado, se realizaron dos centrifugaciones seriadas en CsCl y se extrajo la banda que contenía cápsides llenas con genoma viral. Una vez purificado el ADN proveniente de ambas, éste se digirió con *SpeI* y se realizó un ensayo de Southern Blot para detectar el genoma de los diferentes *Ad* estudiados con una sonda correspondiente a los primeros 194 nucleótidos del *Ad*. Al digerir los genomas *Ad5/RFP* y *Ad5/loxP.FC31* con la diana *SpeI*, se observan bandas de 641 pb y 2180 pb respectivamente. Asimismo, el genoma adenoviral dl309 digerido con *XmaI* separa una banda de 1340 pb.

IV. Resultados

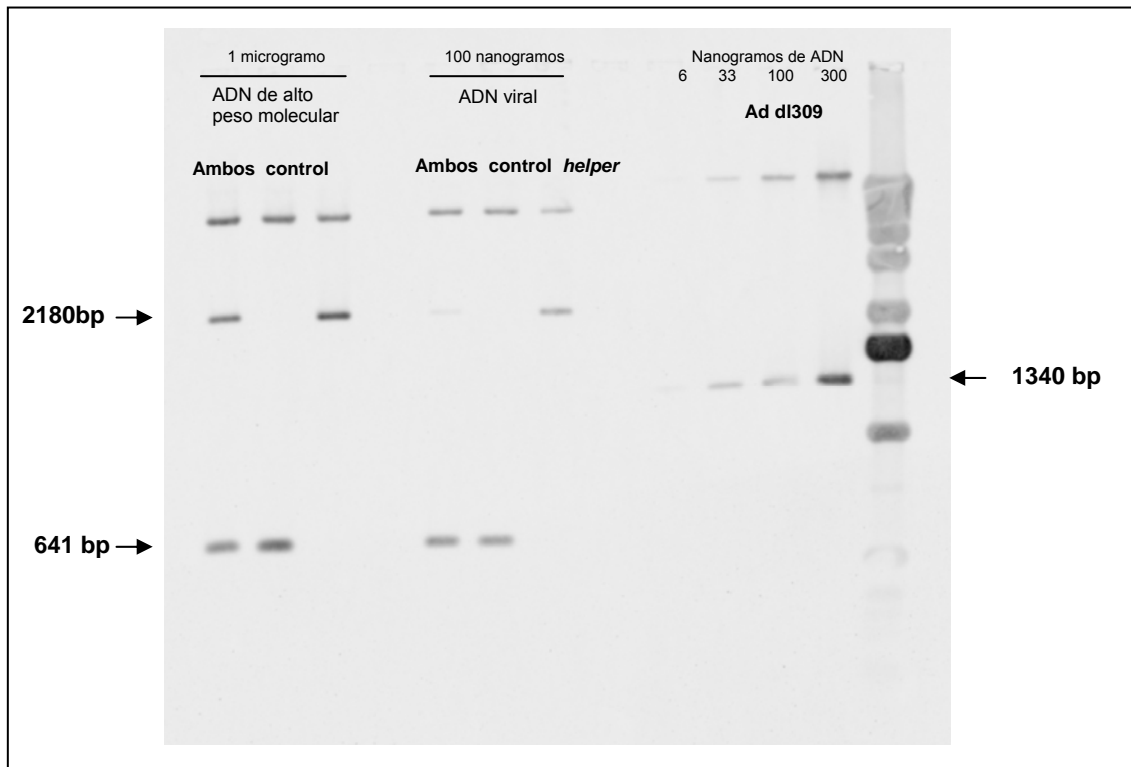


Figura 22a. Ensayo de empaquetamiento del Ad *helper* Ad5/*loxP*.FC31 junto con el Ad control Ad5/RFP. El ensayo muestra el ADN de alto peso molecular (1 μ g) y el ADN empaquetado (100 ng) a las 36 horas individualmente o en co-infección en células HEK293.

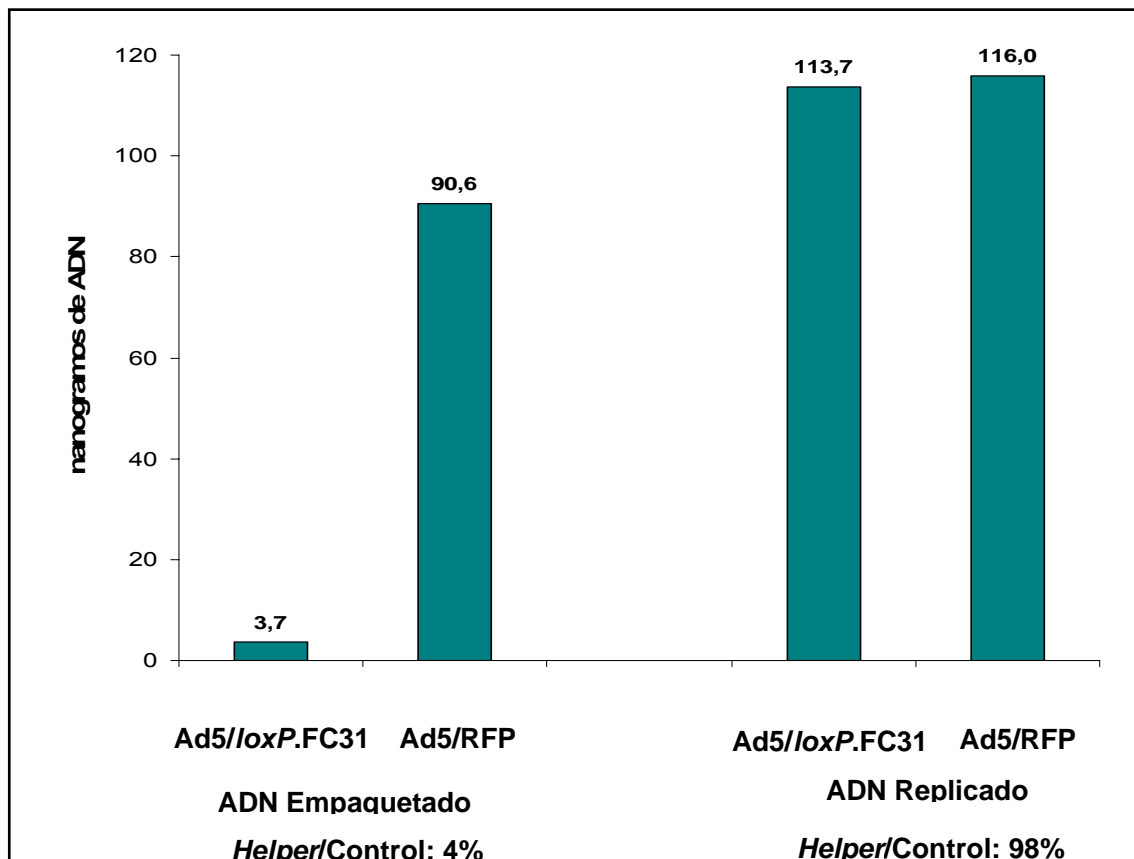


Figura 22b. Nanogramos de ADN empaquetados y replicados de los Ad Ad5/*loxP*.FC31 y Ad5/RFP en co-infección en células HEK293 a las 36 horas (MOI=5 cada uno).

El ensayo de replicación y empaquetamiento (figura 22a y b) muestra que ambos vectores (Ad5/RFP y Ad5/*loxP*.FC31) pueden replicar a un nivel similar mientras que el empaquetamiento del Ad *helper* Ad5/FC31.*loxP* es del 4% en comparación al Ad control Ad5/RFP. Este resultado muestra que la causa del retraso en el ciclo viral se halla en el empaquetamiento del genoma *helper*.

2.13 Determinación del título infeccioso del ensayo de empaquetamiento

Para comprobar el porcentaje de los viriones, que aún estando empaquetados podían generar partículas infecciosas, se realizó una titulación viral del lisado crudo proveniente de las muestras del ensayo de empaquetamiento del punto 2.12. El ensayo de empaquetamiento no muestra la infectividad de los genomas que se encuentran en la cápside con lo que es necesario analizar el número de partículas infecciosas y así, conocer el estado de maduración de las partículas virales.

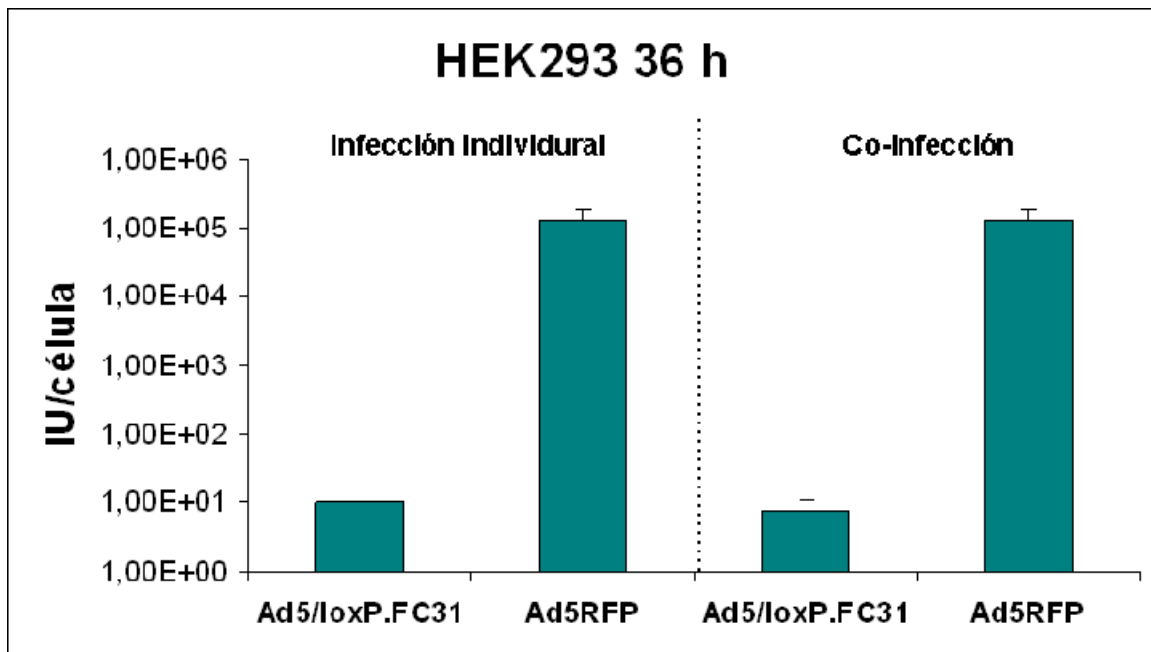


Figura 23a. Producción viral del Ad *helper* Ad5/*loxP*.FC31 y Ad5/RFP individualmente y en co-infección (MOI=5) en células HEK293.

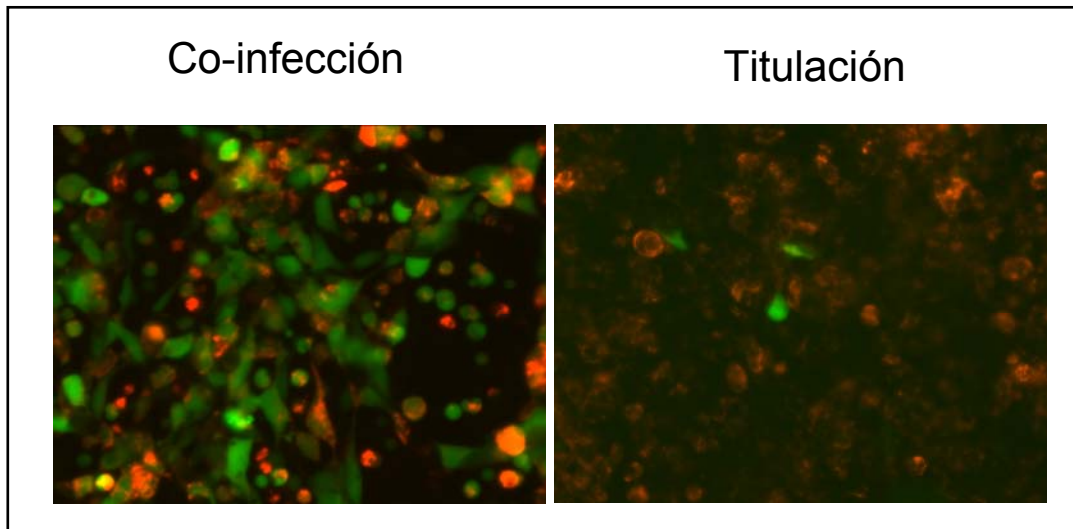


Figura 23b. Análisis por microscopía de fluorescencia de los Adenovirus *helper* Ad5//oxP.FC31 (GFP) y Ad5/RFP en co-infección a las 24 horas post-infección con una MOI=5 y uno de los pozos de la titulación de la muestra recolectada a las 36 horas post-infección.

Tal y como muestra la figura 23a, el Ad *helper* Ad5//oxP.FC31 se produce del orden de 2 a 4 logaritmos menos en IU/célula que el Ad control Ad5/RFP. Sin embargo, el ensayo de empaquetamiento mostraba que un 4% de los genomas empaquetados son Ad *helper*. Es decir, a las 36 horas tras la infección, sólo una fracción de las partículas virales con ADN empaquetado es infecciosa. Una posible explicación es que éstas no hayan podido llevar a cabo un proceso de maduración correcto. Este resultado muestra la importancia de la titulación por unidades de infección para conocer la contaminación de Ad *helper* en las preparaciones de Ad *gutless* en lugar de la titulación clásica que se realiza mediante Southern o Dot Blot.

2.14 Procesos de Maduración

Para estudiar el proceso de maduración del Adenovirus se utilizaron el Ad control (Ad5/RFP) crecido a las 36 horas, el Ad *helper* Ad5/FC31 crecido a las 36 y 56 horas y el Adts369 crecido a las 36 horas. El Ad5ts369 es un mutante termo-sensible para la proteína L1-52/55K, utilizado normalmente como control en ensayos de empaquetamiento, ya que al crecerlo a 39.5°C, acumula intermedios de empaquetamiento y maduración [115]. La maduración de la cápside viral se puede analizar por diferentes parámetros: densidad de las partículas purificadas; ensayos de tinción de plata (*silver stain*); y Western Blot.

En primer lugar, se amplificaron los adenovirus (Ad5/RFP, Ad5/FC31 y Adts369) en células HEK293, y se realizaron dos gradientes en CsCl. En el primer gradiente se pudo observar que, a las 36 horas, el Ad/RFP presentaba una banda mayoritaria de cápsides con genoma viral mientras que el Adts369 parecía tener todas las cápsides vacías o con poco ADN (figura 24). Asimismo, el Ad5/FC31 presentaba una banda mayoritaria de cápsides vacías o con intermedios de empaquetamiento, incluso a las 56 horas.

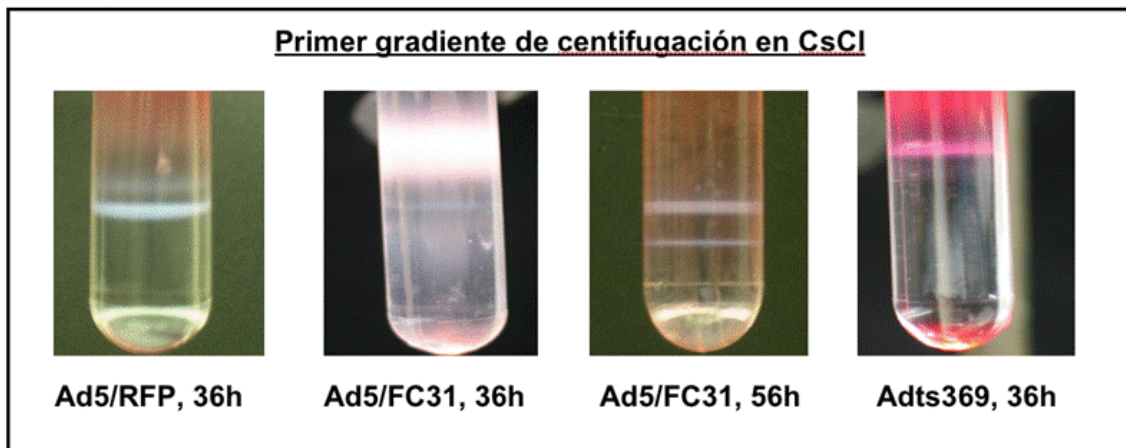


Figura 24. Primer gradiente en CsCl de los virus Ad5/RFP (36h), Ad5/FC31 (36h y 56h) y Adts369 (36h).

En un segundo gradiente en CsCl (1.34 g/cm^3), el Ad5/FC31 presentaba diferentes estadios de empaquetamiento que se pudieron separar para su posterior estudio (figura 25). Además, los Ad controles Ad5/RFP y Adts369 presentaron las bandas esperadas al nivel correspondiente (cápsides llenas en la parte inferior y cápsides vacías en la parte superior). Para analizar los diferentes estadios de empaquetamiento, se realizó un 3^{er} gradiente en CsCl para purificar 3 bandas halladas en la parte superior.

IV. Resultados

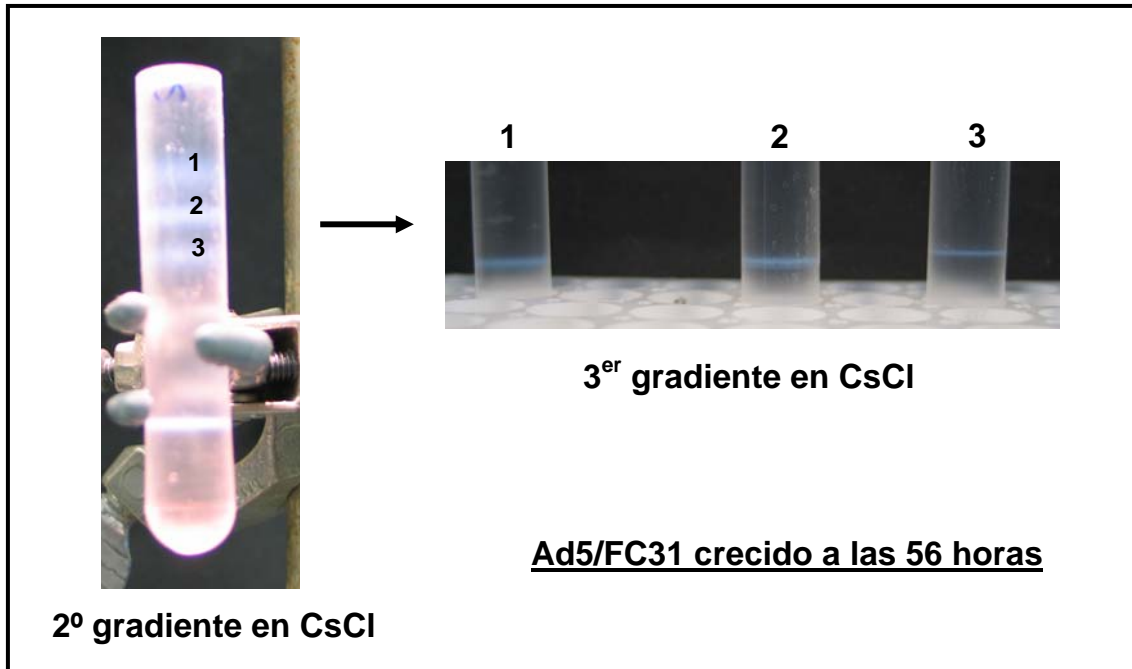


Figura 25. Segundo gradiente en CsCl del Ad5/FC31 crecido a las 56 horas. Separación de las bandas superiores en un 3^{er} gradiente en CsCl.

2.15 Análisis de las partículas virales halladas en los gradientes de CsCl

Las partículas virales provenientes de los gradientes de CsCl fueron separadas para ser analizadas exhaustivamente por: microscopía electrónica, infectividad por dilución límite, densimetría, composición proteica por tinción de plata y Western Blot y contenido de genoma viral por Southern Blot.

2.15.1 Análisis por microscopía electrónica de las partículas virales

El análisis de las partículas adenovirales se realizó mediante el método de Acetato de Uranil en el servicio de microscopía electrónica del instituto *Lab Sciences, Stony Brook University, New York*.

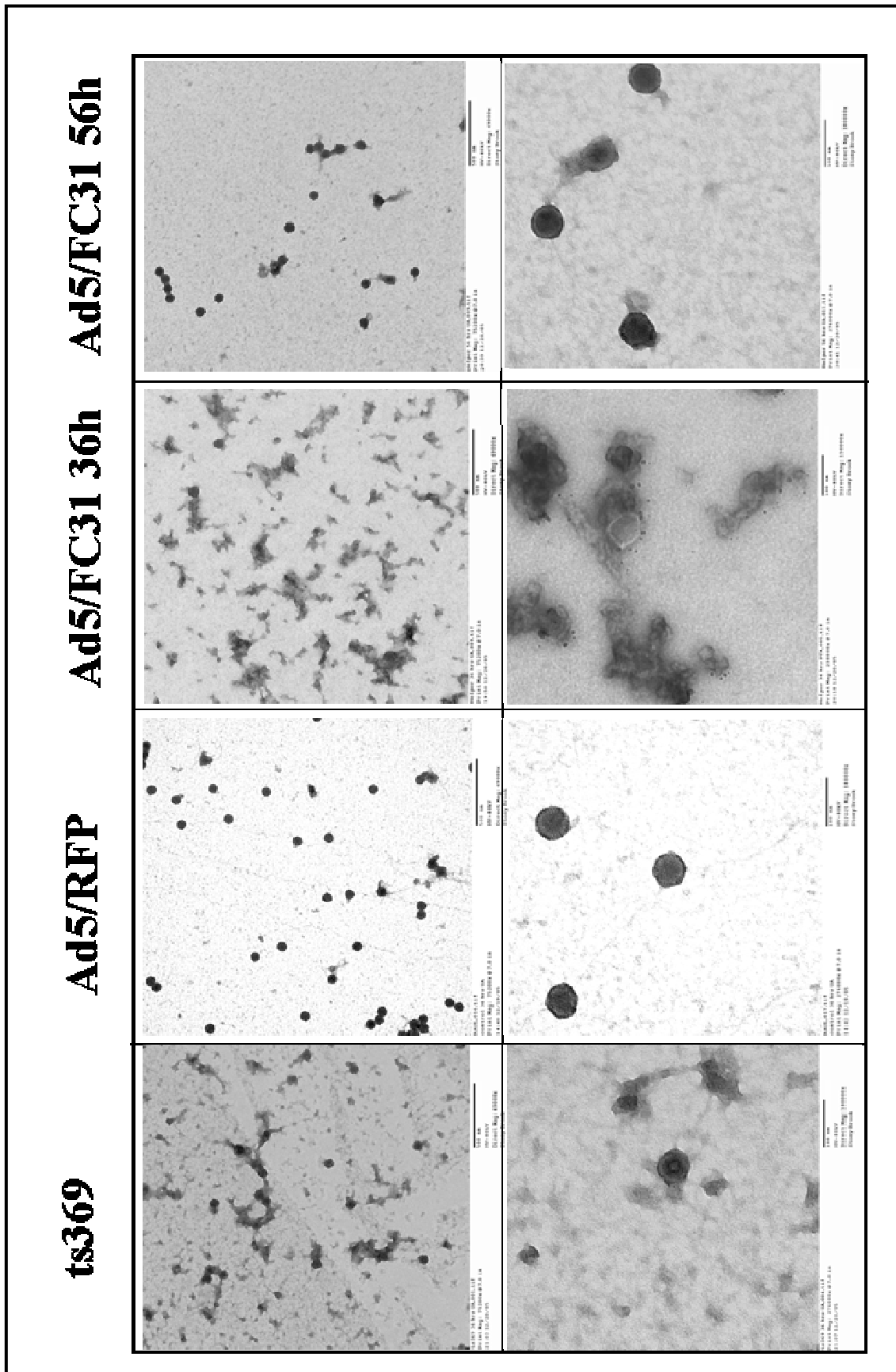


Figura 26. Análisis por microscopía electrónica de los adenovirus Ad5ts369, Ad5/RFP y Ad5/FC31 a las 36 horas y Ad5/FC31 a las 56 horas.

IV. Resultados

El resultado de la microscopía electrónica (figura 26) muestra que el Ad control Ad5/RFP puede generar cápsides maduras con genoma viral a las 36 horas, mientras que el Adts369 genera cápsides vacías o parcialmente llenas de ADN y gran cantidad de proteínas virales no ensambladas. En el caso del Ad *helper* Ad5/FC31 generado a las 36 horas, se observa un patrón similar al Adts369 con un número reducido de cápsides y sin genoma adenoviral. Además, en esta muestra se observa gran cantidad de proteínas virales que todavía están por ensamblarse, al igual que en el caso del Adts369. Sin embargo, para el Ad5/FC31 a las 56 horas se obtienen cápsides formadas que en su mayoría contienen genoma viral en su interior.

2.15.2 Titulación de las bandas purificadas por CsCl

Para determinar las características de las bandas aisladas pertenecientes posiblemente a intermedios de maduración del Ad5/FC31 a 56 horas, primero se realizó una titulación por dilución límite para comprobar el nivel de infectividad de las bandas purificadas.

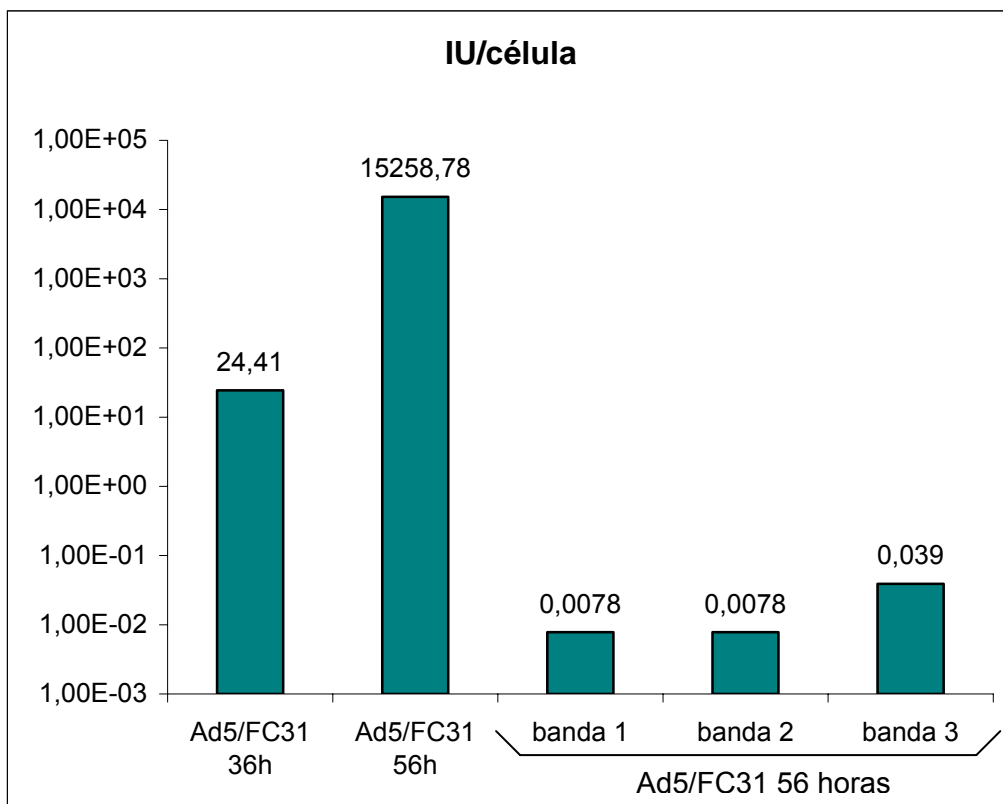


Figura 27. Título infeccioso de las bandas purificadas del vector Ad5/FC31 a las 36 y 56 horas conjuntamente con las bandas superiores 1, 2 y 3 correspondientes al gradiente de 56 horas.

Tal y como muestra la figura 27, el título infeccioso del Ad5/FC31 es 625 veces inferior a las 36 horas en comparación a los resultados obtenidos a las 56 horas. En el caso de las bandas 1, 2 y 3, separadas a partir de estadios intermedios de empaquetamiento, los resultados indicaron que la infectividad de todas las bandas es prácticamente nula, coincidiendo con cápsides bien vacías, o bien en un estadio inicial de empaquetamiento.

2.15.3 Análisis de la densidad de los virus purificados por CsCl

En segundo lugar, se analizó la densidad de los diferentes virus mediante un refractómetro de luz visible.

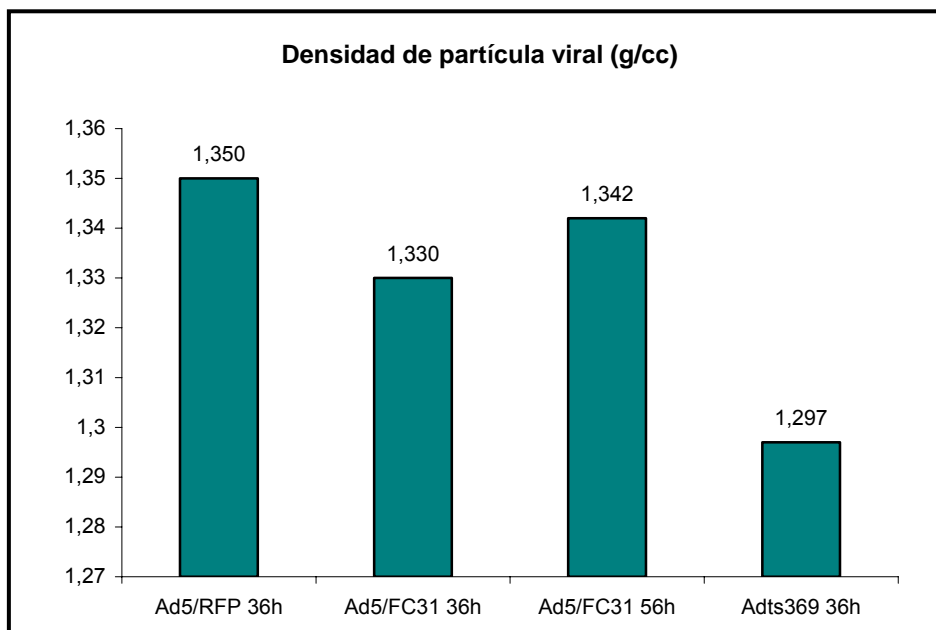


Figura 28. Análisis de la densidad de las bandas de los adenovirus Ad5/RFP, Ad5/FC31 y Adts369 crecidos a diferentes tiempos.

Así, mientras las partículas del Ad control Ad5/RFP muestran una densidad de partícula madura ($\delta=1.35 \text{ g/cm}^3$), las partículas Adts369 muestran una densidad de partícula ligera ($\delta=1.29 \text{ g/cm}^3$) (figura 28). En el caso del Ad5/FC31 a las 36 horas, las partículas analizadas claramente muestran una densidad menor a una partícula madura pero mayor a las partículas inmaduras, con lo que un gran porcentaje de las cápsides analizadas ($\delta=1.33 \text{ g/cm}^3$) parecen estar en procesos intermedios de maduración. En cambio a las 56 horas, la densidad aumenta hasta $\delta=1.342 \text{ g/cm}^3$, indicando que muchas de las cápsides que

IV. Resultados

estaban madurando a las 36 horas, ya son maduras 20 horas después, aunque todavía parece ser que resta un pequeño porcentaje por madurar.

2.15.4 Análisis del contenido proteico de las cápsides adenovirales

Para analizar el patrón de proteínas que presentan las cápsides adenovirales, se realizó un gel de SDS-PAGE y una posterior tinción en plata. Gracias a esta técnica es posible visualizar, de manera global, todas las proteínas de la cápside del Ad.

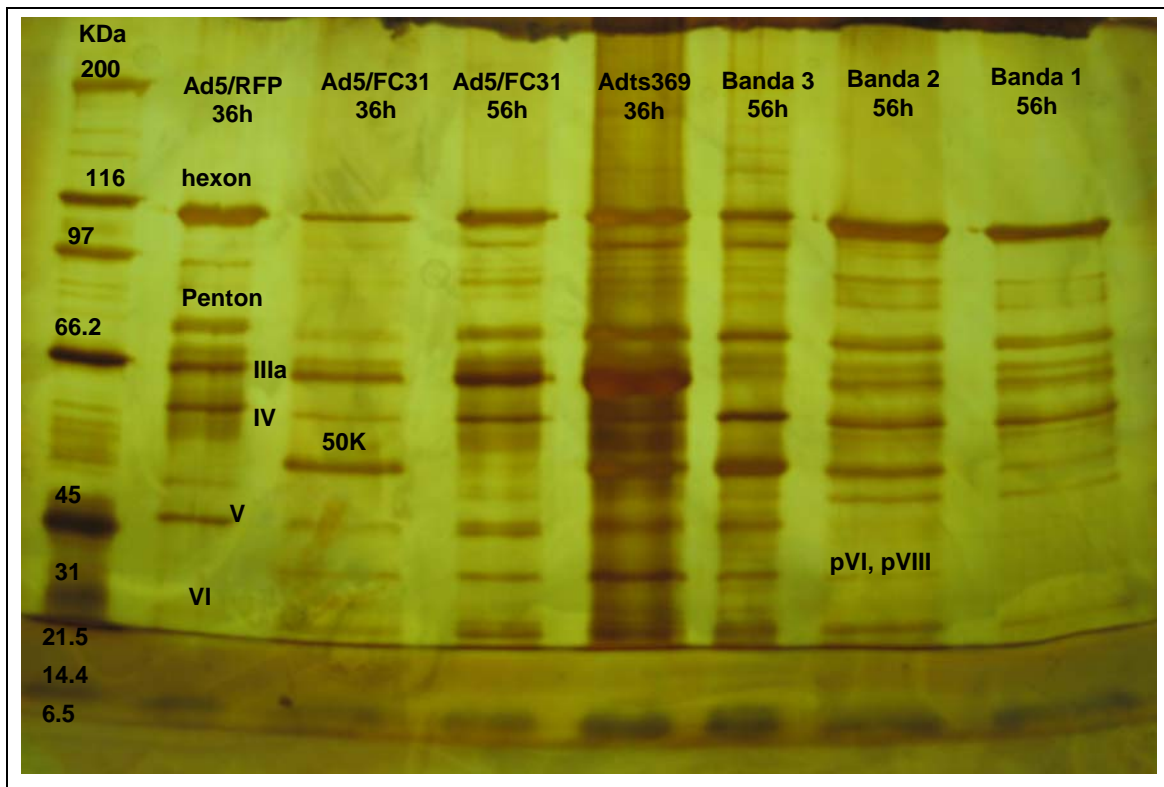


Figura 29. Gel SDS-PAGE con tinción en plata de las diferentes bandas purificadas (Ad5/RFP a 36h, Ad5FC31 a 36 y 56 h, banda 1, 2 y 3 a 56h y Adts369 a 36h).

El carril del Ad5/RFP permite visualizar el patrón de proteínas de una partícula con genoma adenoviral madura (figura 29). Por otro lado, el carril de Adts369 permite visualizar el patrón de proteínas que contiene una partícula con poco ADN y sin madurar. De este modo, es posible observar la maduración del Ad *helper* Ad5/FC31 visualizando las proteínas de su cápside en diferentes etapas. La banda 1 corresponde a una cápside viral totalmente vacía, sin genoma adenoviral, ya que es la banda más alta en el gradiente de CsCl. Las proteínas V y VII indican la presencia de ADN en la cápside adenoviral. Tal y como muestran la figura 29, la banda 1 no contiene ADN, ya que no se observa la

presencia de la proteína V mientras que todos los demás carriles indican etapas posteriores con la proteína V. El producto 50K todavía no se ha asociado a ningún gen viral, sin embargo indica un estadio intermedio de maduración. Así, no está presente en el carril del Ad control Ad5/RFP pero sí lo está en el carril del Adts369. El Ad5/FC31, a las 36 horas, muestra una banda muy importante correspondiente a la proteína 50K, mientras que a las 56 horas esta banda desaparece indicando una maduración avanzada. Además, la presencia de los precursores de las proteínas VI y VIII, indican la presencia de ADN pero necesitan ser procesados para que la partícula viral madure. En el caso del Ad/RFP, no se observan los precursores pVI y pVIII, en cambio en el Ad5/FC31 a las 56 horas sí se observan, indicando que un porcentaje de estas partículas todavía está madurando. Asimismo, en estas partículas, el producto 50K es eliminado de la cápside mucho antes que los precursores pVI y pVIII, indicando que su proteólisis parece ser previa a la aparición de pVI y pVIII.

Estos resultados muestran que un porcentaje importante de las partículas del adenovirus Ad5/FC31 a las 36 horas está todavía por madurar, posiblemente porque al estar retrasado el empaquetamiento, se retrasa el proceso de maduración. Por el contrario, a 56 horas, la desaparición de la proteína 50K indica que el porcentaje de partículas maduras infecciosas aumenta considerablemente, sin embargo todavía resta una población de viriones por madurar, tal y como muestran los precursores pVI y pVIII mientras que las bandas 1, 2 y 3 corresponden con etapas muy iniciales de empaquetamiento y maduración.

2.15.5 Análisis del contenido de ADN en las partículas adenovirales

Para confirmar que las cápsides correspondientes a las partículas Adts369 y bandas 2 y 3 contenían parte del genoma del Ad indicado por la presencia de la proteína V, se realizó un Southern Blot con una sonda contra el ITR del Ad (primeros 194 nucleótidos).

Como se observa en la figura 30, las partículas Adts369 muestran una cantidad de genoma viral superior a las partículas de la banda 3. En la banda 2 se observa muy poco la presencia del genoma viral mientras que en la banda 1 no

IV. Resultados

se aprecia ninguna cantidad de ADN. Los resultados obtenidos en el Southern Blot concuerdan con el patrón proteico hallado en el gel de SDS-PAGE con tinción de plata.

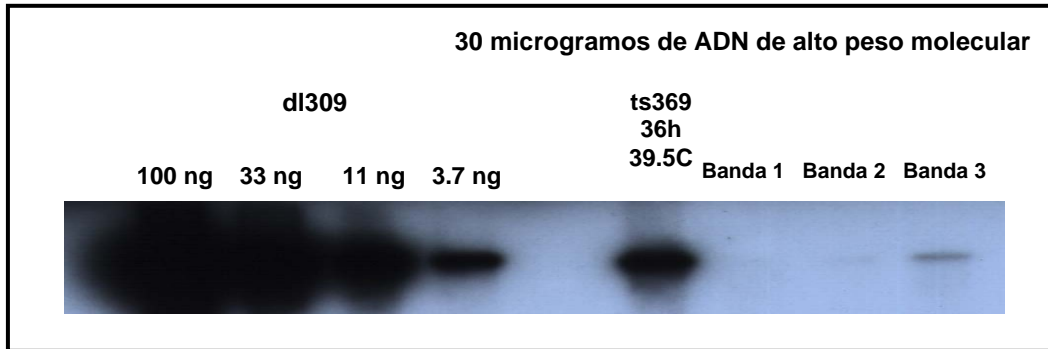


Figura 30. Southern Blot de las bandas 1, 2, 3 y partículas Adts369 para la detección del genoma viral.

2.15.6 Análisis por Western Blot de las proteínas VII, *penton* y L1-52/55K

Para definir aún más el estado de maduración de los diferentes vectores adenovirales, se realizaron Western Blots para detectar la proteína VII y precursora (pVII), la proteína *penton* y la proteína L1-52/55K. La proteína L1-52/55K aparece cuando las cápsides están vacías. Cuando el ADN entra en la cápside la proteína L1-52/55K se degrada rápidamente y es expulsada fuera de la partícula viral. La proteína pVII indica la presencia de ADN en la cápside, sin embargo para que una partícula viral sea infecciosa, necesita que la proteasa adenoviral degrade el precursor para finalmente convertirlo en proteína VII. La proteína *penton* nos sirve para equiparar el número de partículas que se cargan por carril.

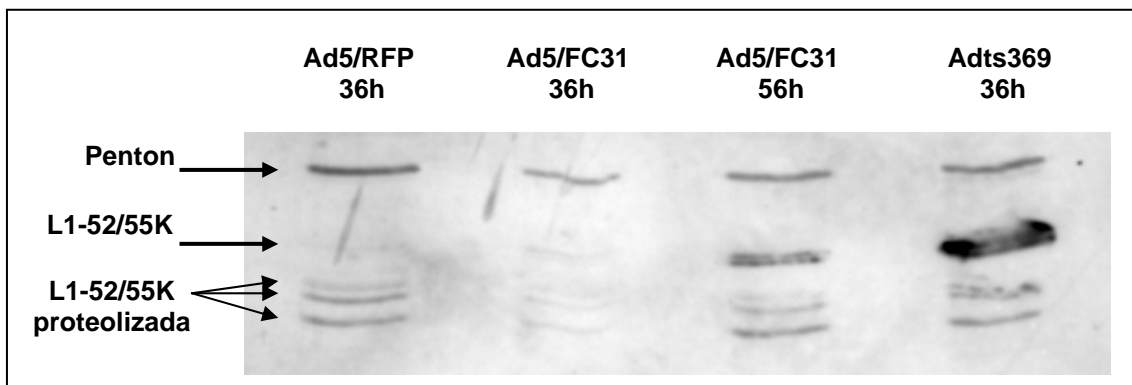


Figura 31. Western Blot de la proteína L1-52/55K, normalizada con la proteína *Penton*, para los adenovirus Ad5/RFP (36h), Ad5/FC31 (36 y 56h) y Adts369 (36h). Anticuerpo contra proteína L1-52/55K facilitado por el Dr. Patrick Hearing.

En el Western Blot de la figura 31, la proteína L1-52/55K se encuentra totalmente degradada en el Ad control (Ad5/RFP) tal y como era esperado. En el caso del Adts369, la proteína L1-52/55K se encuentra en gran cantidad y solamente una parte de ésta ha podido ser degradada ya que un porcentaje bajo del ADN replicado ha entrado en estas cápsides. En el caso del Ad *helper* Ad5/FC31 crecido a las 36 horas, el genoma viral todavía no ha entrado en las cápsides analizadas. Aunque la concentración de proteína *penton* es similar en todos los carriles, no se observa que la proteína L1-52/55K esté en la cápside, con lo que se evidencia un posible problema en la entrada de esta proteína en la cápside o todavía es necesario un número mayor de horas para su entrada. Aunque se observa una menor cantidad de proteína L1-52/55K en estas partículas, parte de esta proteína que sí ha entrado en la cápside ha sido degradada, con lo que un porcentaje de la muestra ya es madura. A las 56 horas, sí que es posible observar que todavía resta mucha proteína L1-52/55K por degradar pero parte ya ha sido degradada, por lo que a las 56 horas existe una población de partículas madura y una de inmadura. Ello podría ser debido a que las partículas virales no siguen una maduración simultánea indicando un paso más lento en alguna de las etapas del ciclo viral.

Tal y como muestra la figura 32, la proteína VII está presente en el Ad control Ad5/RFP a las 36 horas y en Ad5/FC31 tanto a las 36 como a las 56 horas, aunque únicamente se puede encontrar la presencia del precursor pVII en el caso del Ad5/FC31 a las 36 horas, lo que indica cápsides con genoma empaquetado pero aún no infecciosas.

IV. Resultados

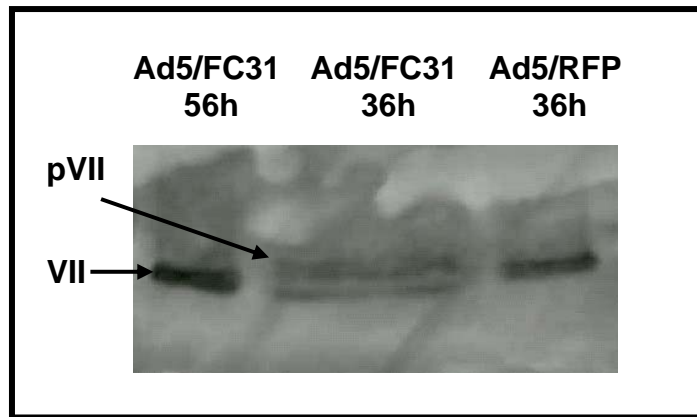


Figura 32. Western Blot de la proteína VII con los adenovirus Ad5FC31 crecido a las 36 y 56 horas y el Ad5/RFP crecido a las 36 horas. Anticuerpo contra proteína VII facilitado por el Dr. Patrick Hearing.

Además, para comprobar la presencia de la proteína pVII en las bandas superiores 1, 2 y 3 del gradiente de CsCl del Ad5/FC31 a las 56 horas, conjuntamente con las partículas ligeras del Adts369, se realizó un Western Blot para esta proteína.

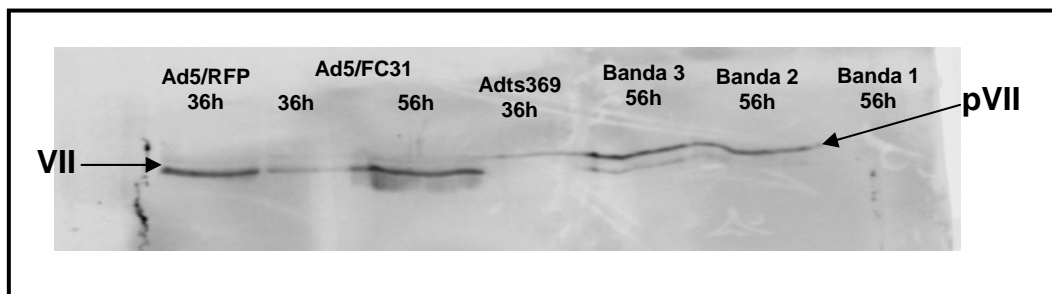


Figura 33. Western Blot de la proteína VII con los adenovirus Ad5/RFP a las 36horas, Ad5/FC31.*loxP* a las 36 y 56 horas, Adts369 a las 36 horas y las bandas 1, 2 y 3 a las 56 horas. Anticuerpo contra proteína VII facilitado por el Dr. Patrick Hearing.

La figura 33 muestra que las cápsides vacías de la banda 1 no presentan precursor para la proteína VII (pVII). A medida que se inicia el empaquetamiento de ADN, la banda 2 presenta precursor, aunque solamente en la banda 3 se aprecia la presencia de la proteína VII ya proteolizada. En los virus purificados, a las 36 horas, el Ad5/FC31 tiene tanto proteína VII como pVII mayoritariamente, mientras que a las 56 horas se detecta mayoritariamente la proteína VII proteolizada. En el caso del Adts369, se observa el precursor de la proteína VII pero no se observa la proteína madura ya que ha sido crecido a

39.5°C y la partícula viral no ha madurado, mientras que el Ad5/RFP a las 36 horas, presenta únicamente proteína VII proteolizada.

2.15.7 Análisis de la entrada del genoma viral al núcleo celular

Debido a que las partículas virales del vector Ad5/FC31 muestran un retraso en el empaquetamiento y por consiguiente, un retraso en el comienzo de la maduración de la cápside, se analizó la cantidad de genoma viral que podía llegar al núcleo de la célula. Si las partículas eran poco infecciosas o la proteasa adenoviral no se encontraba dentro de la cápside, el genoma viral no podría llegar al núcleo en el tiempo adecuado y ello podría ser la causa de un ciclo viral más lento.

Así, se infectaron células HEK293 con una MOI=5 y se recolectaron a las 6 horas. Se extrajo el ADN de alto peso molecular del núcleo de estas células y se realizó la técnica de Southern Blot contra el ITR del Ad (primeros 194 nt).

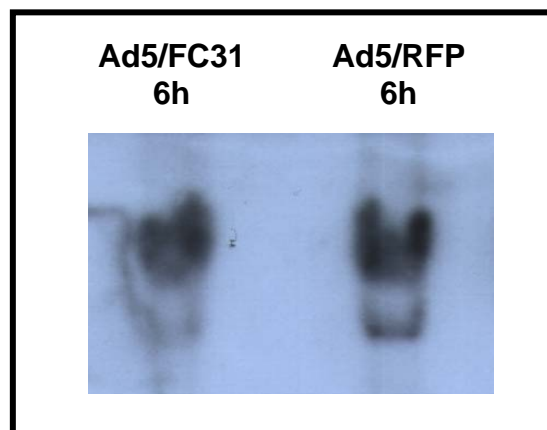


Figura 34. Southern Blot de los adenovirus (Ad5/FC31 y Ad5/RFP) a las 6 horas tras su infección en el núcleo de la célula HEK293.

Tal y como muestra la figura 34, el Ad *helper* Ad5/FC31 llega al núcleo al mismo tiempo y con los mismos niveles que el Ad control Ad5/RFP, confirmando que la proteasa adenoviral es activa en estas cápsides y no existen problemas en las primeras fases del ciclo para transportar su genoma viral dentro de la cápside.

IV. Resultados

2.15.8 La secuencia *attB* es la secuencia responsable del retraso en el ciclo viral

Puesto que el común denominador en los genomas adenovirales que presentan un ciclo viral más lento es la presencia de las secuencias *attB/attP*, pero el Ad5/*attP* no presenta ningún retraso, se analizó el papel de la secuencia *attB* en el retraso del ciclo viral. Para ello, se generó el vector Ad5/Cre.*attB* que contenía la secuencia *attB* + 2 secuencias *loxP*, pero no contenía la secuencia *attP*. Gracias a las pruebas de ciclo celular (figura 10c) se pudo observar que al igual que Ad5/FC31, este vector tenía un retraso de 20 horas con respecto al Ad control, confirmando que la secuencia *attB* era la responsable de este retraso y no la presencia de la secuencia *attP*.

2.15.9 Genomas virales con una segunda señal de empaquetamiento pueden normalizar los niveles de partículas infecciosas

La secuencia *attB* bien podría evitar la unión del complejo de empaquetamiento con la señal Ψ o bien bloquear o fijar el genoma viral en un dominio nuclear donde se impida el proceso de empaquetamiento. Por esta razón, se clonó una segunda señal de empaquetamiento en el extremo 3' del Ad. Para ello, se utilizó el método de Stow con un genoma que contenía una segunda señal Ψ en el extremo 3' (Ad5/in340). Se ha descrito que el Ad necesita que su señal de empaquetamiento se encuentre entre los primeros 600 nucleótidos desde el ITR, pero no tiene importancia si se trata del extremo ITR 5' o 3' [103].

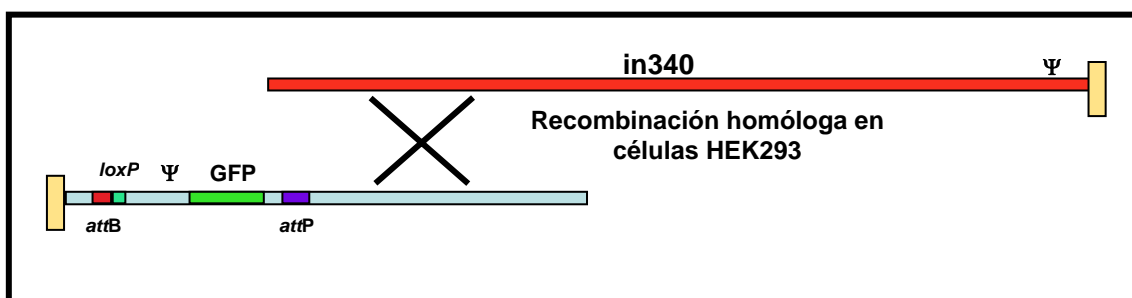


Figura 35. Recombinación homóloga entre el extremo 3' del Ad in340 y el plásmido lanzadera pRAF5.1 en forma lineal en células HEK293.

Una vez realizada la recombinación homóloga, se aislaron los clones adenovirales amplificados y se escogió uno de ellos para su posterior propagación en células HEK293. El virus analizado Ad5/FC31.*loxP*. Ψ fue

amplificado hasta obtener una producción de 20 placas de 15 cm con un título infeccioso de $8.5E10$ IU/mL.

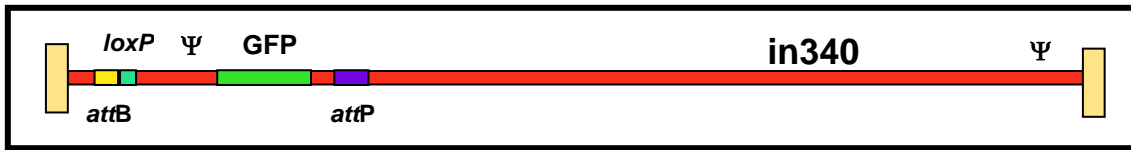


Figura 36. Genoma adenoviral de la construcción Ad5/FC31.loxP.Ψ.

Para comprobar si el genoma Ad5/FC31.loxP.Ψ presentaba títulos elevados a 36 horas o bien 2-3 logaritmos inferiores como los observados para los Ad *helper* con las secuencias *attB/attP*, se tituló este vector en células HEK293 con una MOI=5 durante 36 horas, conjuntamente con un vector control (Ad5/β-gal) y el mismo vector con 1 sola señal de empaquetamiento (Ad5/FC31.loxP).

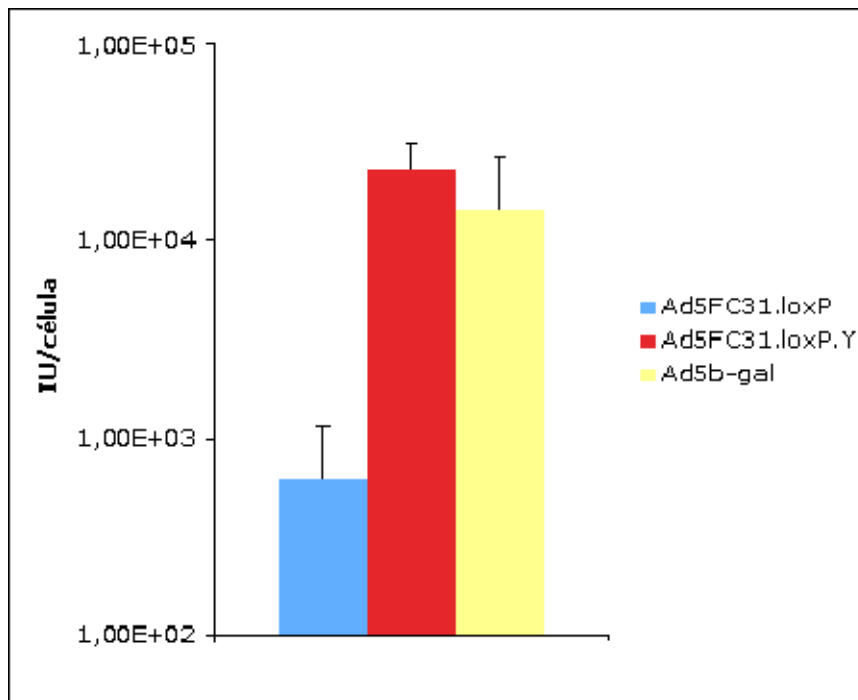


Figura 37. Titulación de los adenovirus Ad5/FC31.loxP, Ad5/FC31.loxP.Ψ y Ad5/β-gal en células HEK293 crecidas hasta las 36 horas.

La figura 37 muestra que el Ad que contiene una segunda señal de empaquetamiento clonada en el extremo 3' (Ad5/FC31.loxP.Ψ) puede normalizar los niveles de partículas infecciosas que muestra el Ad control Ad5/β-gal mientras que el Ad *helper* Ad5/FC31.loxP tiene un título inferior.

IV. Resultados

2.16 Estudios de EMSA (*Electroforetic Mobility Shift Assay*)

Después de los estudios realizados, se puede afirmar que en ausencia de mutaciones en los genes virales del genoma, la maquinaria de replicación y empaquetamiento están claramente activas. Para esclarecer cualquier duda, se ha secuenciado toda la región adenoviral que se encuentra en los plásmidos lanzadera sin observar ninguna mutación. Sin embargo, aunque la maquinaria de empaquetamiento esté disponible, incluso con la presencia de un Ad control (figura 21 y 22), el genoma del Ad *helper* no puede empaquetarse. Por ello, se hipotetizó que posiblemente, una proteína celular se une a la secuencia *attB* e impide, de manera eficiente, la formación del complejo proteico de empaquetamiento que permite dirigir la cadena de ADN hacia la cápside. Por ello, se realizaron pruebas de EMSA para averiguar si, independientemente de la recombinasa Φ C31, se unían diferentes proteínas a estas secuencias. Para realizar este ensayo, se utilizaron la secuencia *attB*, una secuencia *attB** reorganizada con los mismos nucleótidos de la secuencia original, y la secuencia *attB+loxP*. Estas secuencias se pusieron en contacto con extractos nucleares de células HEK293 infectadas por Ad5/RFP y células no infectadas. De este modo, se puede observar si en caso de unión a la secuencia *attB*, las proteínas eran nucleares o virales.

Las secuencias analizadas para realizar el EMSA fueron las siguientes:

attB:ACCGGTCCGCGGTGCGGGTGCCAGGGCGTGCCCTTGGGCTCCCCG
GGCGCGTACTCCAC.

attB*:ACCGGTGGGCACGCGCGCGCACCTGGCGCACCGCGTTCGGCGCAC
CTGCGCACCTGGCACCA.

attB+loxP: Esta secuencia se obtuvo por la digestión del plásmido pRAF3.2 Δ E1 por la diana *Agel*.

Los competidores utilizados para competir con la sonda por la unión de los factores nucleares fueron: el poly-dIdC (*poly-(deoxyinosic–deoxycytidylic)*) y ADN de esperma de salmón.

Las condiciones de unión se establecen en el tampón de unión a la sonda. Como se desconoce la identidad del posible factor y sus características de

unión por la secuencia de interés, se utilizaron 2 tampones de unión diferentes. El primer tampón de unión es un tampón clásico (Material y métodos 6.6.2) y el segundo es el tampón para determinar la unión de la proteína IVa2 a la señal de empaquetamiento [54]. Además, para comprobar si la zona rica en CGs, por parte de la secuencia *attB* y *attB**, permitía la unión de los factores *ciclynE* y *sp1* (factores celulares de unión a zonas ricas en CGs), se realizó un ensayo de *supershift* utilizando los anticuerpos específicos para estos factores nucleares.

Primero, se pusieron a punto las condiciones de concentración de competidor mediante un ensayo de EMSA para comprobar la unión específica de los factores nucleares con la sonda *attB+loxP*. Se utilizaron 1000, 500 y 250 ng de los competidores *dIdC* y esperma de salmón, utilizando únicamente el tampón normal (N).

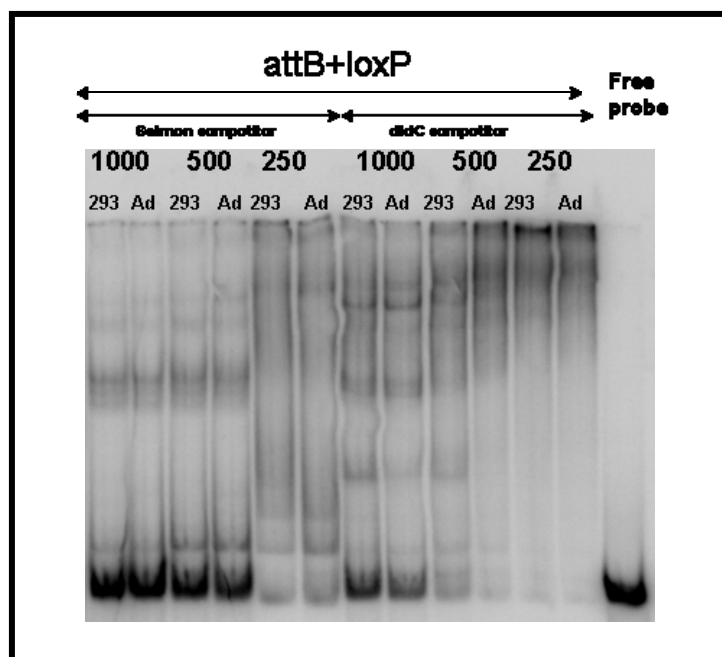


Figura 38. EMSA de la secuencia *attB+loxP* para diferentes concentraciones de competidor de esperma de Salmón y *dIdC*. (293: Extractos nucleares procedentes de la línea celular HEK293; Ad: Extractos nucleares procedentes de la línea HEK293 infectada por el Ad control Ad5/RFP).

Gracias a este primer ensayo (figura 38), se estableció la concentración de 1000 ng como la concentración de competidor necesaria para observar las uniones específicas con la sonda marcada. Se utilizó la sonda sin extracto

IV. Resultados

nuclear (*free probe*) para conocer a qué altura corría la misma sin la presencia de los extractos nucleares.

Tal y como muestra el ensayo de EMSA (figura 39), en todos los carriles se observan uniones específicas de proteínas nucleares con las sondas utilizadas. La unión de estas proteínas es independiente a la infección por Ad, ya que existe el mismo tipo de unión tanto en las condiciones “Ad” como en las “293”. Parece ser que la unión varía en función del tampón utilizado, ya que para el tampón IVa2 se observa, de manera general, un número mayor de bandas que para el tampón N. Además, el competidor dIdC ofrece mayor información con un número mayor de bandas. Asimismo, se observa que en función del competidor utilizado, las uniones específicas por las sondas utilizadas varían y varía también la intensidad de las bandas observadas. Finalmente, los anticuerpos para cIynE y sp1 no ofrecieron unión por la secuencia *attB* ya que no se observó *supershift*. Con el ensayo de EMSA podemos afirmar que una o varias proteínas nucleares se unen a esta secuencia pero no podemos conocer si esta unión es la causa del retraso en el ciclo viral de los Ad *helper* generados y si lo es, es difícil establecer cuál de las diferentes proteínas es la causante.

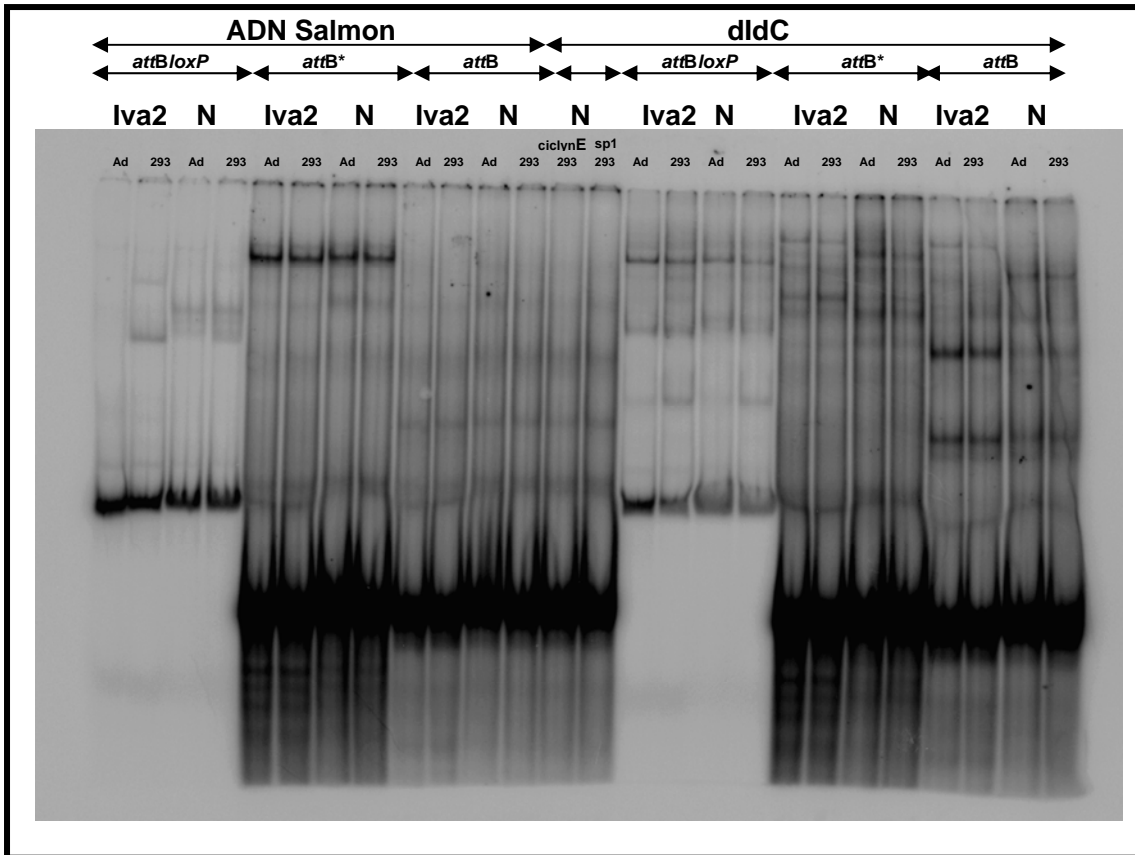


Figura 39. EMSA de las sondas *attB*, *attB** y *attBloxP* con extractos nucleares de células HEK293 infectadas por adenovirus (Ad) y no infectadas (293). Las condiciones de unión a la sonda fueron utilizadas según el tampón N y tampón para la proteína Iva2 utilizando dIdC y esperma de Salmón como competidores. Concentración del competidor: 1000 ng.

3. Generación de nuevas líneas celulares con las recombinasas

Cre y ΦC31

Algunas de las líneas celulares utilizadas en este trabajo han sido modificadas para la incorporación de genes de recombinasas mediante el uso de antibióticos selectivos en eucariotas. Para ello, se clonaron los genes de las recombinasas en plásmidos que contenían genes para la selección de antibióticos. A continuación los plásmidos fueron transfectados en líneas celulares y los clones celulares seleccionados por su antibiótico.

IV. Resultados

3.1 Generación del plásmido que contiene la recombinasa Φ C31 y resistencia a zeozina

El plásmido pZeo(-) se digirió por las dianas *XhoI* y *NheI* para extraer una banda de 3484 pb y el plásmido pCMV-Int (con la recombinasa Φ C31) por las dianas *XhoI* y *SpeI* para extraer una banda 1875 pb. Las bandas de 3484 y 1875 pb se ligaron para generar el plásmido pZeo/FC31.

3.2. Generación de la línea celular HEK-293/Cre.FC31 y N52.E6/Cre.FC31

Estos clones se generaron a partir de las líneas celulares HEK293/Cre y N52.E6/Cre, las cuales contenían en su genoma la recombinasa Cre. La generación de la línea HEK-293/Cre.FC31 y N52.E6/Cre.FC31 se llevó a cabo en colaboración con el grupo del Dr. Rubén Hernández del centro CIMA, Navarra.

Para generar estos clones, se transfectó el plásmido pZeo-FC31 con resistencia a Zeozina en los clones HEK-293/Cre y N52.E6/Cre. Tras varios días con selección al antibiótico y pasos de amplificación, se aislaron los clones resistentes y se analizó la actividad de la recombinasa Φ C31 por RT-PCR (Transcripción Reversa-PCR). El clon escogido fue aquel que obtuvo una mayor actividad para el *test* de RT-PCR por Φ C31 (*test* realizado en el laboratorio del Dr. Rubén Hernández).

3.3. Análisis de la actividad de las recombinasas Cre y Φ C31

Inicialmente se comparó la capacidad de producción de las líneas celulares generadas. Para ello, se tituló un Ad control (Ad5/ β -gal) crecido a las 36 horas (MOI=5) en las líneas HEK293, HEK293/Cre y HEK293/Cre.FC31.

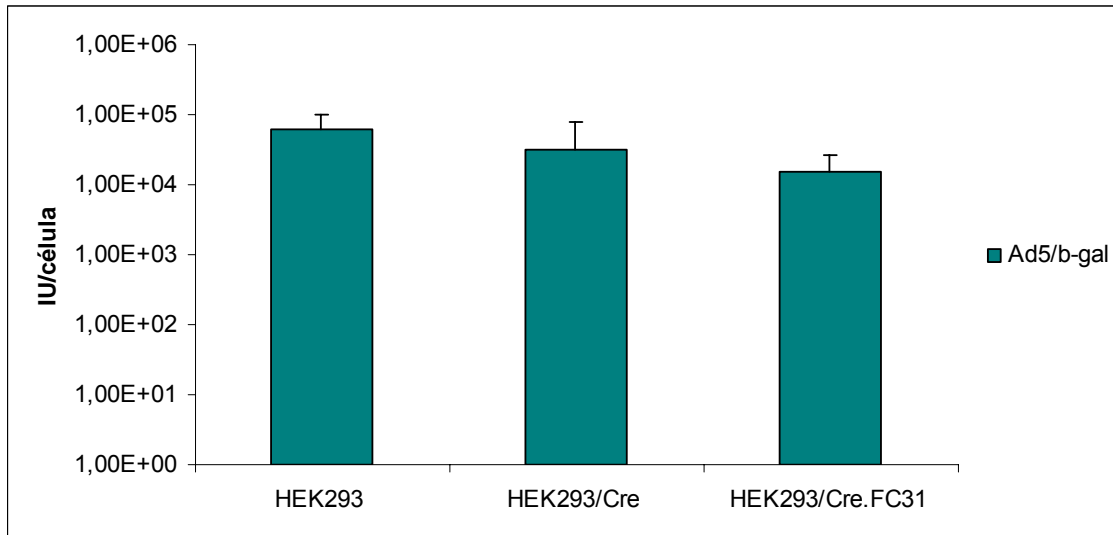


Figura 40. Análisis del título infeccioso del Ad5/β-gal a las 36 horas en las líneas celulares HEK293, HEK293/Cre y HEK293/Cre.FC31.

Como se observa en la figura 40, el adenovirus Ad5/β-gal se propaga en el mismo orden de magnitud en todos los clones analizados (HEK293, HEK293/Cre y HEK293/Cre.FC31). De este modo, podemos afirmar que los clones generados presentan un potencial de producción similar a la línea celular control para generar vectores adenovirales.

Para analizar el efecto de las líneas celulares sobre los diferentes Ad *helper* generados, se titularon los adenovirus Ad5/*attP*, Ad5/FC31.*loxP*, Ad5/FC31 y Ad5/FC31.Cre crecidos en las líneas celulares HEK293, HEK293/Cre y HEK293/Cre.FC31 durante 36 horas.

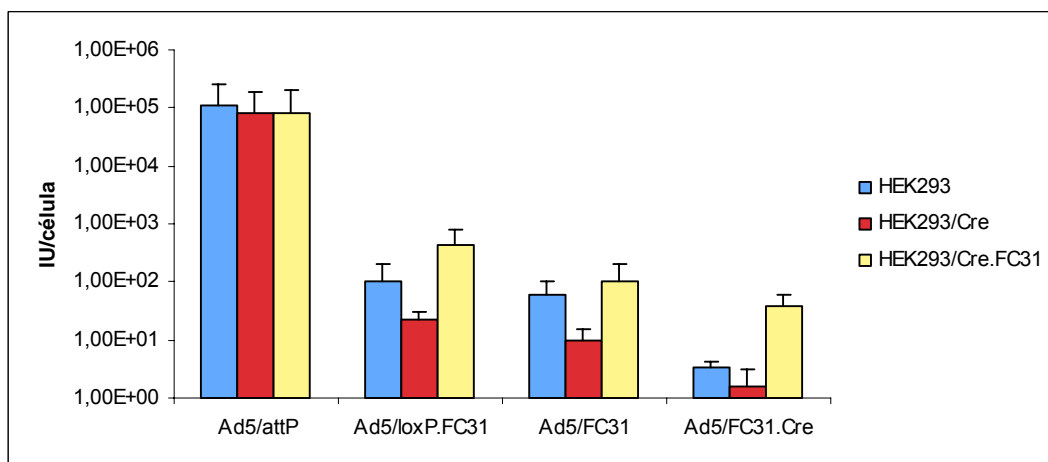


Figura 41. Análisis del título infeccioso en células HEK293 de los Adenovirus Ad5/*attP*, Ad5/FC31.*loxP*, Ad5/FC31 y Ad5/FC31.Cre crecidos en las líneas celulares HEK293, HEK293/Cre y HEK293/Cre.FC31 durante 36 horas.

IV. Resultados

El análisis del título infeccioso de los diferentes adenovirus muestra que, de forma general, los Ad *helper* muestran un título de 2 a 4 logaritmos inferior al del Ad control Ad5/*attP*, en todas las líneas celulares analizadas. En el caso de la línea celular HEK293/Cre, los títulos disminuyeron en todos los virus *helper* generados, en especial, en el adenovirus Ad5/FC31.Cre, portador de ambas secuencias *loxP* flanqueando su señal de empaquetamiento. El análisis de la producción de la línea celular HEK293/Cre.FC31 ofrece resultados contradictorios ya que los Ad *helper* parecen crecer con mayor eficiencia que no en la línea celular control HEK293. Aun y así, todos los Ad *helper* generados presentan del orden de 2 a 4 logaritmos menos en la producción de partículas infecciosas en comparación al Ad control.

3.4 Análisis de la actividad de escisión de la señal de empaquetamiento de los diferentes Ad *helper* por Southern Blot

Para comprobar si los clones celulares generados HEK293/Cre.FC31 y N52.E6/Cre.FC31 presentaban actividad para la recombinasa Cre y Φ C31 se crecieron los Adenovirus Ad5/RFP, Ad5/FC31 y Ad5/FC31.Cre durante 56 horas en placas de 15 cm (2E7 células). Para determinar específicamente la actividad de escisión de las recombinasas Cre y Φ C31 se realizó un Southern Blot contra el ITR de los Ad *helper* y controles generados. Se extrajo el genoma viral de estas muestras cogiendo un 10% de la muestra (2 mL) según el protocolo 6.4.1. y a continuación, se utilizó la técnica de Southern Blot para separar y visualizar las bandas de interés tal y como se detalla en el punto 6.4.3. La sonda utilizada se extrajo mediante la digestión del plásmido pTG-6600 con los enzimas *BsiW* I y *SpeI*, aislando la banda de 181 pb. Los genomas virales *helper* fueron digeridos por la diana *EcoRV* y el Ad control Ad5/RFP por la diana *HindIII*. La banda esperada para el Ad control Ad5/RFP es de 5303 pb, mientras que para el Ad *helper* Ad5/FC31 es de 7952 y 5930 pb y para el Ad5/FC31.Cre de 8296 y 6112 pb (genoma completo y sin Ψ respectivamente). La escisión siempre comporta la eliminación de la señal de empaquetamiento conjuntamente con el *cassette* de expresión de la proteína GFP de aproximadamente 1.6 Kpb.

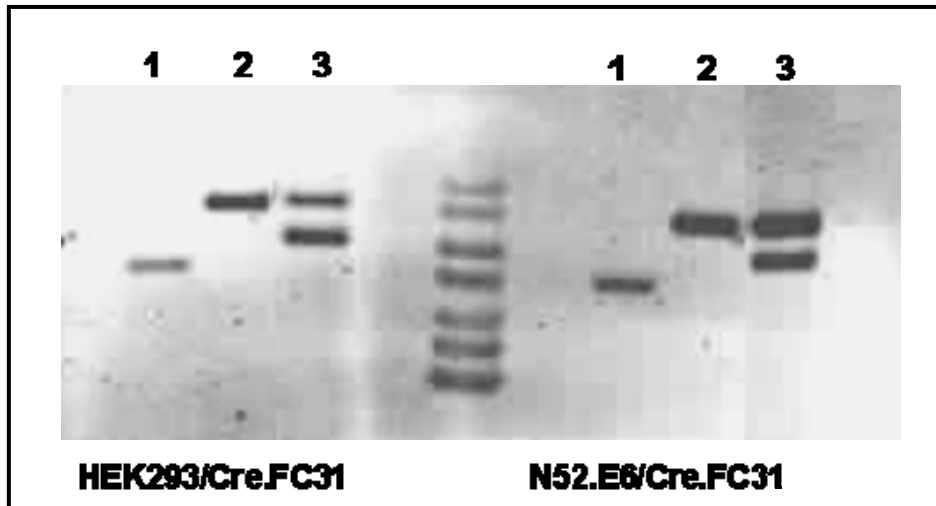


Figura 42. Southern Blot de los adenovirus Ad5/RFP (carril 1), Ad5/FC31 (carril 2) y Ad5/FC31.Cre (carril 3) crecidos en las líneas celulares HEK293/Cre.FC31 y N52.E6/Cre.FC31.

Tal y como se observa en la figura 42, la recombinasa Φ C31 no es capaz de eliminar la señal Ψ del Ad5/FC31 cuando se crece en líneas que expresan Φ C31. En cambio, sí se puede escindir la señal Ψ del adenovirus Ad5/FC31.Cre. La escisión tanto puede ser por la acción de la recombinasa Cre, por Φ C31 o ambas a la vez. Como el Ad *helper* Ad5/FC31 no ha escindido su señal Ψ y como estos clones ya contenían actividad para Cre, es probable que únicamente actúe la recombinasa Cre. Por sus características en cuanto a la escisión de la señal Ψ , el Ad5/FC31.Cre presenta una ventaja selectiva frente al Ad5/FC31. En cuanto a las líneas celulares, el porcentaje de escisión de la línea HEK293/Cre.FC31 es del **69.3%** mientras que en la línea N52.E6/Cre.FC31 solamente alcanzó el **30.85%**. Como los Ad fueron crecidos durante 56 horas, estos valores son orientativos en cuanto a la actividad final que tendrían estas líneas celulares si se crecieran los Ad durante 36 horas.

3.5 Análisis de escisión de Ψ en el adenovirus *helper* Ad5/FC31.Cre

Para comprobar cuál de las dos recombinasas realizaba su acción sobre las secuencias de recombinación que flanquean la señal de empaquetamiento del adenovirus Ad5/FC31.Cre, se recortó la banda de la escisión de 6112 pb de la figura 42 y se secuenció con un cebador localizado entre los nucleótidos 140 y 160 del ITR.

IV. Resultados

El análisis de la secuenciación confirmó que la única recombinasa que actúa es la recombinasa Cre ya que la secuencia de recombinación *attB* quedó intacta.

4. Amplificación de Ad *gutless*

Para la amplificación de Ad *gutless* se utilizaron los plásmidos pFK7 y pKCZ o pGS46 cedidos por el Dr. Stefan Kochanek (Universidad de Ulm, Alemania). El plásmido pFK7 contiene un *cassette* para el gen GFP y el plásmido pKCZ un *cassette* para el gen de la beta-galactosidasa.

Por su menor capacidad de amplificación en células HEK293 y HEK293/Cre.FC31 se escogió el vector *helper* Ad5/FC31.Cre para realizar los ensayos de amplificación de Ad *gutless*. Uno de los objetivos era la visualización directa y conjunta del vector *helper* y *gutless* mediante microscopía de fluorescencia. Como el Ad *gutless* pFK7 contenía un *cassette* para GFP, se decidió intercambiar el *cassette* de GFP por un *cassette* de RFP en el Ad *helper* Ad5/FC31.Cre.

4.1 Construcción del plásmido pRAF3.2ΔE1-RFP

El intercambio del *cassette* de GFP por el gen de RFP se realizó mediante el plásmido pDsRed2-Mito (Clontech) digerido por las dianas *EcoRI* y *Sall*. La banda del RFP fue clonada en el plásmido pRAF3.2ΔE1 digerido por las dianas *EcoRI* y *Sall*, extrayendo el *cassette* de GFP. De este modo se generó el plásmido pRAF7.1ΔE1. El gen de RFP presentaba una señal de localización mitocondrial.

Para expresar también el gen de RFP en el citoplasma y, de este modo, amplificar su señal de fluorescencia en la célula, se decidió amplificar el *cassette* de RFP evitando el “*tag*” para la mitocondria. Así, se diseñaron los cebadores RFP-DIR y RFP-REV para amplificar una banda de 1 Kpb aproximadamente que correspondía al *cassette* de RFP con el polyA del SV40. Para la amplificación, se utilizó el kit “*high fidelity*” (Invitrogen). Se realizaron 30 ciclos de amplificación siguiendo las instrucciones del punto 3.3 de material y

métodos. Una vez amplificada la banda se clonó en el plásmido comercial pGEMT-*easy* (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante para generar el plásmido pGEMT-RFP-cito. El plásmido pRAF3.2ΔE1 y el plásmido pGEMT-RFP-cito fueron digeridos por las dianas *Sall* y *HindIII* para extraer la banda del *cassette* de GFP y clonar en su lugar la banda del gen RFP (935 pb) para generar así el plásmido pRAF6.1ΔE1. Una vez generados los plásmidos lanzadera pRAF6.1ΔE1 y pRAF7.1ΔE1, éstos fueron digeridos por diferentes dianas exteriores a la zona de de incorporación (*Fspl*, *XmnI* y/o *Asel*) mientras que el plásmido pKP1.4ΔCMV lo fue por la diana *Swal*. Al realizar la recombinación homóloga en células BJ5183, se generaron los siguientes genomas *helper*: pAd5/FC31.Cre-RFPc y pAd5/FC31.Cre-RFPm (figura 43).

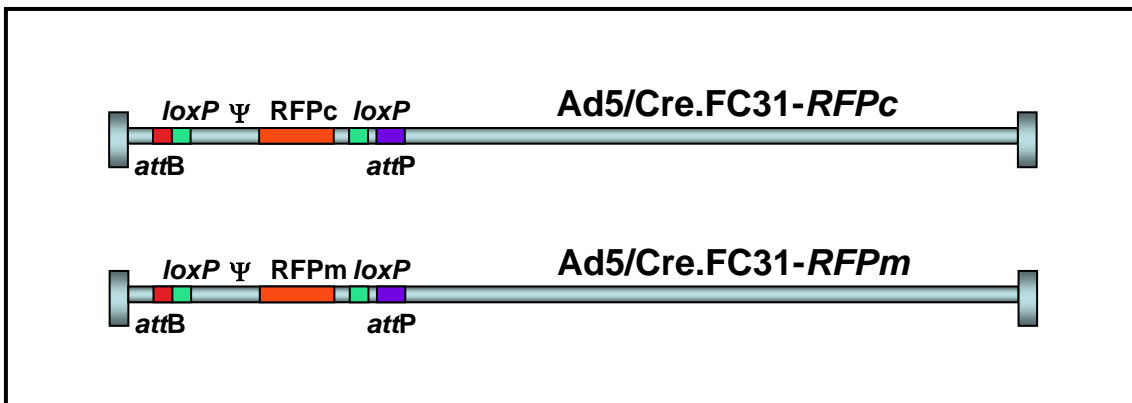


Figura 43. Esquema de las diferentes construcciones de genomas adenovirales *helper* con *cassette* de RFP y sistema de restricción de Cre y ΦC31. Los gráficos no están a escala real.

4.2 Amplificación del vector *gutless*

Para amplificar Ad *gutless* existen distintas variables que se han de tener en cuenta. Entre otras: a) diferentes vectores *helper* según sus secuencias de recombinación o genes marcadores, b) diferentes líneas celulares con o sin recombinasas, c) diferentes cantidades de plásmido a transfectar, d) diferentes concentraciones de virus a administrar y e) diferentes tiempos de producción para los distintos pasos de amplificación.

Para amplificar el vector pKCZ (β-gal), el vector *helper* utilizado fue Ad5/FC31.Cre mientras que para amplificar el vector pFK7 el vector utilizado fue Ad5/FC31.Cre-RFPc.

IV. Resultados

En los primeros pasos de producción, la capacidad de amplificación del plásmido *helper* está disminuida considerablemente en comparación a los Ad controles. Si la secuencia *attB* es la principal o única responsable del retraso viral, en los primeros pasos de amplificación no hace falta utilizar líneas celulares con recombinasas, con lo que se evita, de este modo, la selección positiva de mutantes para las secuencias de recombinación por el uso de la recombinasa, problema de especial importancia ya conocido durante la generación de Ad *gutless* por el sistema Cre-*loxP*. Por ello, en el primer paso de amplificación se utilizará la línea HEK293.

El tiempo de producción no debe ser elevado para dificultar así el empaquetamiento del Ad *helper*. Sin embargo, debe de ser el suficiente para permitir la producción del Ad *gutless* con la mínima contaminación de Ad *helper*.

Cuando se inicia la producción del Ad *gutless*, generalmente se utiliza una co-transfección de plásmidos como primer paso de amplificación. Alternativamente, se puede utilizar también una infección con Ad *helper*. La cantidad de Ad *helper* no debería ser superior a una MOI=5 ya que esta dosis es suficiente para infectar el 80-90% de las células y no debería ser inferior a una MOI=1 ya que se perdería parte de la producción de Ad *gutless* si no se consigue aportar los Ad *helper* suficientes. En los siguientes pasos de amplificación, la dosis de Ad *helper* que se debe de administrar dependerá del aporte de Ad *helper* que provenga del paso anterior.

4.2.1 Producción de Ad *gutless* en función de la dosis de plásmido utilizado

En experimentos previos, se determinó la cantidad de 6 microgramos de ADN como la cantidad idónea para transfectar 1E6 células HEK293 mediante PEI. Para determinar la relación óptima entre los plásmidos pKCZ y pAd5/FC31.Cre se transfectaron diferentes dosis en relación *Helper:Gutless* de 1:5, 3:3 y 5:1 en células HEK293 durante 36 horas (n=3).

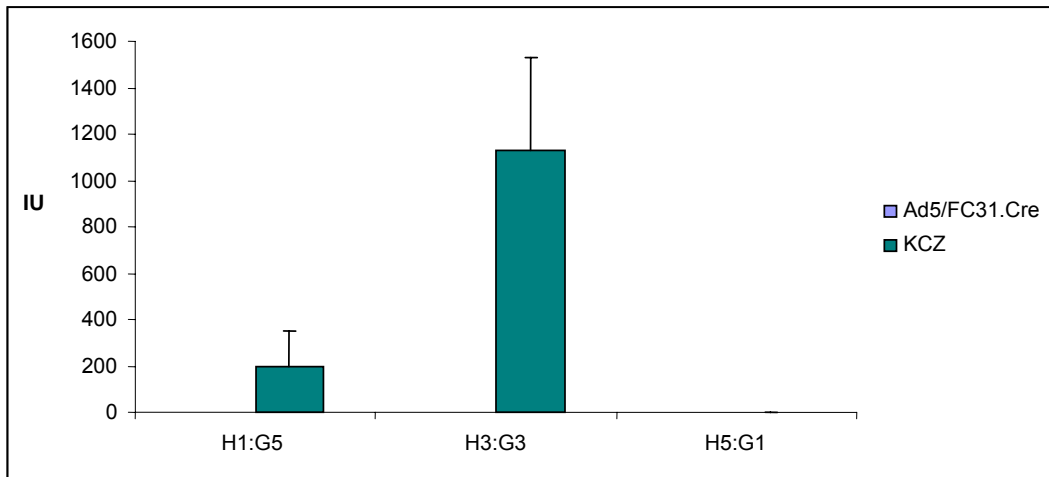


Figura 44. Título infeccioso del plásmido pKCZ con el plásmido pAd5/FC31.Cre crecido en HEK293 durante 36 horas

Los resultados de transfección indicaron que la relación *helper:gutless* óptima es de 3:3 (figura 44). Asimismo, se pudo observar que el Ad *helper* es capaz de aportar las proteínas virales necesarias para producir Ad *gutless* en las primeras 36 horas de su ciclo viral, incluso desde la transfección de plásmidos. Además, como ya se había predicho, la producción de Ad *helper*, desde plásmido, a las 36 horas fue nula. Para asegurar que en este primer paso no se generaba ninguna partícula Ad *helper* infecciosa, se analizó toda la muestra sobre 1E6 células.

4.2.2 Transfección de Ad *gutless* a las 40 y 60 horas

Para comprobar la importancia del tiempo en la producción de Ad *gutless*, se estudió si la concentración de Ad *gutless* aumentaba a un número mayor de horas. Así, se transfectaron los plásmidos pKCZ y pAd5/FC31.Cre con relación 3:3 en 1E6 células HEK293 (n=3). Las muestras fueron recogidas a las 40 y 60 horas, pasaron por 3 ciclos de congelación/descongelación y fueron tituladas (todo el contenido) sobre 1E6 células.

IV. Resultados

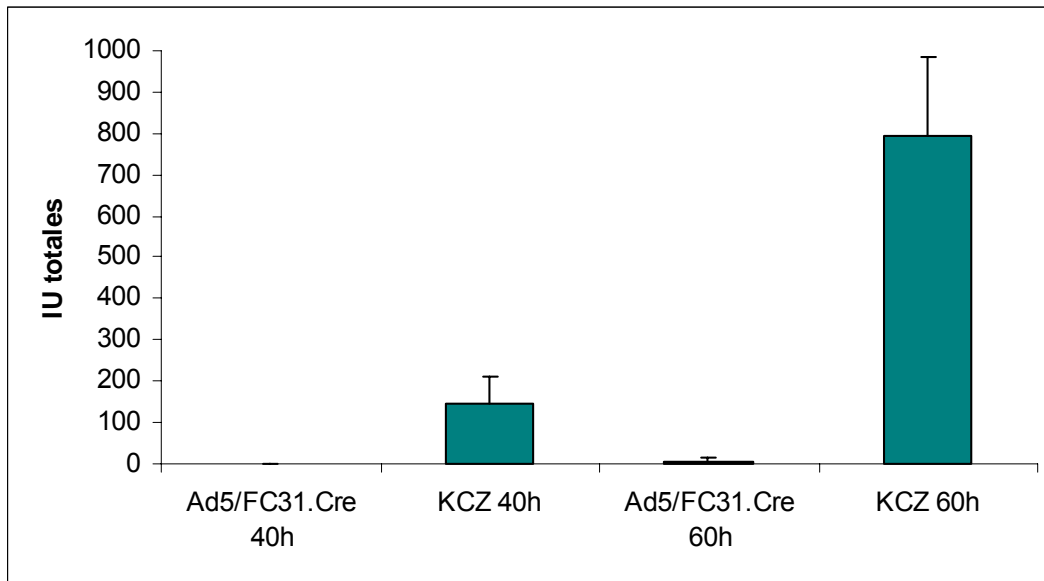


Figura 45. Producción de pKCZ (*gutless*) con el plásmido pAd5/FC31.Cre (*helper*) crecido hasta las 40 y 60 horas en células HEK293.

Como muestra la figura 45, el plásmido pAd5/FC31.Cre permite la producción de partículas infecciosas de Ad *gutless* KCZ sin promover la generación de partículas infecciosas de Ad5/FC31.Cre a las 40 horas, tal y como se había observado en la figura 44. Además, a las 60 horas, la cantidad de Ad *gutless* aumenta 5 veces respecto a las 40 horas y es 50 veces mayor al Ad *helper* Ad5/FC31.Cre.

De igual modo, se utilizaron los plásmidos pAd5/FC31.Cre-RFPc y el pFK7 con resultados similares a los encontrados en la figura 45. Con estos plásmidos se pudo visualizar, por microscopía de fluorescencia, la propagación de ambos vectores al mismo tiempo.

4.2.3 Amplificación de Ad *gutless* desde plásmido y virus

Para saber si el Ad *gutless* podría ser amplificado con mayor eficiencia con la administración de virus *helper*, se realizó un experimento de transfección de los plásmidos pKCZ + pAd5/FC31.Cre con una relación 3:3. Asimismo, en paralelo, se realizó una transfección de 3 microgramos del plásmido pKCZ más virus Ad5/Cre.FC31 con una MOI=5 (n=2). Las muestras fueron recogidas a las 40 horas y tituladas bien por dilución límite en el caso del experimento con

virus, bien toda la muestra sobre 1E6 células HEK293 en el caso de la co-transfección de plásmidos.

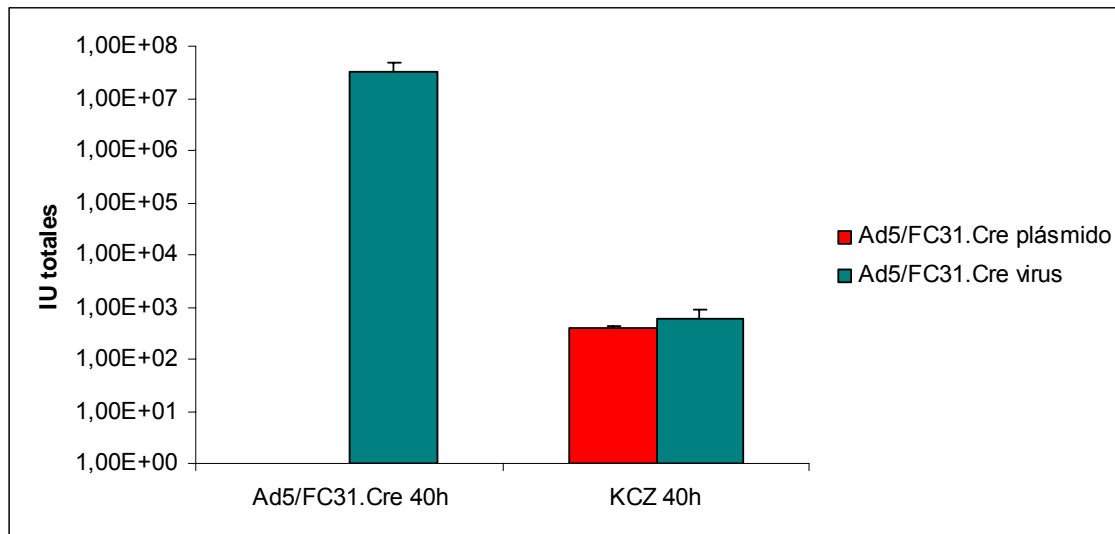


Figura 46. Amplificación diferencial del plásmido pKCZ con el virus y plásmido *helper* Ad5/FC31.Cre.

La figura 46 muestra que el uso del virus *helper* no es beneficioso para la producción de Ad *gutless*, incluso a las 40 horas, ya que aunque genera prácticamente el mismo número de partículas infecciosas *gutless* que el plásmido *helper*, permite la generación de partículas *helper* infecciosas.

4.3 Amplificación de Ad *gutless*: Primer paso de amplificación

Aunque la concentración por Ad *helper* es nula en comparación al Ad *gutless* a las 60 horas, la cantidad total de partículas infecciosas es muy baja para infectar 1E6 células en un segundo paso de amplificación (MOI=0.001). Por esta razón y conociendo que los plásmidos de Ad *helper* necesitan de varios ciclos para amplificarse, se decidió aumentar la producción de Ad *gutless* en el primer paso de transfección aumentando el número de horas hasta 168-240 horas. Estos estudios previos mostraron que se podía aumentar considerablemente la producción de Ad *gutless* con una baja contaminación por Ad *helper* (figura 47). Para realizar el primer paso de amplificación se decidió mantener la relación 3:3 de los plásmidos pAd5/FC31.Cre-RFPc y pFK7 y utilizar la línea HEK293 con un tiempo de producción de 240 horas.

IV. Resultados

De este modo, la concentración de Ad *gutless* obtenida fue de $7.5E5$ IU/mL Vs $1E5$ IU/mL para el Ad *helper* en 6 mL de volumen final.

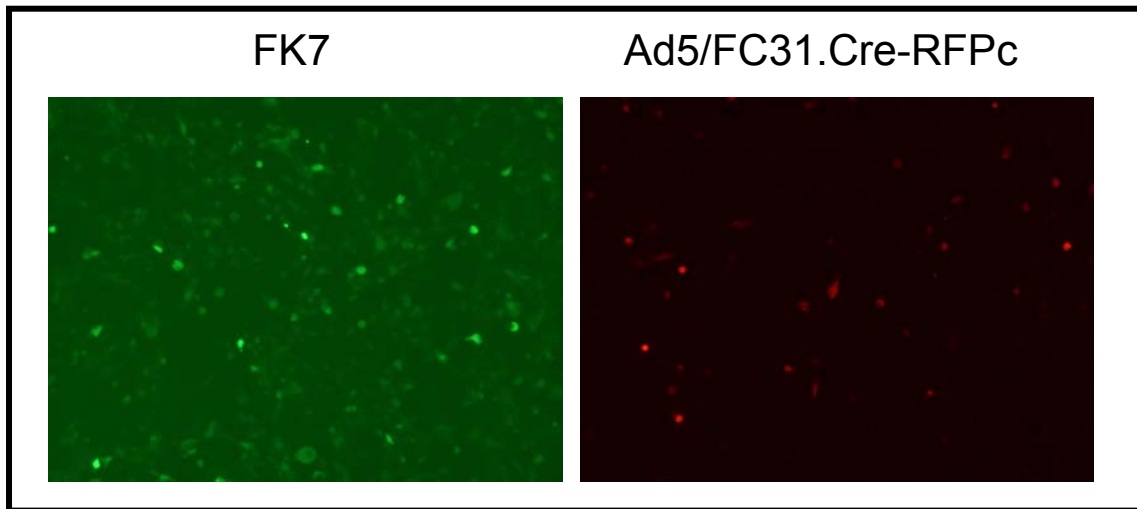


Figura 47. Primer paso de amplificación del vector *gutless* FK7 con el vector *helper* Ad5/FC31-RFPc a las 240 horas tras la transfección en células HEK293.

Así pues, la concentración de Ad *helper* ha aumentado respecto las 40 horas. Sin embargo, todavía no es una concentración lo suficientemente alta para amplificar el Ad *gutless* en el siguiente paso de amplificación. Por ello, este primer paso de producción puede ser una buena estrategia para amplificar el Ad *gutless* ya que mantiene 7.5 veces más el nivel del Ad *gutless* respecto al Ad *helper*.

4.4 Amplificación de Ad *gutless*: Segundo paso de amplificación

Tras el primer paso de amplificación se decidió utilizar el 50% de la muestra para infectar una $10E7$ células HEK293 más Ad *helper* Ad5/FC31.Cre-RFPc (MOI=2). Tras 40 horas de amplificación, se recolectaron células + sobrenadante, se realizaron 3 ciclos de congelaciones/descongelaciones y se tituló la muestra por dilución límite y microscopía de fluorescencia para detectar los *cassettes* de GFP y RFP (figura 48).

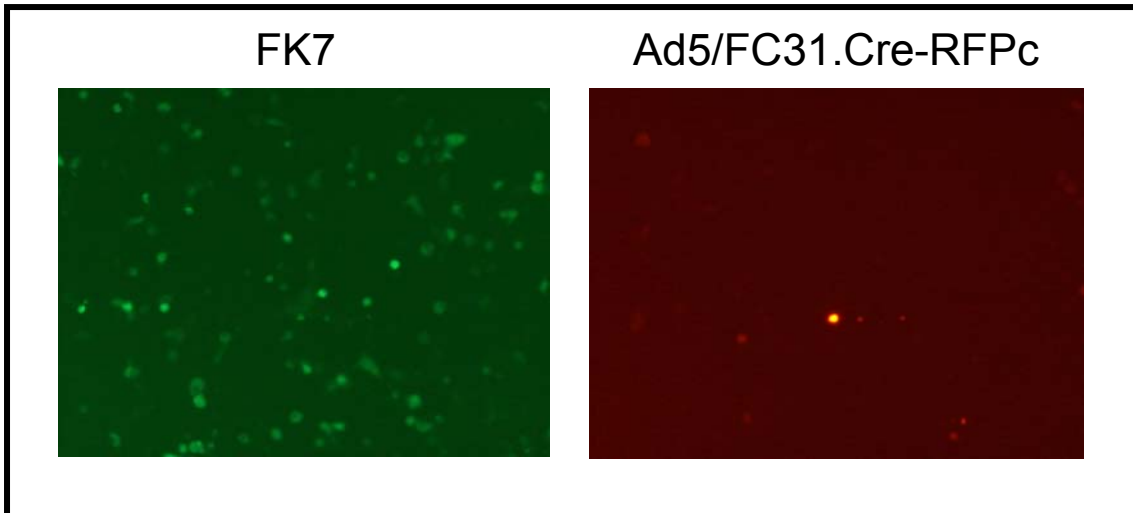


Figura 48. Segundo paso de amplificación del vector *gutless* FK7 con el vector *helper* Ad5/FC31-RFPc (MOI=2) a las 40 horas tras su infección en células HEK293.

Tras el segundo paso de amplificación y su posterior titulación se obtuvo una concentración de $1E6$ IU/mL de Ad *gutless* FK7 y $5E5$ IU/mL de Ad *helper* Ad5/FC31.Cre-RFPc en un volumen final de 10 mL.

4.5 Amplificación de Ad *gutless*: Tercer paso de amplificación

Todo el contenido del paso 2 se utilizó en el 3^{er} paso de amplificación sobre $4E7$ células HEK293 sin utilizar virus *helper*.

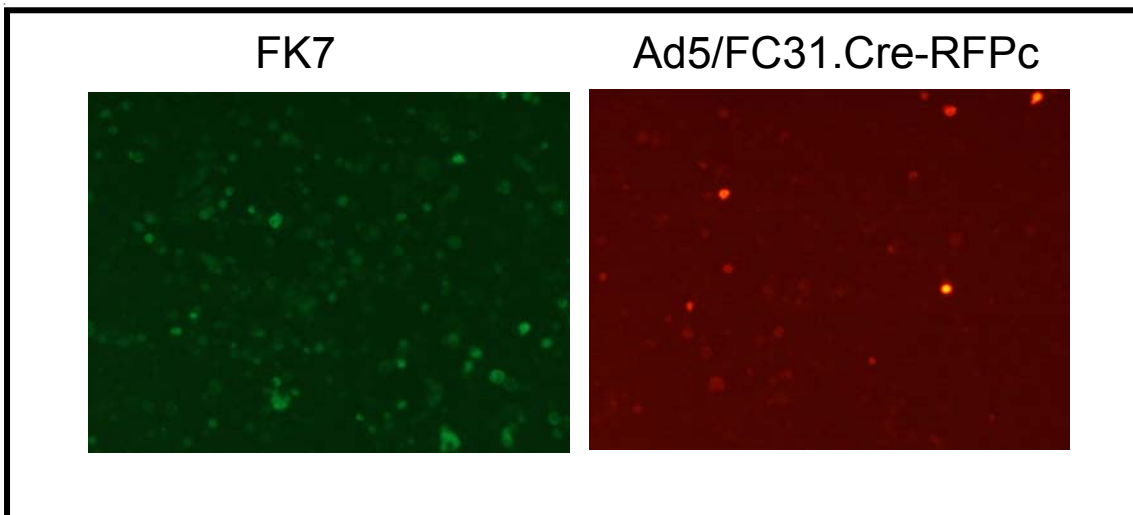


Figura 49. Tercer paso de amplificación del vector *gutless* FK7 con el vector *helper* Ad5/FC31-RFPc (MOI=2) a las 40 horas tras su infección en células HEK293.

El título obtenido en el 3^{er} paso de amplificación aumentó considerablemente siendo de $1E9$ IU/mL para el Ad *gutless* pero la contaminación de Ad *helper* fue parecida a la producción de *gutless* obteniendo una concentración de $6E8$

IV. Resultados

IU/mL en un total de 35 mL. Con este paso se obtuvo muestra suficiente para una producción estándar de 20 placas de 15 cm.

4.6. Paso final de amplificación de Ad *gutless*

4.6.1 Amplificación de Ad *gutless*: Paso final de amplificación en células HEK293

Para realizar la producción final se infectaron 20 placas de 15 cm de células HEK293 al 80% de confluencia con un total de $6E8$ células. Se utilizaron $100\ \mu\text{l}$ del paso 3 ($1E8$ IU FK7) y no se añadió más Ad *helper* Ad5/FC31.Cre-RFPc a la muestra ya que había suficientes partículas *helper* provenientes del paso anterior ($6E7$ IU). A las 34 horas tras su infección, se recolectaron las células en 40 mL del sobrenadante y se realizaron 3 ciclos de congelaciones/descongelaciones y 3 centrifugaciones en CsCl para separar la banda correspondiente a los viriones maduros. La 3ª centrifugación se realizó para separar cualquier posible banda correspondiente a un intermedio de maduración.

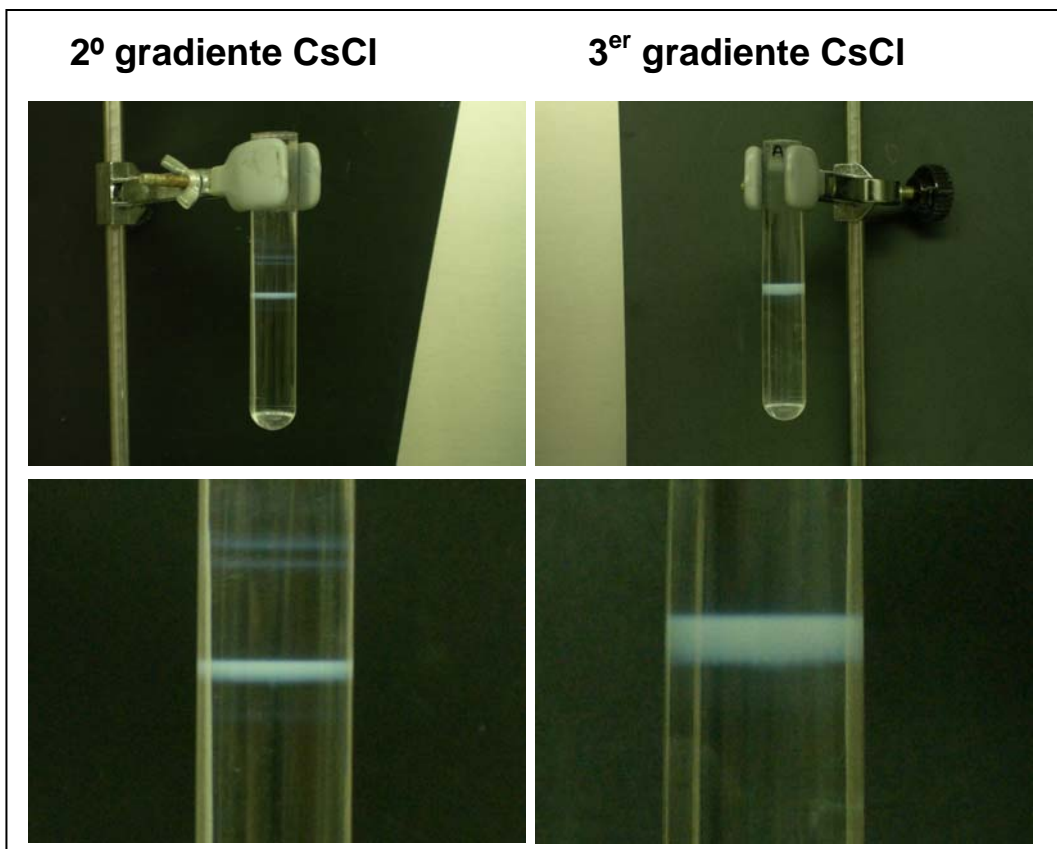


Figura 50. Segunda y tercera ultracentrifugación en gradiente de CsCl del Ad *gutless* FK7 crecido en HEK293.

Una vez purificada la banda, se tituló y se obtuvo una concentración de Ad *gutless* de $1.6E9$ IU/mL y una concentración de Ad *helper* de $6.4E9$ IU/mL en 3.3 mL de volumen final por lo que, en el último paso de amplificación, el Ad *helper* superó en concentración 4 veces a la concentración del Ad *gutless*.

4.6.2 Amplificación de Ad *gutless*: Paso final de amplificación en células HEK293/Cre

Debido a que la concentración de Ad *helper* superó a la concentración de Ad *gutless* en el último paso de amplificación, se decidió utilizar la línea restrictiva HEK293/Cre para intentar frenar el crecimiento del Ad *helper*. Se utilizó la misma concentración de muestra del paso 3 (100 μ l) (punto 4.5) y un tiempo de producción de 34 horas.

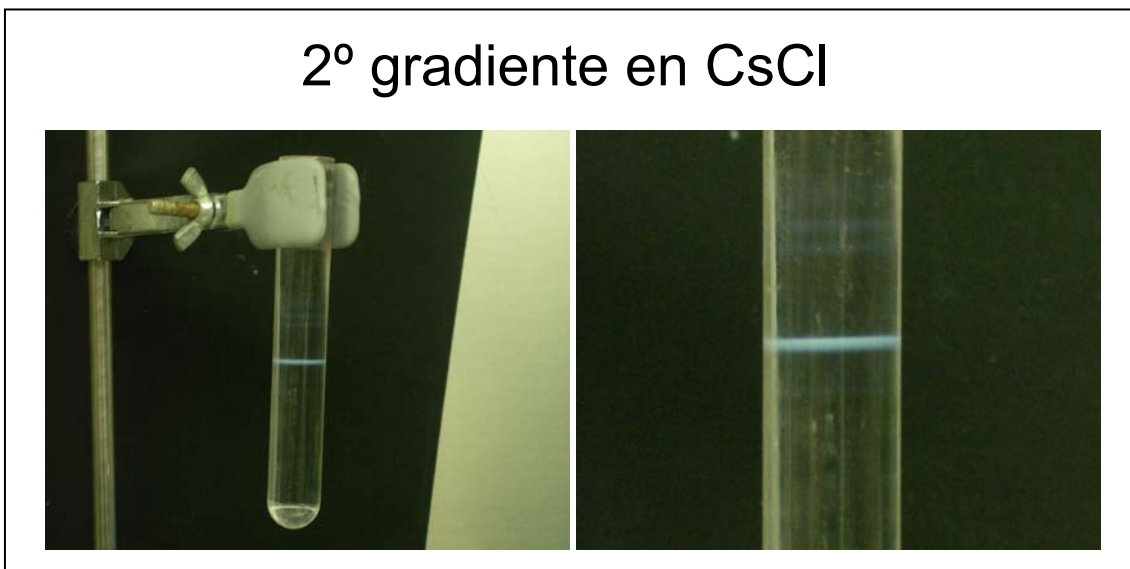


Figura 51. Segunda ultracentrifugación en gradiente de CsCl del Ad *gutless* FK7 crecido en HEK293/Cre a las 34 horas.

Sin embargo, después de purificar el virus en este segundo gradiente, de igual modo que en el punto 4.6.1, se obtuvieron resultados similares a los encontrados con las células HEK293 con un título infeccioso de Ad *gutless* de $6E8$ IU/mL y de Ad *helper* de $2E9$ IU/mL en un volumen final de 3.3 mL.

IV. Resultados

4.7 Resumen del proceso de amplificación del Ad *gutless* FK7 con el Ad *helper* Ad5/FC31.Cre-RFPc

Paso	Tipo celular utilizado	Virus o plásmido (H + G)	MOI de Ad <i>helper</i>	Nº de células infectadas	horas	Título <i>Helper</i> (IU/mL)	Título <i>Gutless</i> (IU/mL)	Ratio H:G
1	HEK293	PI + pl	-	6E6	240	1E5	7.5E5	1:7.5
2	HEK 293	V + v	2	1E7	40	5E5	1E6	1:2
3	HEK 293	V + v	-	4E7	40	6E8	1E9	1:1.6
4.1	HEK 293	V + v	-	4E8	34	6.4E9 (purificado)	1.6E9 (purificado)	4:1
4.2	HEK293/Cre	V + v	-	4E9	34	2E9 (purificado)	6E8 (purificado)	3.5:1

Tabla 3. Resumen del proceso de amplificación del Ad *gutless* FK7 con el Ad *helper* Ad5/FC31.Cre-RFPc.(H: *helper*, G: *Gutless*).

4.8 Análisis del genoma del Ad *helper* Ad5/FC31.Cre-RFPc en las producciones finales de Ad *gutless*

Al observar que la relación *helper:gutless* no había mejorado al utilizar la línea celular HEK293/Cre (tabla 3), se decidió analizar la población de Ad *helper* en el último paso de amplificación. Una de las posibles causas por las que el sistema de la recombinasa Cre no había reducido los niveles de Ad *helper*, podía ser por la recombinación entre las señales de empaquetamiento del Ad *gutless* y Ad *helper* durante el proceso de amplificación [244]. Si se da esta recombinación, el Ad *helper* perdería las secuencias *attB+loxP* clonadas a 5' de Ψ y podría propagarse sin restricciones.

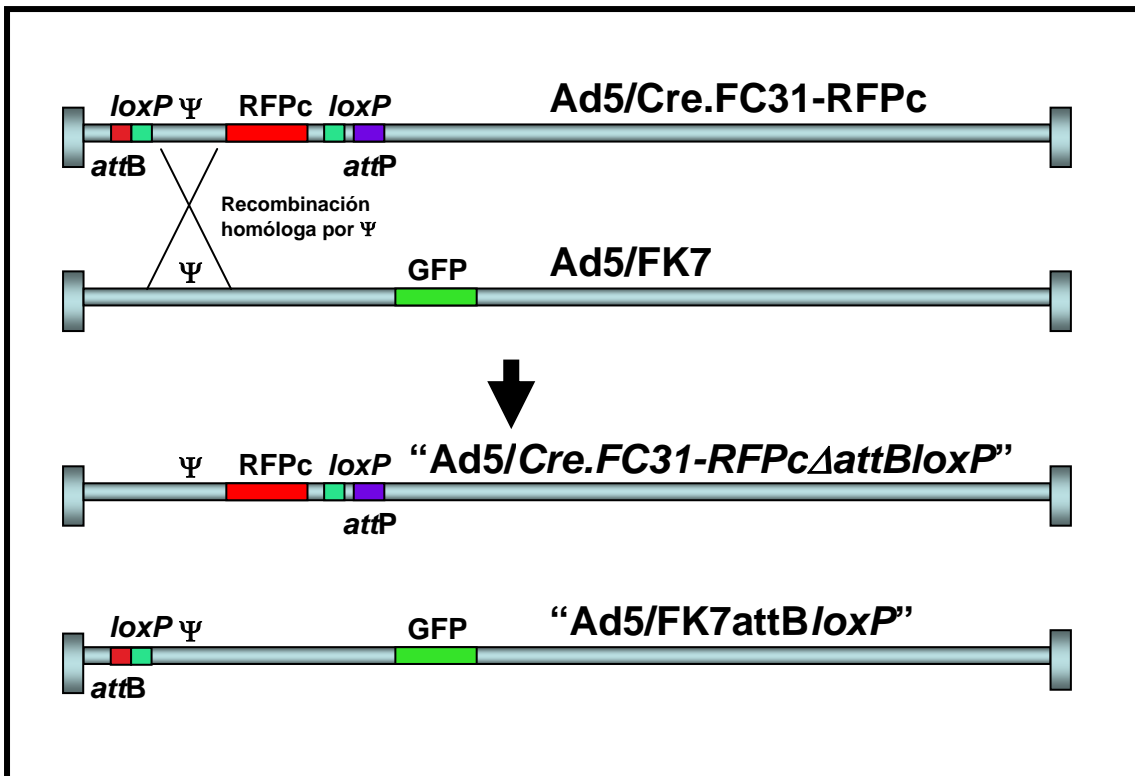


Figura 52. Esquema de la recombinación homóloga entre *Ad helper* y *Ad gutless* por la señal de empaquetamiento Ψ .

Para analizar los procesos de recombinación homóloga por la señal de empaquetamiento del *Ad helper* Ad5/FC31.Cre-RFPc, se diseñaron dos cebadores específicos para amplificar la señal Ψ desde el nucleótido 117 hasta el nucleótido 579. (Cebador Ad5140-160, Cebador PackRev). Si el *Ad helper* mantiene las secuencias *attB* y *attP* se amplificaría una banda de 462 pb mientras que si se da el proceso de recombinación homóloga, se perderían las señales *attB*+*loxP* (124 pb) y se amplificaría una banda de 338 pb.

Para ello, se realizó una PCR utilizando el kit "*high fidelity*" (Invitrogen). Se realizaron 35 ciclos de amplificación siguiendo las instrucciones del punto 3.3 de material y métodos. El genoma viral fue extraído de la cápside por calor (100°C, 15 minutos).

IV. Resultados

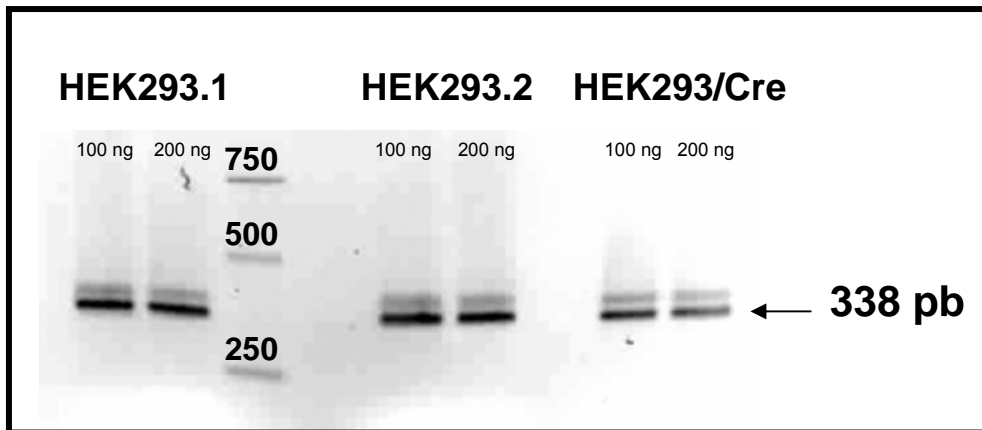


Figura 53. PCR de la señal Ψ del Ad *helper* ad5/FC31.Cre-RFPc en las preparaciones finales de Ad *gutless*. Se han utilizado 2 condiciones variando la concentración de ADN (100 y 200 ng) en la PCR para las líneas celulares HEK293 (2 producciones diferentes) y HEK293/Cre. La banda superior más tenue es un artefacto de PCR.

Tal y como se observa en la figura 53, la recombinación homóloga entre Ψ se dio en alguno o varios de los pasos de amplificación. En el último paso de amplificación solamente se observa amplificación del genoma *helper* sin las secuencias *attB+loxP*. Este dato confirma que el genoma con la secuencia de recombinación *attB* queda totalmente desplazado con respecto a los genomas que no poseen esta secuencia.

4.9 Análisis del extremo 5' del Ad *helper* en el proceso de producción de Ad *gutless*

Una vez analizadas las muestras del último paso de amplificación, se decidió analizar el extremo 5' de todos los pasos de producción. Se extrajo una muestra del lisado crudo de cada paso, se calentó a 100°C durante 15 minutos y se realizó una PCR con 5 μ l de cada muestra tal y como se detalla en el punto anterior 4.10.

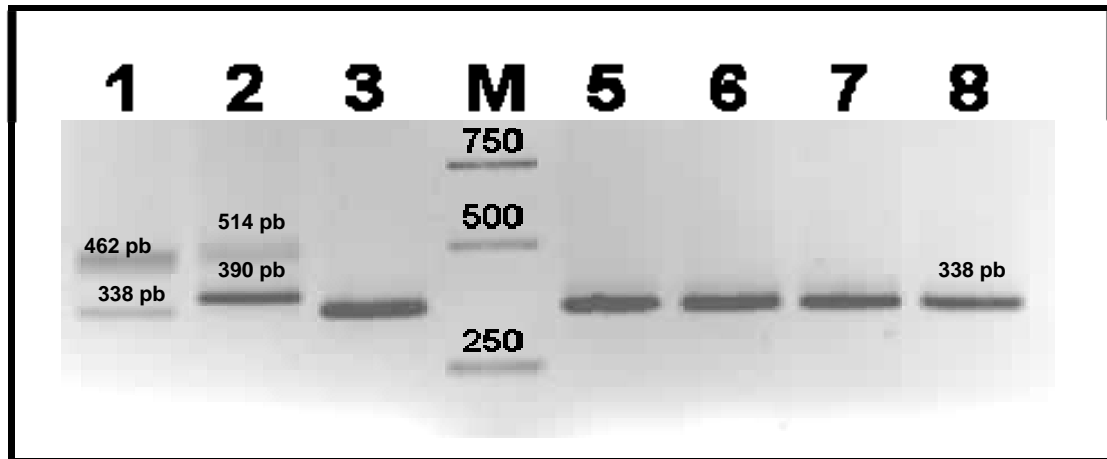


Figura 54. PCR del extremo 5' del lisado crudo de los pasos de amplificación del Ad gutless. Carril 1: paso1 (FK7+ Ad5/FC31.Cre-RFPc); carril 2: paso 1 (KCZ + Ad5/FC31.Cre); carril 3: paso 2 (FK7+ Ad5/FC31.Cre-RFPc); carril 4: Marcador 1Kb; carril 5: paso 3 (FK7+ Ad5/FC31.Cre-RFPc); carril 6: paso 3b (FK7+ Ad5/FC31.Cre-RFPc); carril 7: paso 4 en células HEK293 (FK7+ Ad5/FC31.Cre-RFPc); carril 8: paso 4.2 en células HEK293/Cre (FK7+ Ad5/FC31.Cre-RFPc).

Para confirmar el proceso de recombinación homóloga entre las señales de empaquetamiento de los Ad *helper* y Ad *gutless*, se analizó el extremo ITR del adenovirus (figura 54). En el primer paso de amplificación de Ad *gutless*, los Ad *helper* Ad5/FC31.Cre-RFPc (carril 1) y Ad5/FC31.Cre (carril 2) muestran dos bandas de aproximadamente una diferencia de 124 pb correspondiente a la pérdida de las secuencias *attB+loxP*. La banda del Ad5/FC31.Cre amplificado por PCR con los cebadores Ad5140-160 y PackRev tiene que dar una banda de 514 pb y si es el recombinante de 390 pb. En el caso del Ad5/FC31.Cre-RFPc tiene que dar una banda de 462 pb y si se eliminan las secuencias de recombinación *attB+loxP* una banda 338 pb. En los carriles 1 y 2 se observan las bandas esperadas evidenciando el proceso de recombinación. A partir del 2º paso de amplificación (carriles 3, 5, 6 y 8) solamente se observa la banda de 338 pb corroborando que únicamente se empaquetan aquellas cadenas que no contienen la señal *attB*.

4.10 Secuenciación de las bandas amplificadas

Para confirmar que lo que se había amplificado correspondía a la señal de empaquetamiento flanqueada por secuencias *attB* y/o *loxP*, se secuenciaron todas las bandas amplificadas y se observó que las bandas de 338 y 390 pb

IV. Resultados

correspondían a genomas recombinantes con la señal Ψ pero sin *attB* y/o *loxP* y las bandas de 462 y 514 pb correspondían a los genomas *helper* iniciales.

5. Inversión de la señal de empaquetamiento

Todos aquellos genomas *helper* que contengan la misma señal de empaquetamiento del Ad *gutless* pueden promover la recombinación entre señales Ψ y perder la restricción que el Ad *helper* posee. Por esta razón, se ha diseñado una estrategia basada en la inversión de la señal de empaquetamiento. De este modo, se pueden evitar/minimizar los posibles procesos de recombinación que eliminen la secuencia *attB* de los Ad *helper*.

La inversión de Ψ no debe suponer una desventaja para la producción de estos Ad ya que se ha reportado que la inversión de la señal Ψ no disminuye la eficiencia de empaquetamiento [103]. Aunque se ha publicado que la recombinación entre secuencias Ψ puede no ser el principal problema asociado a la producción de Ad *gutless*, si el sistema se basa en una restricción de empaquetamiento, este inconveniente se agrava en cada paso de amplificación. La recombinación homóloga entre secuencias Ψ de Ad *gutless* y Ad *helper* promueve el desplazamiento de todas aquellos genomas *helper* que mantienen la estructura del genoma *helper* inicial mientras que los genomas recombinantes van incrementando su porcentaje en cada paso de amplificación hasta que al final, solamente quedan los genomas sin la secuencia *attB*.

5.1 Generación de Ad *helper* con señal de empaquetamiento invertida

Para invertir la señal de empaquetamiento de los Ad *helper*, se amplificó la señal Ψ con los cebadores Ψ DIR*SalI* y Ψ REVA*AvrII* para introducir la diana de restricción *SalI* a 5' de la señal Ψ y la diana *AvrII* a 3'. De este modo, se pudo clonar la banda amplificada de 180 pb en el plásmido pGEMT-easy y así generar el plásmido pGEMT- Ψ . Este plásmido conjuntamente con el plásmido pRAF3.2 Δ E1 fue digerido por las dianas *SalI* y *AvrII* para intercambiar la señal Ψ por la misma señal Ψ invertida. De este modo, se generó el plásmido lanzadera pRAF9.1 Δ E1 que fue digerido por *Asel* mientras que el plásmido

pKP1.4 Δ CMV lo fue por la diana SwaI. Al realizar la recombinación homóloga en células BJ5183, se generó el genoma Ad5/FC31.Cre. Ψ^R (figura 55).

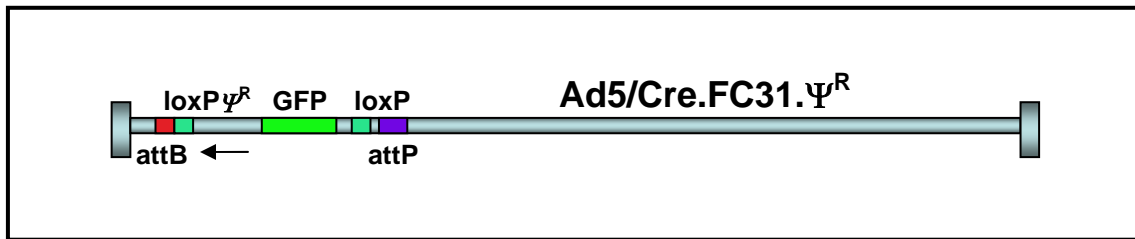


Figura 55. Genoma del Ad *helper* Ad5/Cre.FC31. Ψ^R . El gráfico no está a escala real.

5.2 Amplificación del Ad *helper* Ad5/FC31.Cre. Ψ^R

La amplificación de este vector fue realizada de igual modo que para los vectores Ad5.FC31.Cre hasta alcanzar una producción de 20 placas de 15 cm. El rendimiento final de la producción resultó en un título de 1.28E10 IU/mL (3.3 mL) y 1,012E12 PP/mL (proporción PP:IU = 79:1). Para confirmar que la señal de empaquetamiento estaba invertida, se secuenció el extremo 5' del Ad con el cebador Ad140-160 y se obtuvo la secuencia esperada.

5.3 Análisis del empaquetamiento del adenovirus Ad5/FC31.Cre. Ψ^R

Para comprobar si el empaquetamiento del Ad *helper* había perdido eficiencia al invertir la señal de empaquetamiento se decidió comparar sus niveles de producción de partículas infecciosas con respecto al Ad5/FC31.Cre. Para ello se infectaron 1E6 células HEK293 con los adenovirus Ad5/FC31.Cre + Ad5/FC31.Cre-RFPm y por otro lado, los adenovirus Ad5/FC31.Cre. Ψ^R + Ad5/FC31.Cre-RFPm (MOI=5 y n=3).

IV. Resultados

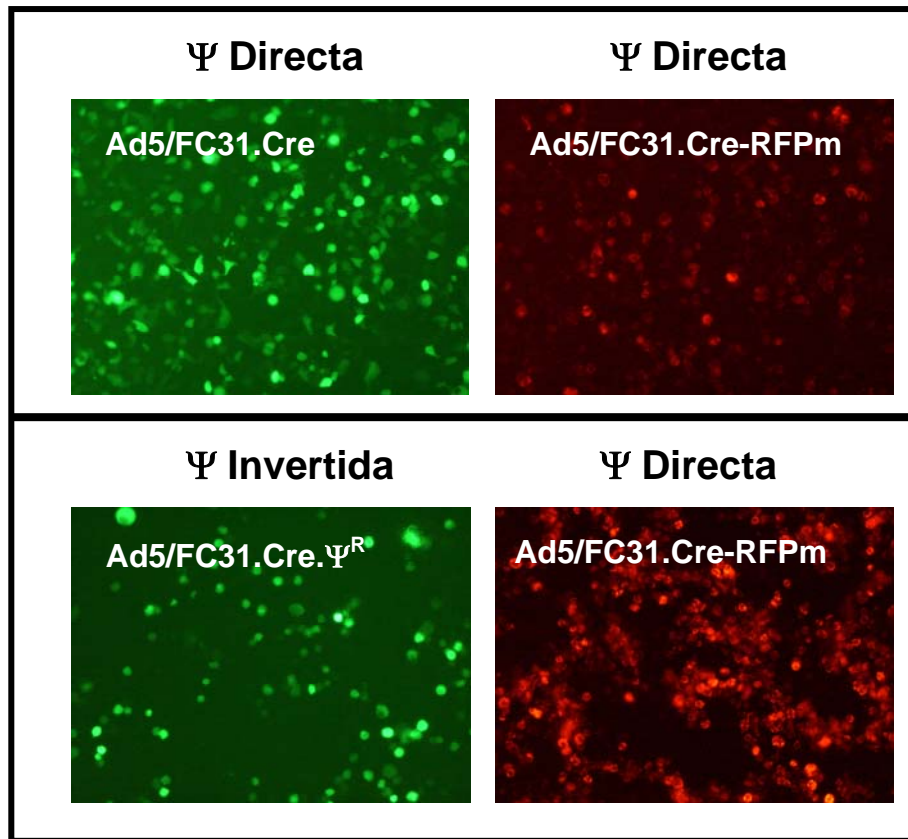


Figura 56. Análisis del empaquetamiento del Ad5/FC31.Cre.Ψ^R con respecto al Ad5/FC31.Cre en células HEK293.

Tal y como se observa en las figuras 56 y 57, el título del adenovirus Ad5/FC31.Cre.Ψ^R está claramente disminuido casi 10 veces en comparación a su Ad *helper* homólogo Ad5/FC31.Cre con la señal Ψ directa.

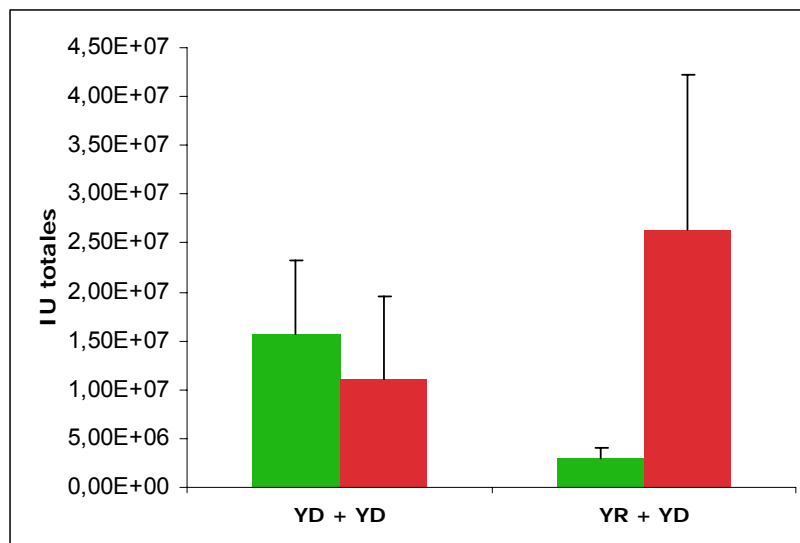


Figura 57. IU totales del Ad5/FC31.Cre.Ψ^R con respecto al Ad5/FC31.Cre, co-infectados ambos con el Ad5/FC31-RFPm en células HEK293. YD: Ad *helper* con la señal Ψ directa, YR: Ad *helper* con la señal Ψ invertida.

5.3 Análisis de la recombinación homóloga por Ψ del Ad5/FC31.Cre. Ψ^R con el Ad control ad5/RFP

Para comprobar que el Ad *helper* generado Ad5/FC31.Cre. Ψ^R evita la pérdida de sus señales *attB+loxP* durante su crecimiento conjuntamente con otros Ad, se decidió amplificar el vector *helper* conjuntamente con un Ad control (Ad5/RFP) y analizar la posible recombinación homóloga que puede darse entre su señal de empaquetamiento y la del Ad control Ad5/RFP durante varios ciclos de amplificación. Además, como control del proceso de amplificación, se creció el Ad *helper* Ad5/FC31.Cre (señal Ψ directa) con el Ad control Ad5/RFP. Para ello, se infectaron 1E6 células HEK293 con el vector *helper* Ad5/FC31.Cre. Ψ^R y Ad5/FC31.Cre, por separado, con el Ad control Ad5/RFP (MOI=5, n=3) durante 36 horas. De cada amplificación, se utilizaron 20 μ l para infectar 1E6 células HEK293 (n=3) en el siguiente paso de amplificación.

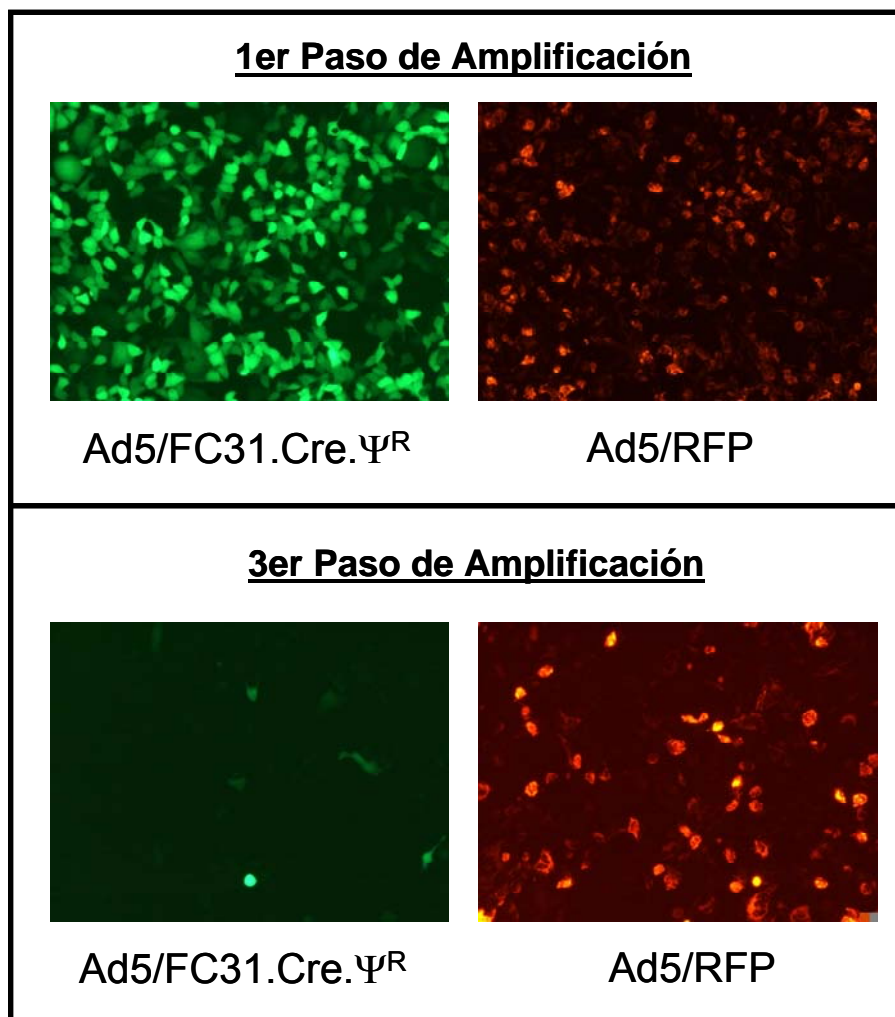


Figura 58. Co-infección de los vectores virales Ad5/RFP y Ad5/FC31.Cre. Ψ^R durante 36 horas. Fotos tomadas a las 24 horas tras la infección, correspondientes al mismo campo.

IV. Resultados

Durante los diferentes pasos de amplificación, el Ad control Ad5/RFP desplazó tanto al Ad *helper* Ad5/FC31.Cre. Ψ^R (figura 58) como al Ad *helper* Ad5/FC31.Cre en cuanto al número total de unidades de infección. De cada paso de amplificación se aislaron 100 μ l de lisado crudo que fueron calentados a 100°C durante 15 min y se realizó una PCR con los cebadores ITR5' y PackRev más 5 μ l de cada muestra tal y como se detalla en el punto anterior 4.10.

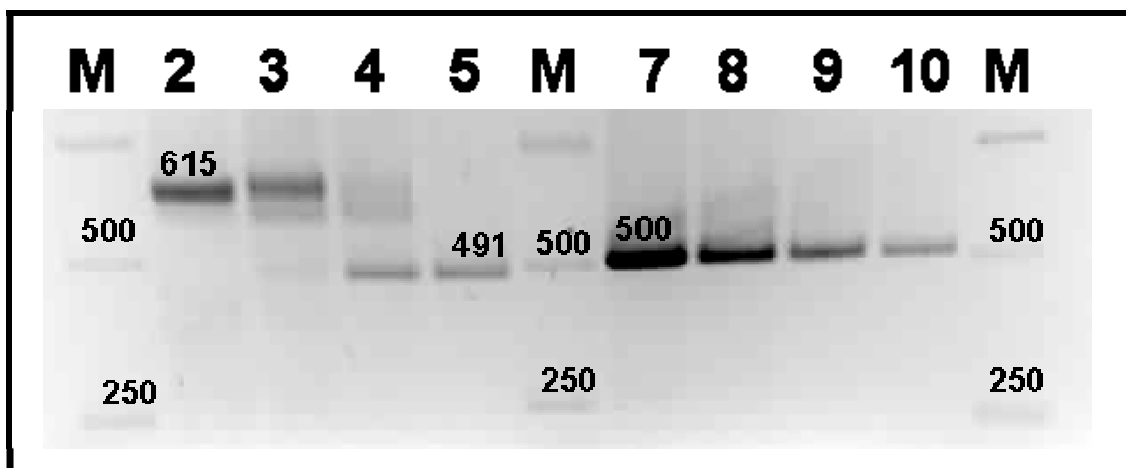


Figura 59. Análisis del extremo 5' del Ad *helper* Ad5.FC31.Cre. Ψ^R y Ad5/FC31.Cre al crecerlo 36 horas durante 3 ciclos de amplificación, en células HEK293 conjuntamente con el Ad control Ad5/RFP. Carril 1: Marcador 1 Kb. Carril 2: plásmido pAd5/FC31.Cre. Carril 3: Ad5/FC31.Cre + Ad5/RFP (1^{er} paso de amplificación). Carril 4: Ad5/FC31.Cre + Ad5/RFP (2^o paso de amplificación). Carril 5: Ad5/FC31.Cre + Ad5/RFP (3^{er} paso de amplificación). Carril 6: Marcador 1 Kb. Carril 7: plásmido pAd5/FC31.Cre. Ψ^R . Carril 8: Ad5/FC31.Cre. Ψ^R + Ad5/RFP (1^{er} paso de amplificación). Carril 9: Ad5/FC31.Cre. Ψ^R + Ad5/RFP (2^o paso de amplificación). Carril 10: Ad5/FC31.Cre. Ψ^R + Ad5/RFP (3^{er} paso de amplificación). Carril 11: Marcador 1 Kb.

El análisis por PCR de la figura 59 indica que el Ad *helper* Ad5/FC31.Cre recombina con el Ad control Ad5/RFP por la señal Ψ durante las primeras 36 horas de amplificación. En el siguiente paso de amplificación, la mitad de las cadenas del Ad *helper* ya son recombinantes y en el 3^{er} paso, las cadenas recombinantes son las únicas que no son desplazadas por el Ad control Ad5/RFP. En cambio, el Ad *helper* Ad5/FC31.Cre. Ψ^R en ninguno de los 3 pasos analizados presenta recombinación homóloga por la señal Ψ . Sin embargo, el número de cadenas amplificadas va disminuyendo en cada paso de amplificación debido al posible retraso en el proceso de empaquetamiento.

Estos resultados indican que Ad *helper* Ad5/FC31.Cre. Ψ^R puede amplificarse conjuntamente con otros Ad evitando/minimizando la pérdida de las señales de recombinación para las recombinasas Φ C31 y Cre.

5.4 Análisis de la recombinación homóloga por la señal de empaquetamiento entre Ad *gutless* pKCZ y Ad *helper* Ad5/FC31.Cre. Ψ^R

Para analizar la posible recombinación homóloga entre las señales de empaquetamiento Ψ del Ad *helper* Ad5/FC31.Cre. Ψ^R y el Ad *gutless* pKCZ, se transfectó el plásmido del Ad *gutless* pKCZ conjuntamente con los plásmidos del Ad *helper* Ad5/FC31.Cre-RFPc y Ad5/FC31.Cre. Ψ^R (por separado) durante 60 horas en 1E6 células HEK293. Alternativamente, se probó también el concepto al infectar el virus *helper* Ad5/FC31.Cre ó Ad5/FC31.Cre. Ψ^R (MOI=2) conjuntamente con el plásmido *gutless* pKCZ durante 60 horas en 1E6 células HEK293.

Transcurridas las 60 horas, se realizaron 3 ciclos de congelaciones/descongelaciones y se extrajo una muestra (50 μ l) del lisado crudo que fue calentada a 100°C durante 15 minutos para ser amplificada por PCR. Las muestras fueron amplificadas utilizando el kit “*high fidelity*” (Invitrogen). Como controles, se utilizaron los plásmidos correspondientes al pKP1.4 Δ CMV, pAd5/FC31.Cre y pAd5/FC31.Cre. Ψ^R .

IV. Resultados

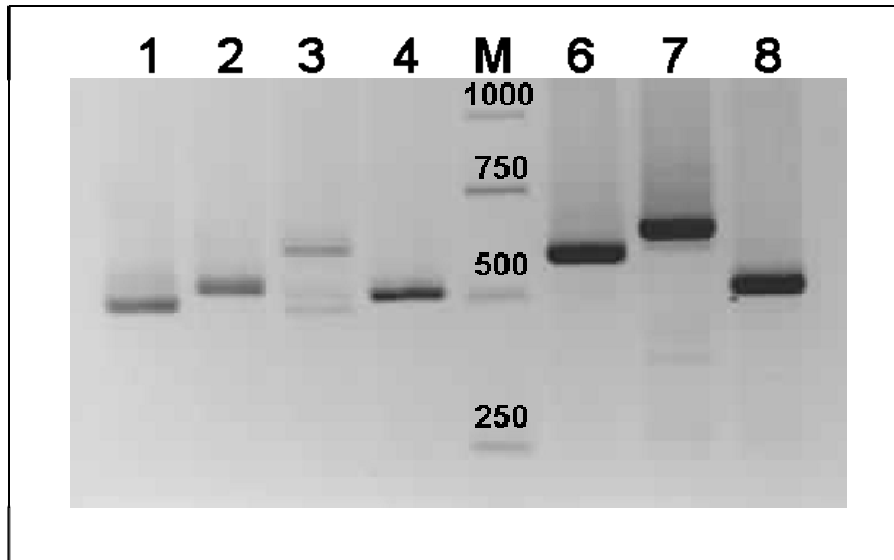


Figura 59. Análisis del extremo 5' del Ad *helper* Ad5.FC31.Cre. Ψ^R al crecerlo 60 horas en células HEK293. Carril 1: plásmido pAd5/FC31.Cre-RFPc + pAd5/KCZ. Carril 2: pAd5/FC31.Cre. Ψ^R + pAd5/KCZ. Carril 3: Virus Ad5/FC31.Cre + pAd5/KCZ. Carril 4: Virus Ad5/FC31.Cre. Ψ^R + pAd5/KCZ. Carril 5: Marcador 1Kb. Los carriles 6, 7 y 8 corresponden a plásmidos controles de la PCR. Carril 6: plásmido pKP1.4 Δ CMV. Carril 7: plásmido pAd5/FC31.Cre. Carril 8: Ad5/FC31.Cre. Ψ^R .

La amplificación del extremo 5' de los Ad *helper* analizados muestra que tanto el Ad5/FC31.Cre-RFPc como el Ad5/FC31.Cre permiten la recombinación entre su señal de empaquetamiento y el Ad *gutless* (figura 59, carriles 1 y 3). Sin embargo, en el caso del Ad *helper* con la señal de empaquetamiento invertida Ad5/FC31.Cre. Ψ^R , tanto en transfección con plásmido (carril 2) como infectando con partículas virales (carril 4), la recombinación no se da en ninguna condición. Estos datos confirman que al invertir su señal de empaquetamiento, el Ad *helper* Ad5/FC31.Cre. Ψ^R evita/minimiza la recombinación homóloga con el Ad *gutless*.

Asimismo, para estudiar la posible recombinación homóloga tras diferentes pasos de amplificación, se transfectó el plásmido pKCZ (3 μ g) con PEI en 1E6 células con una MOI=2 de Ad *helper* Ad5/FC31.Cre. Ψ^R durante 36 horas. Se realizaron 3 ciclos de congelaciones/descongelaciones y se utilizaron 50 μ l para el segundo paso de amplificación. Del mismo modo, se repitió este proceso hasta alcanzar 4 pasos de amplificación. De cada lisado crudo, se

extrajeron 50 μ l y se calentaron a 100°C durante 15 minutos para ser amplificados por PCR. Como control se utilizó el plásmido pAd5/FC31.Cre. Ψ^R .

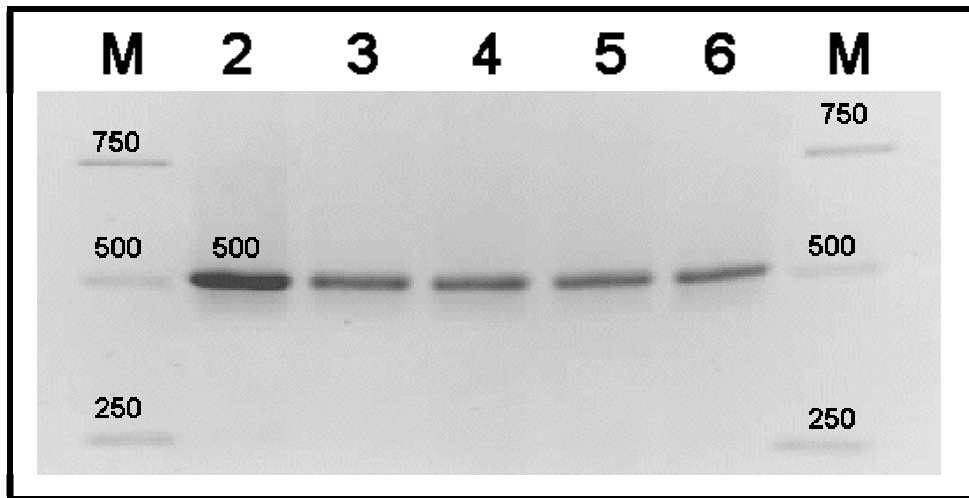


Figura 60. Análisis del extremo 5' del Ad *helper* Ad5.FC31.Cre. Ψ^R al crecerlo 36 horas durante 4 pasos de amplificación en células HEK293. Carril 1: Marcador 1 Kb. Carril 2: plásmido pAd5/FC31.Cre. Ψ^R . Carril 3: Virus Ad5/FC31.Cre. Ψ^R + pAd5/KCZ (1^{er} paso de amplificación). Carril 4: Virus Ad5/FC31.Cre. Ψ^R + pAd5/KCZ (2^o paso de amplificación). Carril 5: Virus Ad5/FC31.Cre. Ψ^R + pAd5/KCZ (3^{er} paso de amplificación). Carril 6: Virus Ad5/FC31.Cre. Ψ^R + pAd5/KCZ (4^o paso de amplificación). Carril 7: Marcador 1 Kb.

El análisis por PCR de la amplificación del Ad5/FC31.Cre. Ψ^R conjuntamente con el plásmido pKCZ (Ad *gutless*) durante 4 pasos de amplificación en células HEK293 muestra que el vector *helper* Ad5/FC31.Cre. Ψ^R , en ninguno de los pasos analizados, recombina con el vector *gutless* KCZ, demostrando una vez más, el potencial de este vector para la amplificación de Ad *gutless* (figura 60).

V. DISCUSIÓN

1. Generación de los vectores adenovirales *helper* y controles

El adenovirus es uno de los vectores más utilizados en el campo de la terapia génica en ensayos clínicos con humanos. Los primeros vectores adenovirales generados (de 1ª generación) ofrecieron la posibilidad de probar un gran número de conceptos gracias a la expresión de diversas proteínas y genes marcadores o terapéuticos en diferentes tejidos o tipos celulares. Sin embargo, su eficacia como vector de terapia génica ha sido insuficiente ya que la expresión de los genes terapéuticos empleados tiene una duración limitada de alrededor 2-3 semanas [176, 181]. Para intentar alargar la expresión del transgén, se utilizaron los vectores de 2ª generación, pero éstos seguían ofreciendo los mismos inconvenientes asociados a los vectores de 1ª generación [186]. Por ello, para disminuir la respuesta inmune celular y aumentar el tiempo de expresión de los vectores de 1ª y 2ª generación, se han generado los vectores adenovirales de 3ª generación, *gutless* o *helper* dependientes [275]. Estos vectores ofrecen la posibilidad de expresar un gen terapéutico hasta 2 años en babuinos [201], incluso durante toda la vida del organismo [274]. Sin embargo, si bien el Ad *gutless* ofrece grandes *ventajas in vivo*, su producción ha presentado siempre dos grandes inconvenientes: la contaminación por Ad *helper* y la obtención de altos títulos [245].

El sistema más ampliamente extendido para la producción de Ad *gutless* ha sido el sistema de la recombinasa Cre-*loxP* [229]. Cre es una recombinasa bi-direccional y permite realizar su reacción gracias a la presencia de dos secuencias idénticas llamadas *loxP*. Sin embargo, en un porcentaje bajo, pero presente, esta reacción directa puede revertirse ya que la recombinasa Cre puede volver a reconocer las mismas secuencias *loxP* y volverlas a colocar en su lugar de inicio [286]. Por esta razón, la recombinasa Cre, en la generación de Ad *gutless*, puede actuar en ambas direcciones perdiendo parte de su eficacia. Por otro lado, aunque se mejore la actividad de la recombinasa Cre, siempre estará presente esta actividad no deseada y cuanto más eficiente es la escisión, también más eficiente es la reinserción. Por ello, para reducir aún más la contaminación por Ad *helper*, es necesario el uso de recombinasas

V. Discusión

unidireccionales que puedan minimizar este problema. Por ello, en este trabajo se ha escogido la recombinasa unidireccional Φ C31 para evitar la contaminación por el efecto de reacción inversa [30]. De este modo, se ha generado una familia de *Ad helper* que llevan flanqueada su señal de empaquetamiento por las secuencias reconocidas por las recombinasa Φ C31 y Cre. Asimismo, para explotar aún más el efecto de la escisión, se ha escogido un doble sistema de recombinasas. Las secuencias de recombinación para Φ C31 (*attB/attP*) se han colocado externamente a las secuencias *loxP* (Cre), para que una vez realizada su acción, la señal de empaquetamiento Ψ no pueda introducirse de nuevo en el genoma adenoviral. Para obtener una distancia óptima de separación entre *attB* y *attP*, se ha dejado un espacio de aproximadamente 2 Kpb al clonar entre ellas un *cassette* de GFP. La introducción del *cassette* de GFP nos ofrece múltiples ventajas, ya que gracias a esta proteína se puede: a) seguir el crecimiento del *Ad helper* durante su producción, b) realizar un análisis fácil y rápido de las unidades de infección; c) visualizar su crecimiento en las producciones de *Ad gutless*; y d) obtener una buena eficiencia de recombinación de las recombinasas Φ C31 y Cre.

Otra de las cuestiones de interés es evitar la aparición de partículas RCA. Para evitar al máximo la aparición de estas partículas, se ha eliminado toda región del gen E1 de los *Ad helper* y así minimizar la recombinación entre virus y célula. Aun y así, como las células HEK293 contienen el extremo 5' del Ad con la región E1, no es posible evitar la generación de las partículas RCA al 100% con esta línea celular. Por ello, en el laboratorio ya se dispone de líneas celulares permisivas que evitan la aparición de RCA, como es el caso de la línea celular N52.E6.

Finalmente, todos los vectores adenovirales *helper* han sido secuenciados para comprobar cualquier mutación *de novo* en todos los plásmidos lanzadera utilizados en este trabajo. Además, todos los genomas virales han sido digeridos por enzimas de restricción para controlar las posibles reorganizaciones génicas que pudiesen haberse realizado en el proceso de recombinación homóloga en bacterias BJ5183.

2. Caracterización de los vectores adenovirales *helper* generados

2.1 Los Ad *helper* generados presentan un ciclo adenoviral retrasado de 56-60 horas

Una vez generados los Ad *helper* y Ad controles, éstos fueron crecidos en células HEK293. Los experimentos de transfección con plásmidos adenovirales muestran que los Ad controles (Ad5/*attP* y Ad5/GFP) presentan un ciclo normal de 36 horas. En cambio, los Ad *helper* no podían producirse incluso permitiendo 72 horas de amplificación. Finalmente, el tiempo normal de amplificación, desde el primer paso de transfección rondaba los 5-7 días para los vectores *helper*. Este experimento indicó que los Ad *helper* generados tenían retrasado su ciclo viral en alguna de las etapas y que para crecerlos era necesario estudiar y caracterizar su ciclo viral.

Para conocer la cinética de producción de partículas virales y el tiempo del ciclo viral, se realizaron ensayos para determinar la curva de crecimiento de los diferentes Ad *helper* y Ad controles. Así, se observó que aunque los Ad controles Ad5/*attP* y Ad5/GFP presentaban un ciclo viral de 36 horas, los Ad *helper* Ad5/Cre.*attB*, Ad5/FC31 y Ad5/FC31.Cre alargaban su ciclo viral hasta las 56-60 horas. La diferencia temporal en la producción de Ad *helper* y Ad controles es de 20-24 horas, lo que indica claramente un retraso en una o varias de las etapas del ciclo viral. Este valor es especialmente importante en el último ciclo de amplificación ya que si no se deja el tiempo suficiente, las partículas virales no acaban su proceso de maduración y, si por el contrario se excede el tiempo óptimo de producción, la mayoría de las partículas virales se perderán en el sobrenadante. Como el objetivo final de este trabajo es la generación de Ad *gutless*, es relevante controlar el tiempo de producción acotándolo a 36 horas ya que se podría reducir la contaminación de Ad *helper*. También, se ha observado que la pendiente que muestran las curvas de crecimiento de los Ad *helper* y controles es similar, mostrando que es el tiempo más que la velocidad de producción de las partículas infecciosas lo que resulta afectado.

V. Discusión

Una vez producidos los Ad *helper* y Ad controles, se analizó el título físico e infeccioso de las preparaciones virales (tabla 2). La proporción PP:IU indica la infectividad de la carga viral amplificada y cuanto mayor sea este valor, mayor es el número de partículas víricas que no son infectivas. En general, los Ad *helper* tienen una proporción ligeramente mayor a la de los Ad controles, aunque algunos de ellos presentan proporciones dentro del rango normal de los Ad de 2ª generación generados en nuestro laboratorio (1:5-1:40).

Para cuantificar las diferencias de producción viral entre Ad *helper* y Ad controles se analizó el número de IU por célula producidos a las 36 y a las 56 horas. Los resultados muestran que los Ad *helper-attB/attP* tienen una deficiencia del orden de 2 a 3 logaritmos en la producción de partículas infecciosas al crecerlos durante 36 horas, mientras que si se crecen durante 56 horas, éstos pueden normalizar los niveles obtenidos por los Ad controles, confirmando, por lo tanto, que algún proceso del ciclo viral de los Ad *helper* se encuentra afectado.

2.2 La cinética de replicación del genoma adenoviral y de producción de proteínas no está afectada

Una de las primeras etapas en la infección del Ad es la replicación del genoma viral. Debido a que las secuencias *attB/attP* se clonaron en el extremo 5', se estudió si había deficiencias que explicasen el retraso del ciclo vírico. Así, se realizaron experimentos de Dot Blot que mostraron que la replicación del virus *helper Ad5/loxP.FC31* era muy similar a la del control *Ad5/attP* en todos los tiempos analizados, confirmando que la replicación del genoma de este virus no está afectada. Sin embargo, al analizar por Dot Blot el título infeccioso de todos los puntos, se observó que el Ad *helper Ad5/loxP.FC31* produce del orden de 2 a 3 logaritmos menos partículas infecciosas que el Ad control *Ad5/attP* tal y como se había observado previamente.

Descartada la existencia de problemas en la cinética de replicación del genoma adenoviral como causa del retraso del ciclo viral, se decidió estudiar si la capacidad de producción proteica de los Ad *helper* estaba afectada. El análisis de la proteína GFP (bajo un promotor constitutivo fuerte) por FACS mostró que

la cinética y niveles de producción no estaban afectados en los diferentes tiempos estudiados. De la misma manera, la proteína *hexon* tampoco mostró diferencias en los niveles de producción a las 24 horas con respecto a los Ad controles. Puesto que la proteína *hexon* es transcrita a partir de un gen tardío (con lo que previamente se han tenido que expresar todos los genes *early*), ello sugiere que la cinética y niveles de producción de proteínas tampoco parecen estar afectados.

Es posible que, aunque producidas, algunas de las proteínas de empaquetamiento no estén disponibles en el proceso de producción del Ad. Para ello, se aportó *in trans* las proteínas virales en los tiempos y niveles requeridos gracias a la co-infección de los Ad *helper-attB/attP* con un Ad control de 2^a generación. Los resultados de este experimento muestran que los vectores *helper-attB/attP* no pueden normalizar sus títulos en presencia de un Ad control. Así, aunque el genoma del Ad *helper* tenga a su disposición las proteínas virales de un Ad control, no es capaz de normalizar los niveles de partículas infecciosas. Como consecuencia de estos resultados, se postuló que el retraso del ciclo viral debería ser causado por deficiencias en los procesos de empaquetamiento y/o maduración de la partícula viral.

2.3 Los Ad *helper-attB/attP* generados tienen afectado el proceso de empaquetamiento del genoma viral

Para estudiar el proceso de empaquetamiento de los vectores *helper*, se decidió crecer el Ad *helper* Ad5//*loxP*.FC31 conjuntamente con el Ad control Ad5/RFP y cuantificar la cantidad de ADN viral que contiene a tiempo final tanto la célula como las partículas del Ad *helper* y Ad control. Los resultados indicaron que el vector *helper* Ad5//*loxP*.FC31 puede replicar el mismo número de genomas que el vector control Ad5/RFP. Sin embargo, aunque en la célula se encuentren el mismo número de genomas virales, el Ad control parece empaquetarse preferentemente sobre el Ad *helper* en un 96% vs 4% indicando que los genomas de Ad *helper* tienen afectada la entrada en la cápside, lo que podría explicar el retraso del ciclo viral.

V. Discusión

Sorprendentemente, al analizar el título infeccioso de las muestras del ensayo anterior, se observó que el título del Ad *helper* Ad5/*loxP*.FC31 no era del 4% sino de 1000 a 10000 veces inferior al del Ad control. Es decir, no sólo el empaquetamiento estaba afectado, sino que es posible que la maduración de la cápside también. Así, si los genomas *helper-attB/attP* se empaquetan más lentamente, el inicio del proceso de maduración de la cápside estaría también retrasado, por lo que a las 36 horas, la mayoría de las cápsides aún no habrían tenido tiempo suficiente para completar el proceso de maduración y por lo tanto, no serían infectivas. Por el contrario, los genomas del Ad control sí tendrían una cinética de empaquetamiento y maduración correcta, y a las 36 horas habrían podido completar su ciclo vírico y ser infectivos.

Una cantidad elevada de Ad *helper* contaminantes (en IU) en la preparación de Ad *gutless* implica una mayor expresión residual de genes virales y por lo tanto, una mayor respuesta inmune celular contra las células transfectadas. Está descrito que en los sistemas clásicos de producción de Ad *gutless* basados en el sistema Cre-*loxP* o FLPe-*frt*, la proporción IU:PP entre los Ad *helper* y controles es muy similar. Por ello, sabiendo la proporción relativa de las PP entre ambos, es posible extrapolar la proporción relativa entre sus IU y por lo tanto el potencial inmunogénico de la preparación en cuanto a la respuesta inmune celular. Sin embargo, en el sistema Φ C31-*attB/attP*, la proporción IU:PP entre los Ad *helper* y los Ad *gutless* es muy distinta llegando a variar entre 5 y 50 veces. Por ello, una conclusión importante que se extrae de los experimentos de empaquetamiento es que es necesario analizar directamente las IU de ambos adenovirus, ya que será este valor, y no el de las PP (como ocurre en los sistemas clásicos) el que indicará el potencial inmunogénico de la preparación para la respuesta inmune celular.

Finalmente, es necesario destacar que la posibilidad de evaluar, en tiempo real, el nivel de contaminación del Ad *helper* en la preparación permite:

- Agilizar y acortar significativamente el proceso de producción, ya que entre un ciclo de amplificación y el siguiente no es necesario realizar una cuantificación de las partículas *helper* por Dot Blot.

- Analizar y cuantificar *in situ* la relación entre el número de IU de Ad *helper* y Ad *gutless* amplificados en cada paso.

2.4 La maduración de los Ad *helper* es más lenta como consecuencia del retraso en el empaquetamiento del genoma viral

Al observar que en los Ad *helper-attB/attP*, a las 36 horas, una parte importante de la población viral empaquetada restaba inmadura en las preparaciones virales, se decidió estudiar en detalle los procesos de maduración de los Ad *helper-attB/attP* mediante el análisis de composición proteica tanto a las 36 horas (hora a la cual un Ad control concluye su ciclo viral), como a las 56 horas (hora a la cual concluye el ciclo del Ad *helper*). En particular, se escogió el vector *helper* Ad5/FC31 ya que es el único que contiene exclusivamente las secuencias *attB/attP* de la recombinasa Φ C31, sin ninguna secuencia *loxP*. Además, como Ad controles se utilizaron el Ad5/RFP y el Adts369 (ambos crecidos a 36 horas). El Adts369 es un mutante para la proteína L1-52/55K que acumula intermedios de empaquetamiento al ser crecido a 39.5C [115].

Las diferentes preparaciones virales fueron purificadas por gradientes en CsCl y caracterizadas mediante los siguientes análisis:

1.- Densidad de las bandas purificadas: La densidad de las partículas varía durante las distintas etapas del ciclo vírico, pasando de partícula vacía ($\delta=1,29 \text{ g/cm}^3$) a partícula ligera, que está comenzando el proceso de empaquetamiento ($\delta=1,3 \text{ g/cm}^3$). De este estadio se continúa hasta una partícula pesada ($\delta=1,37 \text{ g/cm}^3$) con el genoma viral empaquetado en su interior, pero aún no madura. Finalmente, al madurar todas las proteínas virales, la partícula adquiere la infectividad con una densidad de aproximadamente 1.35 g/cm^3 .

2.- Análisis de microscopía electrónica: Determina el grado de agregación de las proteínas virales y de ensamblaje de la cápside, así como el porcentaje de cápsides con ADN en su interior.

V. Discusión

3.- Análisis de la composición proteica de la cápside por tinción de plata y Western Blot: Algunas de las proteínas de la cápside toman parte en los diferentes estadios de maduración y posteriormente abandonan la cápside. Asimismo, otras proteínas cambian su peso molecular al ser procesadas por la adenina o proteasa adenoviral. En particular, se estudiaron:

- la proteína V: Indica la presencia de ADN en la cápside.
- la proteína pVI y pVIII: Precursores de proteínas que intervienen en la maduración.
- la proteína 50K: Inicialmente, no está presente en la cápside. Posteriormente, su presencia aumenta en etapas intermedias de maduración y es eliminada de la cápside cuando la partícula ya es madura.
- la proteína L1-52/55K: Esta proteína, que juega un papel muy importante en el proceso de empaquetamiento, entra en la cápside antes que el genoma viral y a medida que el genoma va empaquetándose, es procesada y eliminada de la cápside. Así pues, observar L1-52/55K procesada implica partículas con ADN empaquetado aunque no necesariamente maduras.
- la proteína VII y pVII (precursor): La proteína precursora pVII indica la presencia del genoma viral en la cápside y es indicativa del proceso de maduración de la partícula adenoviral [147] en un estado posterior a la presencia de la proteína L1-52/55K. Cuando la cápside madura, esta proteína es procesada por la proteasa adenoviral reduciendo su peso molecular. Por lo tanto, la detección de proteína VII procesada es un indicador de que la partícula viral está madura.

4.- Análisis de la infectividad (IU/célula).

5.- Análisis de la presencia de ADN empaquetado en el interior de las partículas virales: Ello confirma que las partículas se encuentran en etapas de maduración no iniciales.

El análisis del Ad control Ad5/RFP, amplificado a las 36 horas, mostró que en el gradiente de CsCl se observaba, casi únicamente, una gran masa de partículas

con $\delta=1.35\text{g/cm}^3$ correspondiente a partículas maduras mientras que el análisis por microscopía electrónica de estas partículas mostró que, principalmente, se observaban partículas con ADN empaquetado. Asimismo, en el análisis de proteínas no es posible observar proteína 50K, mientras que sólo es posible detectar proteínas L1-52/55K y pVII procesadas, lo que implica que la partícula es totalmente madura.

Por el contrario, el análisis del Ad control Adts369, amplificado a las 36 horas, es muy diferente. Así, se observan grandes cantidades de cápsides vacías e intermedios de maduración, con una densidad muy baja ($\delta=1.297\text{ g/cm}^3$), que son fácilmente visibles por microscopía electrónica, en el que gran parte de las proteínas virales se encuentran en estado de “pre-cápside” formando agregados desestructurados. Asimismo, el análisis de las proteínas virales muestra presencia de proteína V que conjuntamente con el Southern Blot, confirma la presencia de ADN dentro de la cápside. También se puede detectar pVII y L1-52/55K mayoritariamente sin procesar lo que implica que las partículas aún están en estadios intermedios de maduración.

Las partículas virales del vector Ad5/FC31 fueron analizadas a las 36 y a las 56 horas de amplificación. Así, a las 36 horas, en el gradiente de CsCl se observó tan solo una fina capa de cápsides maduras, junto a una gran masa de intermedios de maduración. Esta observación respalda la hipótesis de que sólo una parte de la población viral está empaquetada. Esto es fácilmente observable por microscopía electrónica en donde estos virus presentan, al igual que los Adts369, muchas cápsides vacías y un gran número de proteínas formando agregados desestructurados. Además, el análisis de las proteínas muestra presencia de la proteína 50K, así como pequeños niveles (aunque parcialmente procesados) tanto de la proteína L1-52/55K como de la proteína VII. Todos estos valores indican que, a 36 horas, existe una población heterogénea de partículas, la mayoría con ADN empaquetado, pero de las que tan solo un pequeño porcentaje ha comenzado y llevado a término el proceso de maduración. Ello sugiere que el proceso de maduración no está inhibido o parado en uno o varios puntos, sino que la mayoría de partículas sufren un

V. Discusión

retraso en el comienzo del proceso, posiblemente debido al retraso sufrido en la etapa de empaquetamiento anterior.

Por el contrario, si se amplifica el virus 56 horas, el gradiente de CsCl muestra un incremento importante en el tamaño de partículas “maduras” así como tres bandas de menor densidad que los análisis efectuados confirman que corresponden a intermedios de empaquetamiento. Las partículas “maduras” tienen una densidad de 1.342 g/cm³ sugiriendo que la mayoría de la población viral ya ha finalizado el proceso de maduración. Esto es evidente en la microscopía electrónica en el que se pueden observar casi únicamente cápsides con ADN al igual que con el Ad5/RFP control. Asimismo, en el análisis de las proteínas no se observa proteína 50 K, aunque sí se observan los precursores pVI y pVIII y una mayor cantidad de proteína L1-52/55K parcialmente procesada, así como proteína VII casi totalmente procesada. Todo ello indica que la mayoría de las partículas han completado el proceso de maduración, aunque aún hay un pequeño porcentaje que todavía no lo ha finalizado.

Una proteína adenoviral clave en la maduración es la proteasa adenoviral (adenaína). Esta proteína interviene directamente sobre otras proteínas de la cápside para generar una partícula viral madura. Además, se conoce que la cápside transporta del orden de 10 a 50 copias de esta proteína e interviene en el desensamblaje de la cápside en el viaje del endosoma al núcleo de la célula [135, 136]. Por esta razón, se analizó la entrada del genoma al núcleo durante las primeras 6 horas tras su infección. Los resultados del Southern Blot muestran que no existen diferencias en cuanto a la cantidad de genoma viral que entra al núcleo entre el Ad *helper* Ad5/FC31 y Ad control Ad5/RFP, por lo que la adenaína debe ser transportada en las cápsides de los vectores *helper-attB/attP* y participar activamente en el desensamblaje de la cápside. Por lo tanto, se puede afirmar que el retraso en el ciclo vírico del Ad *helper* Ad5/FC31 no es causado por deficiencias en el proceso de transporte de la cápside y posterior entrada del genoma viral en el núcleo celular durante las primeras etapas del ciclo vírico.

2.5 La secuencia *attB* clonada en el extremo 5' de la señal de empaquetamiento es la causante del retraso en el ciclo viral

Los experimentos de la primera mitad de la tesis mostraron que la clonación conjunta de las secuencias *attB/attP* en el genoma del Ad retrasaba su ciclo viral. Asimismo, se observó que la secuencia *attP*, por si sola (*Ad5/attP*), no es capaz de retrasar el ciclo celular. Sin embargo, no era posible conocer el efecto de *attB* en ausencia de *attP*. Para ello, se generó un nuevo vector (*Ad5/attB.Cre*) en el que Ψ estaba flanqueada por *attB* a 5'. Interesantemente, este vector tenía también un ciclo viral de 56-60 horas, indicando que es la secuencia *attB* la responsable del retraso. Por otra parte, la mayoría de los vectores contienen también secuencias *loxP*. Sin embargo, el hecho de flanquear Ψ con secuencias *loxP* no parece tener ningún efecto sobre el empaquetamiento ya que el vector *Ad5/FC31* muestra un ciclo viral de 60 horas, confirmando todas las observaciones previas de otros investigadores en los que los *Ad helper* en el sistema *Cre-loxP* presentan un ciclo vírico de 36 horas. Hay que tener en cuenta que la secuencia *attB* se encuentra clonada justamente en el extremo 5' de la secuencia Ψ y la secuencia *attP* se encuentra localizada a 1.8 Kpb de la señal Ψ . Para conocer si la secuencia *attP* puede generar el mismo efecto sobre el empaquetamiento, cabría clonar la secuencia *attP* en la misma posición que la señal *attB* y estudiar el empaquetamiento del genoma de este vector. Por el momento, este vector no se ha generado ya que el presente trabajo está dirigido al uso de los vectores *helper* para la producción de *Ad gutless* así como al papel de la secuencia *attB* más que a los mecanismos implicados en el retraso debidos a otras secuencias como *attP*.

Debido a que Ψ puede estar localizada tanto en el extremo 5' como 3' del genoma del Ad sin que ello afecte al empaquetamiento [111], se decidió clonar una segunda señal Ψ en el extremo 3' del vector *Ad5/FC31* y generar así el genoma *Ad5/loxP.FC31. Ψ* . Este nuevo vector tiene un ciclo vírico normal de 36 horas por lo que la segunda señal de empaquetamiento en el extremo 3' es capaz de revertir el retraso en los procesos de empaquetamiento y maduración, indicando además que el mecanismo en que *attB* está implicado no es la

V. Discusión

retención del genoma adenoviral en un dominio nuclear donde no pueda interactuar con las proteínas de la cápside.

Se han barajado diversas hipótesis para entender el ciclo anómalo de los vectores *attB/attP*. Una posibilidad es que la introducción de la secuencia *attB* entre el extremo ITR y Ψ cambiaría la estructura tridimensional de toda esta zona lo que dificultaría la unión del complejo proteico de empaquetamiento. Otra hipótesis es que la secuencia *attB* aparte de poder unir la recombinasa Φ C31, interaccione con un factor celular o viral que dificulte la unión entre el complejo de empaquetamiento y la señal Ψ .

2.6 La secuencia *attB* une específicamente diferentes proteínas celulares que podrían impedir el proceso de empaquetamiento del genoma adenoviral

Los ensayos de EMSA mostraron que existían diferentes proteínas que se unían a la secuencia *attB* y que esta unión es independiente de la infección por Ad ya que no existían diferencias entre la unión de extractos nucleares infectados o no infectados por Ad. Este resultado sugiere que las proteínas que se unen a la secuencia *attB* no son adenovirales sino celulares. Además, esta unión es específica de secuencia ya que al variar el orden de los nucleótidos (*attB**), no se observa el mismo patrón de bandas entre *attB* y *attB**. Asimismo, la identificación de la proteína celular que se une a *attB* permitiría generar clones de células productoras de Ad, en el que su sobre-expresión posiblemente retrasaría aún más los procesos de empaquetamiento y maduración del Ad *helper* y por lo tanto, conseguir una mayor disminución de los porcentajes de contaminación final en las preparaciones de Ad *gutless*.

Las curvas de crecimiento de Ad *helper* y Ad controles son parecidas. La principal diferencia es que la curva de los Ad *helper* empieza aproximadamente 20 horas más tarde. Este resultado sugiere que a partir de un momento determinado, el proceso de empaquetamiento y maduración de partículas infecciosas no tiene impedimentos y se da de forma normal. Si existiera una proteína nuclear que impidiera el empaquetamiento, cuando el número de

genomas virales replicados superara al número proteínas que se unieran a la secuencia *attB*, no habría impedimento para iniciar de forma eficiente el proceso de empaquetamiento.

3. Generación y caracterización de nuevas líneas celulares con las recombinasas Cre y Φ C31

Se decidió analizar si el efecto combinado del retraso por la señal *attB*, junto con la estrategia clásica de la escisión de Ψ permitía disminuir aún más la contaminación de *Ad helper*. Para ello, se incorporaron los genes de las recombinasas Cre y Φ C31 en líneas celulares permisivas para la generación de Ad. De este modo, se generaron la doble línea celular HEK293/Cre.FC31 y N52.E6/Cre.FC31 gracias a la colaboración establecida con el grupo del Dr. Rubén Hernández (CIMA, Pamplona) quien analizó los clones por RT-PCR y seleccionó aquellos que expresaban en mayor cantidad el gen de la recombinasa Φ C31.

3.1 Los clones celulares HEK293/Cre.FC31 presentan un potencial de producción adenoviral similar a la línea celular HEK293

Posteriormente, se comparó el potencial de producción que tenía el clon seleccionado en comparación a la línea celular HEK293, y se observó que al igual que las líneas HEK293 y HEK293/Cre, el clon HEK293/Cre.FC31 permitía altos niveles de producción para el Ad control (*Ad5/βgal*), con lo que la incorporación de la recombinasa Φ C31 no reducía la capacidad productiva del clon celular. Asimismo, al igual que en anteriores experimentos, todos los *Ad helper* produjeron de 2 a 4 logaritmos menos partículas infecciosas que el Ad control *Ad5/attP*. Sin embargo, el uso de la doble línea celular HEK293/Cre.FC31 no supuso ninguna ventaja selectiva respecto el uso de la línea HEK293. Una de las ventajas que ofrece el sistema *attB/attP-ΦC31* es que permite no utilizar líneas celulares con recombinasas y así evitar la posible aparición de mutantes para las secuencias *attB/attP* y *loxP*. Aunque en la bibliografía se ha descrito que la aparición de mutantes por el uso de las líneas celulares con recombinasas no ocurre frecuentemente [286], a lo largo de

V. Discusión

muchos pasos de amplificación, este efecto puede darse. Por esta razón y porque no añadieron ninguna ventaja selectiva, se decidió no utilizar líneas celulares con recombinasas en los primeros pasos de amplificación de Ad *gutless*.

Posteriormente, se estudió por Southern Blot si las líneas HEK293/Cre.FC31 y N52.E6/Cre.FC31 permitían la escisión de Ψ . Desafortunadamente, tan solo Cre, pero no Φ C31, era capaz de interactuar con sus secuencias y escindir Ψ . Así, a las 48 horas, Cre presentó un porcentaje de escisión del 70% en HEK293/Cre.FC31 y del 30% en N52.E6/Cre.FC31.

Existen diferentes hipótesis por las que la recombinasa Φ C31 no escinda la señal de empaquetamiento del Ad *helper*. Una posible explicación es que exista un factor nuclear que se una a la secuencia *attB*, de manera que la recombinasa Φ C31 no pueda interactuar con esta secuencia. Esta teoría es consistente con los resultados obtenidos en el ensayo de EMSA y podría indicar, de manera indirecta, que existe esta unión ya que la recombinasa Φ C31 no puede ejercer su función. Otra explicación es la pérdida de función de la recombinasa Φ C31 a lo largo de los diferentes pasos de amplificación del clon celular. Se ha descrito que Φ C31 produce aberraciones cromosómicas en fibroblastos primarios humanos [257, 258], con lo que es factible que los clones generados no sean estables a un número alto de pasos de amplificación. En este sentido, es necesario analizar y comprobar de nuevo la expresión de Φ C31 en los clones HEK293/Cre.FC31 y N52.E6/Cre.FC31.

4. Amplificación de Ad *gutless*

Los sistemas actuales de producción de Ad *gutless* contienen 3 elementos fundamentales. Primero, un Ad *gutless* que no contenga ningún gen viral y que aporte un gen marcador o terapéutico; segundo, un Ad *helper* que aporte las proteínas virales *in trans* y contenga algún sistema de restricción; y tercero, una línea celular que produzca el Ad *gutless* con la mínima contaminación de Ad *helper*.

4.1 Amplificación del vector *gutless* FK7 con el vector *helper* Ad5/FC31.Cre

Para la amplificación de Ad *gutless*, se escogió el Ad *helper* Ad5/FC31.Cre ya que sus títulos en las diferentes pruebas de amplificación era los más bajos y permitía la escisión de Ψ por la recombinasa Cre conjuntamente con el efecto sobre el empaquetamiento.

Uno de los conceptos que ha facilitado significativamente la realización de los experimentos de este trabajo es la visualización, en tiempo real, de ambos vectores (*helper* y *gutless*) por microscopía de fluorescencia durante el proceso de amplificación. Por ello, se generaron nuevos vectores *helper* que incorporaron genes marcadores para el gen de la proteína roja fluorescente (RFP), ya que nuestro laboratorio disponía de un Ad *gutless* portador del gen GFP (pFK7) facilitado por el Dr. Stefan Kochanek.

La amplificación del vector *gutless* supone la puesta a punto de muchas variables, ya que las condiciones del sistema comportan el estudio entre otras del tiempo de amplificación, el uso de plásmidos o partículas virales, dosis de administración, relación entre Ad *gutless* y Ad *helper* y líneas celulares con o sin recombinasas. Estas variables no siempre se han de mantener para todos los pasos de amplificación, ya que en los primeros pasos de amplificación la contaminación de Ad *helper* es menos importante que la cantidad de Ad *gutless* amplificada. Sin embargo, en los últimos pasos de amplificación, la contaminación por Ad *helper*, es sin lugar a dudas, una de las cuestiones de mayor interés. Por esta razón, en este trabajo se han intentado establecer algunos criterios de amplificación estudiando el comportamiento que presenta el Ad *gutless* cuando es sometido a diferentes variables.

La línea celular escogida en los primeros pasos de amplificación ha sido la línea HEK293 por disponibilidad y porque la contaminación que se obtiene por Ad *helper* proviniendo de plásmido es claramente más baja que la concentración de Ad *gutless* generada. Las pruebas de co-transfección de plásmidos (*helper* y *gutless*) indican que a tiempos de 36 horas, el Ad *helper* no se produce y hasta las 60 horas su título es muy bajo en comparación al Ad

V. Discusión

gutless. Por ello, el uso de líneas celulares con recombinasas no es necesario en el primer paso de amplificación lo que evita la posible generación de mutantes para las secuencias de recombinación. Además, en el siguiente paso de amplificación, es necesario administrar una dosis de Ad *helper* si el que se ha producido no es suficiente para amplificar el Ad *gutless*.

Las pruebas previas de co-transfección de plásmidos indicaron que la mejor relación para amplificar Ad *gutless* es la de 1:1 con PEI. Este resultado es lógico ya que si se transfecta mayor proporción de plásmido *helper*, éste se amplificará con mayor eficiencia. Por el contrario, a mayor proporción de Ad *gutless*, mayor es el número de células que sólo recibirán copia del plásmido *gutless* y éste no podrá ser amplificado.

En el primer paso de amplificación, la única opción para amplificar el Ad *gutless* es el uso de la transfección con plásmido. Sin embargo, para el Ad *helper*, tanto es posible el uso de un plásmido como el uso de la partícula viral. Es relevante saber, que en la bibliografía la mayoría de sistemas han utilizado el vector *helper* en forma de partícula viral [229, 244, 251, 280]. Esta opción está muy extendida porque la amplificación del Ad *gutless* desde plásmido, a tiempos cortos, es muy baja. Incluso, cuando se utiliza un Ad *helper* durante 48 horas, la cantidad total amplificada de Ad *gutless* es muy baja (100 partículas infecciosas aproximadamente por 1E6 células) [229]. Por ello, la mayoría de sistemas actuales utilizan la partícula viral *helper* como primer paso de amplificación. Contrariamente a lo observado por otros grupos de investigación que utilizan el sistema Cre-*loxP*, cuando se utiliza una co-transfección de plásmidos, el sistema Φ C31-*attB/attP* permite, a las 60 horas post-infección, la amplificación del Ad *gutless* con mayores títulos, y unos niveles de contaminación 1E5 veces inferiores [229]. Por otra parte, los experimentos realizados con el Ad *helper* Ad5/FC31.Cre demuestran que su uso como partícula viral no supone una ventaja para obtener un mayor título de Ad *gutless*. Además los resultados obtenidos con partículas virales en el primer paso de amplificación de Ad *gutless*, son muy parecidos a los encontrados por Robin Parks y colaboradores en el año 1996 [229].

Los experimentos de co-transfección con plásmido para amplificar los Ad *helper*, demostraron que eran necesarios de 5 a 7 días para obtener partículas virales con títulos elevados. Por esta razón, se estudió la posibilidad de aumentar el número de horas hasta los 7-10 días. La co-transfección de plásmidos del Ad *gutless* y Ad *helper* durante 240 horas, demostró que es posible aumentar la cantidad total de partículas *gutless* con una proporción de Ad *helper* relativamente baja (7.5 veces menor).

En el segundo paso de amplificación es necesario añadir Ad *helper* ya que sin esta dosis extra, se perdería parte del potencial de la preparación. Por ello, se utilizó una MOI=2. Tras el segundo paso de amplificación, se observó que mantenía una proporción superior para el Ad *gutless*, la proporción entre partículas *helper* y *gutless* cada vez era más similar (1:2), indicando que el porcentaje de partículas *helper* contaminantes había aumentado.

Para el tercer paso de amplificación se consideró innecesario añadir más cantidad de Ad *helper* y se decidió infectar $4E7$ células HEK293 con 2 partículas *gutless* por cada una de Ad *helper*. En este paso de amplificación, aumentó considerablemente la cantidad de virus producido, pero la relación entre el Ad *gutless* y el Ad *helper* se había igualado. Sin embargo, estos valores no fueron considerados negativamente ya que para el último paso de amplificación se consideraba como óptima una co-infección en proporción 1:1 entre Ad *gutless* y Ad *helper*.

En el último paso de amplificación se decidió utilizar la línea celular HEK293 ya que se consideró que el efecto de empaquetamiento podría ser suficiente para eliminar al Ad *helper*. Sin embargo, los resultados de este paso dieron una contaminación muy alta de vector *helper* superando al vector *gutless*. Por esta razón, se decidió utilizar la línea celular HEK293/Cre y así intentar disminuir la concentración de Ad *helper*. Sin embargo, su uso tampoco hizo disminuir la concentración de Ad *helper* lo que no coincidía con los resultados obtenidos de Southern Blot sobre la escisión mediada por la recombinasa Cre. No es lógico que después de conocer que la recombinasa Cre escinde un 70% del Ad *helper*

V. Discusión

amplificado en el paso final, éste mantenga los mismos niveles que la línea celular HEK293.

4.2 Los genomas del Ad *gutless* FK7 y *helper* Ad5/FC31.Cre recombinan por la señal de empaquetamiento Ψ

Para determinar si los Ad *helper* habían sufrido algún tipo mutación y así perdido las secuencias de recombinación, se diseñaron unos cebadores específicos para amplificar la zona de la señal de empaquetamiento exclusiva del Ad *helper*. Así, se pudo demostrar que las preparaciones finales de Ad *gutless* presentaban Ad *helper* sin las señales *attB* y *loxP*. Una de las posibles causas que explica esta pérdida es la posible recombinación homóloga entre las señales de empaquetamiento del Ad *helper* y el Ad *gutless* o bien la recombinación entre Ad *helper* y la línea celular HEK293 ya que ésta mantiene todo el extremo 5' del Ad. Si esto fuera cierto, la amplificación de Ad *helper* en la línea HEK293 haría perder las secuencias. Sin embargo, esta recombinación debe ser muy infrecuente ya que los virus secuenciados no la presentan mientras que las líneas celulares HEK293/Cre y HEK293/Cre.FC31 son capaces de escindir la señal de empaquetamiento. De este modo, se considera que la explicación más factible es la recombinación homóloga entre las señales de empaquetamiento de los vectores *helper* y *gutless*.

Para estudiar el posible efecto de la recombinación homóloga, se analizaron los lisados crudos de todo el proceso de amplificación. De este modo, se observó que la recombinación homóloga ocurre desde el primer paso de amplificación. En el segundo paso de amplificación todo el Ad *helper* detectado por PCR corresponde al Ad *helper* recombinante (sin secuencias *attB* + *loxP*). De ahí, que se explique que la relación *helper:gutless* vaya igualándose a medida que aumentan los pasos de amplificación. Además, al no observar ninguna copia de genoma *helper* inicial, este resultado indica que todos los genomas con la secuencia *attB* son desplazados del sistema, mientras que los Ad *helper* recombinantes se empaquetan eficientemente. De este resultado, se confirma de nuevo que la potencia del sistema *attB*- Φ C31 por empaquetamiento es muy importante ya que ningún genoma con secuencia *attB* es detectado a partir del segundo paso de amplificación.

Un porcentaje muy elevado de los vectores *helper* actuales se basan en señales de empaquetamiento no modificadas. Por esta razón, posiblemente muchos de los sistemas generados no han tenido éxito y sus resultados no han sido reproducibles por otros laboratorios. Algunos grupos han decidido mutar específicamente la señal de empaquetamiento por dos razones: a) para disminuir el empaquetamiento del vector *helper* y b) evitar la recombinación homóloga entre la señal Ψ de Ad *helper* y Ad *gutless*. Sin embargo, la mutación de la señal de empaquetamiento no ha sido muy extendida ya que es difícil producir con altos títulos estos vectores. Por esta razón, en la actualidad se están buscando nuevas estrategias para reducir aún más la contaminación de Ad *helper* ya que la recombinasa Cre y la modificación de la señal de empaquetamiento no son suficientes para reducir la contaminación de Ad *helper* por debajo del 1% [280]. En este sentido, reducir la contaminación mediante un proceso de empaquetamiento y maduración más lentos, es una técnica muy atractiva especialmente si se pudiera evitar la recombinación entre Ad *helper* y Ad *gutless* por la señal de empaquetamiento.

5.- Inversión de la señal de empaquetamiento

Una de las estrategias utilizadas para solventar el problema de la recombinación homóloga entre las señales de empaquetamiento de Ad *gutless* y el Ad *helper* ha sido la inversión de la señal de empaquetamiento. La inversión de Ψ no evita la recombinación homóloga entre las señales Ψ , pero si ocurre, el genoma viral generado *de novo* sería tan grande que no podría empaquetarse dentro de la cápside. El grupo que ha tratado más en profundidad el inconveniente de la posible recombinación homóloga entre Ψ de Ad *helper* y *gutless* ha sido el grupo de Philip Ng y colaboradores [245]. Sin embargo, todavía no se han reportado experimentos que muestren que la posible recombinación homóloga se debe por la señal Ψ entre diferentes Ad con la señal de empaquetamiento directa. Asimismo, tampoco se ha demostrado que se evite o se minimice la recombinación homóloga entre un Ad *helper* con la señal de empaquetamiento directa y un Ad *helper* con la señal Ψ inversa. Además, Ng y colaboradores siempre han considerado esta posibilidad como algo remoto, ya que en el año 2000 en una producción de Ad *gutless*, de 70

V. Discusión

genomas *helper* analizados, ninguno había sufrido mutación para las secuencias *loxP*, y por lo tanto, ningún genoma había sufrido la recombinación homóloga [286].

De hecho, se ha descrito que el problema de la recombinación por Ψ podría ser secundario ya que el factor limitante parece ser la concentración de recombinasa Cre en las líneas HEK293/Cre restrictivas para el Ad *helper* [286]. La concentración de la recombinasa Cre es insuficiente para la escisión completa de Ψ y ésta es la razón principal por la que no se rebajan los porcentajes de Ad *helper* por debajo del 1 al 0.1%. Así, Ng y colaboradores postulan que el uso de otras recombinasas unidireccionales no solucionará el problema, ya que el problema de la concentración de enzima no podrá ser superado aunque se usen otras recombinasas y siempre quedarán genomas Ad *helper* capaces de superar el sistema de escisión. Sin embargo, los adenovirus *helper attB* que han recombinado y perdido su señal *attB* tienen una ventaja selectiva y acaban desplazando a los Ad *helper* no recombinantes, cosa que no sucede con los vectores Cre-*loxP* de Philip Ng y colaboradores.

En el año 1987, Patrick Hearing y colaboradores describieron que la inversión de la señal de empaquetamiento no disminuía la eficiencia de empaquetamiento. Por otra parte, la amplificación del virus Ad5/FC31.Cre. Ψ^R demuestra que el genoma puede ser empaquetado eficientemente a las 60 horas. Sin embargo, se empaqueta 10 veces menos cuando es co-infectado con el Ad5/FC31.Cre, lo que indica que este vector, al tener la señal de empaquetamiento invertida, pierde eficiencia con respecto los vectores que tienen la señal Ψ de forma directa.

Para estudiar los posibles fenómenos de recombinación homóloga que podrían darse en el Ad *helper* Ad5/FC31.Cre y Ad5/FC31.Cre. Ψ^R , se decidió crecer estos vectores *helper* conjuntamente con un Ad control con la señal Ψ directa (Ad5/RFP) durante 3 ciclos de amplificación de 36 horas. De este modo, si la recombinación homóloga se llevara a cabo, se podría observar mediante PCR la pérdida de las señales *attB+loxP* clonadas a 5' de la señal Ψ . El ensayo de PCR indicó que el Ad5/FC31.Cre recombinaba desde el primer paso de

amplificación, obteniéndose únicamente el genoma recombinado en el último paso de amplificación. En cambio, el Ad *helper* con la señal Ψ invertida, mantiene su estructura genómica en todos los pasos analizados, lo que indica que este genoma viral evita o minimiza la pérdida de las señales de recombinación para Cre y Φ C31. Además, en este ensayo se puede observar que la cantidad total de Ad *helper* amplificado para el Ad5/FC31.Cre. Ψ^R disminuye en cada paso de amplificación, posiblemente porque el Ad control desplaza al genoma *helper-attB*.

Por otra parte, al comparar la amplificación de Ad5/FC31.Cre. Ψ^R vs Ad5/FC31.Cre co-infectados 60 horas, no con un Ad de 2ª generación, sino con el Ad *gutless* pKCZ, se observó que Ad5/FC31.Cre recombinaba tanto si se partía de plásmido como de partículas virales, mientras que no se detectó, en ningún caso, fenómenos de recombinación para el Ad5/FC31.Cre. Ψ^R con la señal de empaquetamiento invertida. Interesantemente, la ausencia de recombinación ha sido demostrada no sólo en el primer paso de amplificación sino durante los 4 primeros pasos de amplificación del Ad *gutless*, confirmando de nuevo que la inversión de la señal Ψ es una mejora imprescindible para la producción de Ad *gutless* con niveles bajos de contaminación por Ad *helper*.

En resumen, en este trabajo se presenta un Ad *helper* (Ad5/FC31.Cre. Ψ^R) con secuencias de recombinación para las recombinasas Cre y Φ C31, el cual es capaz de empaquetarse deficientemente debido a la clonación de la secuencia *attB*- Φ C31 en el extremo 5' de la señal de empaquetamiento. Además, este vector es capaz de replicarse y producir las proteínas virales en niveles y tiempos similares a un Ad control. Finalmente, el vector Ad5/FC31.Cre. Ψ^R impide eficientemente la posible recombinación homóloga entre Ad *helper* y Ad *gutless* al invertir su señal Ψ , lo que lo convierte en un buen candidato para la producción de Ad *gutless* con bajos niveles de contaminación de Ad *helper*.

VI. CONCLUSIONES

- 1.- Se ha generado una nueva familia de *Ad helper* flanqueando su señal de empaquetamiento con diferentes combinaciones de secuencias de recombinación *attB* y *attP* para la recombinasa Φ C31.
- 2.- Los *Ad helper* generados tienen retrasado su ciclo viral 20-24 horas en comparación a los *Ad* controles sin estar afectada la cinética de replicación del genoma viral y la síntesis de proteínas. Ello sucede en ausencia de la recombinasa Φ C31 y por lo tanto, no es debido a la escisión de Ψ .
- 3.- El empaquetamiento de los genomas *helper* es la causa principal del retraso en su ciclo viral, retrasando a su vez, el inicio del estado de maduración.
- 4.- La secuencia *attB*- Φ C31 es la responsable directa del efecto sobre el empaquetamiento. La hipótesis más factible es que un factor celular interactúe con la secuencia *attB* y dificulte la interacción entre el complejo proteico de empaquetamiento y la señal Ψ .
- 5.- Se ha incorporado el sistema *Cre-loxP* al sistema Φ C31-*attB/attP* para obtener una familia de *Ad helper* sensible al doble sistema de recombinasas. Además, se han generado nuevas líneas celulares productoras de *Ad* con las recombinasas *Cre* y Φ C31 (HEK293/*Cre*.FC31 y N52.E6/*Cre*.FC31).
- 6.- El uso de la línea celular con doble sistema de recombinasas *Cre* y Φ C31 no supone una ventaja selectiva en la producción de partículas infecciosas.
- 7.- El *Ad helper* Ad5/FC31.*Cre* es capaz de producir *Ad gutless* sin contaminación por *Ad helper* durante las primeras 36 horas de transfección con plásmidos. Además, este vector permite la obtención de altos títulos de *Ad gutless* si éstos se crecen durante varios días (240 horas). Es por lo tanto la primera vez que se describe un sistema basado en el empaquetamiento diferencial en el tiempo entre *Ad helper* y *Ad gutless*.

VI. Conclusiones

8.- Durante los pasos sucesivos de la amplificación, los *Ad helper* recombinan con los *Ad gutless* por la señal Ψ generándose *Ad helper* sin la secuencia *attB*. Ello implica un ciclo viral normal de 36 horas y la aparición de niveles elevados de *Ad helper* en la producción de *Ad gutless*.

9.- La inversión de la señal de empaquetamiento en los *Ad helper* evita la recombinación homóloga por las señales de empaquetamiento.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES

1. Cepas bacterianas

Cepa TOP10^R de INVITROGEN utilizada para la amplificación general de plásmidos de menos de 10 Kpb.

F- mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) F80lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 araD139 Δ (ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG.

Cepa BJ5183^R de STRATAGENE utilizada para la generación del genoma viral por recombinación homóloga.

endA1 sbcBC recBC galK met thi-1 hsdR (Str^f)

2. Vectores plasmídicos

Los plásmidos a partir de los cuales se han generado todos los plásmidos utilizados en este trabajo han sido: pTG6600 (Transgene), peGFP-C1, pDsRed2-Mito y pZeo(-) (Clontech), pBCPB+ y pCMV-Int (MTA: *Material Transfer Agreement* de Michele P. Calos), dl309 (cedido por Patrick Hearing), pGEMT-easy (Promega), pKP1.4 , pKP1.4 Δ CMV y pKS-RSV/GFP (MTA Eric Kremer) y pFK7 y pKCZ ó pGS46 (MTA Stefan Kochanek).

3. Vectores virales

En este trabajo se han utilizado diferentes vectores virales de 2^a generación como controles de nuestro *Ad helper*. Se han utilizado los vectores adenovirales Ad5- β Gal y Ad5/GFP cedidos por Eric Kremer y el Adts369 cedido por Patrick Hearing.

4. Cultivos in Vitro

HEK293: *Human Embryonic Kidney cells 293*. Línea celular (ATCC CRL-1573) inmortalizada a partir de células humanas de riñón embrionario. Estas células se han utilizado para la amplificación de los vectores adenovirales generados en este trabajo gracias a que tienen incorporada la región E1 (*early 1*) del adenovirus. Este gen es el primer gen transcrito por el virus y permite la

Materiales y métodos

expresión de todos los demás genes virales. Los vectores adenovirales utilizados en este trabajo no poseen la región E1 para una mayor bioseguridad. De esta manera, los vectores no pueden replicar ni en cultivos celulares que no posean la región E1 ni en seres humanos [170].

HEK293Cre: Línea celular HEK293 que tiene incorporada la recombinasa Cre en el genoma de forma estable [229].

HEK293FC31: Línea celular HEK293 que tiene incorporada la recombinasa FC31 en el genoma de forma estable. Este clon ha sido facilitado por la Dra. M. P. Calos.

5. Tabla de cebadores

CEBADOR	SECUENCIA 5'-3'
MutDIRAgel	CACCGGTGTACACAGGAAGTGACAA
MutREVAgel	CACCGGTGTACACACCAAAAACGTC
attBloxP-DIR	TTATAAAGGTACCCACCGGTCCGCGGTGCGGGTGCCAGGGC GTGCCCTTGGGCTCCCCGGGCGCGTACTCCACGCGGCCGCAT
attBloxP-REV	TTATAAACACCGGTTCGCGGCCGCATAACTTCGTATAATGTATGC TATACGAAGTTATGCGGCCGCGTGGAGTACGCGC
loxPGFP-DIR	CATCAGTGGTCGACGCCGCTCTAGAACTAGTGGATC
loxPGFP-REV	GGACGTTTGTGCGACATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAG TTATAGATACATTGATGAGTTTGGAC
6600XhoIDIR	TGGCTCGAGGGTGGGAAAGAATATATAAGGTG
6600XhoIREV	ACCCTCGAGCCACGCCACACATTTTC
loxP/GFP-DIR	GATCAGTGGTCGACGCCGCTCTAGAACTAGTGGATC
loxP/GFP-REV	GGACGTTTGTGCGACATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAG TTATAGATACATTGATGAGTTTGGAC
loxP-GFP-DIR/Spel	CCAAACTAGTATAAACTTCGTATAAGTATGCTAT
loxP-GFP-DIR/SalI	TTCCGTCGACCCCTATGGTGCACTCTCAGT
RFP-DIR	CGCCAAGATCCATTCGTTGG

RFP-REV	CCACAAC TAGAATGCAGTG
ΨDIR <i>Sa</i>II	GGGCGTCGACGGATGTTGTAGTAAATTTGGGC
ΨREVA <i>vr</i>II	AAACCCTAGGGGCGAGTCTCCACGTAAAC
ITR 5'	TACCTTATTTTGGATTGAAGCC

MÉTODOS

1. Obtención de ADN plasmídico

1.1 Minipreparaciones de ADN plasmídico

Para la obtención de ADN plasmídico en bajas cantidades (5-15 µg) se realizaron minipreparaciones de ADN por lisis alcalina a partir de 3mL de medio de cultivo.

Método:

Centrifugar el cultivo en un eppendorf de 1.5 mL durante 1 minuto a 14.000 rpm. Eliminar sobrenadante y resuspender el precipitado celular en 200 µl de la solución de resuspensión. Añadir 400 µl de la solución de lisis y mezclar la solución suavemente. Añadir 400 µl de la solución de precipitación proteica y agitar la solución hasta homogeneizar el precipitado. Incubar la solución 10 minutos en hielo. Centrifugar 10 min a 14.000 rpm. Recuperar sobrenadante en un nuevo tubo y añadir 550 µl de iso-propanol e incubar la solución 10 minutos a temperatura ambiente. Centrifugar a 12000 rpm durante 10 minutos. Lavar con etanol al 70% y resuspender en 30 µl de agua milliQ.

Solución de resuspensión: 50 mM Tris-Cl a pH 8.0; 10mM EDTA; 100 µg/mL RNAsaA.

Solución de lisis: 200mM NaOH; 1% SDS (w/v).

Solución de precipitación proteica: 3.0 M Acetato potásico pH 5.5.

1.2 Maxipreparaciones de ADN plasmídico

La obtención de ADN plasmídico en altas cantidades (250-1000 µg) se realizó mediante el kit “PhoenIX Maxiprep Kit” de Q-BIOgene (#2075-300) o el “Plasmid Maxi kit” de QIAGEN (#12163) en cultivos de 200 a 500 mL dependiendo del plásmido (alto o bajo número de copias por célula). Las preparaciones se realizaron siguiendo el protocolo facilitado por el fabricante.

1.3 Preparación de bacterias quimiocompetentes

Las bacterias competentes se han preparado siguiendo el método de sales de rubidio que se encuentra detallado en el protocolo número 2 del catálogo de QIAGEN the Qiaexpressionist (www1.qiagen.com/HB/QIAexpressionist).

2. Modificación y purificación de ADN plasmídico

2.1 Enzimas de restricción, de ligación y desfosforilación

Las endonucleasas de restricción son enzimas purificados a partir de diferentes cepas bacterianas u hongos, las cuales actúan reconociendo específicamente secuencias cortas de nucleótidos y rompiendo los enlaces fosfodiéster de la hebra de ADN por un lugar determinado.

Los enzimas utilizados en este trabajo provienen de la marca FERMENTAS y NEW ENGLAND Biolabs. Se han utilizado entre 4 y 10 U de digestión para 2 µg de ADN plasmídico en las condiciones de temperatura y solución establecidas por el fabricante. El tiempo de digestión varía de 1-18 horas en función de las unidades de enzima administrados. La ligasa y fosfatasa alcalina se han utilizado en las dosis y tiempos recomendados por el fabricante. La ligasa T4 de ADN (New England Biolabs) se utiliza a 16°C entre 4-18 horas y se inactiva por calor a 65°C durante 20 min. La fosfatasa alcalina CIP (Alkaline Phosphatase, Calf Intestinal) de New England Biolabs, se utiliza a 37°C durante 30 min.

2.2 Electroforesis en gel de agarosa

Preparación del gel:

Fundir la Agarosa (Seaken LE Agarose #50005 Iberlabo) usualmente al 1% (peso/volumen) en tampón TAE (1X). Calentar la mezcla (en un vaso de precipitados) y enfriar en agua fría hasta atemperar el medio. Verter la muestra en el portageles y colocar un peine adecuado al volumen de carga. Una vez polimerizado el gel, se retira el peine y se añade TAE (1X) hasta que sobrepase el gel 1mm. En este momento se cargan las muestras en los pozos del peine con el tampón de carga (normalmente acompañado de un colorante). Aplicar una corriente de 70-100 V el tiempo necesario para la separación de las bandas de ADN. Extraer el gel del portageles y sumergir el gel en una solución con bromuro de etidio (TAE 1% + 100 µg/ml EtBr). Incubar 10 min y visualizar bajo luz UV.

Material

Fuentes de electroforesis Power Pac Basic (BIORAD).

Portageles y cubetas MAX FILL (BIORAD).

Cámara con luz UV (SYNGENE IMAGING SYSTEM de SYNGENE).

Programa de visualización y captación de imágenes Genesnap (SYNGENE).

TAE 1X: 40 mM Tris-Acetato Ph=8.0; 0,1mM de EDTA.

Tampón de carga 10X: 50% glicerol, 100 mM EDTA pH: 8.0, 1 % SDS, 0.1% Bromophenol Blue/0.1 Xylene Cyanol FF y diluir en agua milliQ.

2.3 Purificación de fragmentos de ADN

La purificación de ADN en geles de agarosa se realizó mediante el kit GENE CLEAN Turbo Kit de Q-BIOgene (Cat. nº:1102#400) siguiendo el protocolo facilitado el fabricante.

3. Obtención de los vectores adenovirales

3.1 Técnicas de clonación

3.1.1 Clonación de productos de PCR mediante Timina/Adenina (TA cloning)

Durante los últimos ciclos de una reacción de PCR, la Taq polimerasa (Taq Pol) puede introducir una adenina en el extremo final del fragmento amplificado. Por ello, se utiliza un plásmido digerido que contiene en sus extremos una Timina para la clonación de fragmentos amplificados por Taq Pol. De esta manera, se puede ligar el fragmento amplificado con este plásmido. El plásmido utilizado, “pGEMT-easy vector” de PROMEGA (#A1360), permite una selección “blue/white” (azul/blanco) de las colonias positivas y así facilitar la elección de las colonias a amplificar. Al clonar un fragmento de ADN dentro del gen beta-galactosidasa (donde se encuentra la zona de clonación), se rompe la pauta de lectura del gen y se evita que la proteína pueda transformar el azúcar X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-galactopyranoside) y de esta manera, dar una coloración azul. Al crecer las colonias junto con el azúcar X-gal + IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside), si el plásmido incorpora un fragmento de ADN, las colonias serán blancas.

3.1.2 Clonación mediante topoisomerasa (pCR-XL-TOPO)

Este método permite la clonación de fragmentos de ADN de alto peso molecular amplificados por PCR gracias a la Topoisomerasa I del virus *Vaccinia* que une cadenas de ADN amplificadas por PCR al extremo CCCTT-P del plásmido pCR-XL-TOPO de Invitrogen (#K4700-10). Las hebras amplificadas no deben contener extremos con fosfato en 5'. La clonación de las hebras se realizó siguiendo las instrucciones facilitadas por el fabricante.

3.1.3 Recombinación homóloga en bacterias

Para realizar la recombinación homóloga, se linealizó el plásmido pKP1.4 con el enzima de restricción *Swa*I y el plásmido lanzadera adenoviral que se quiere recombinar con 1 ó 2 enzimas que tengan dianas fuera de la zona de recombinación de interés. Se mezclan 50 ng del pKP1.4-*Swa*I con 50, 100 y 150 ng del plásmido lanzadera linealizado y se transforma en células BJ5183. Se

comprueba la clonación mediante digestión de las colonias amplificadas y los clones positivos se transforman en la cepa TOP10 que permite un mayor rendimiento de la cantidad de ADN plasmídico. Se comprueba el patrón de digestión con diferentes enzimas de restricción hasta la elección de un clon positivo. Mantener el ADN a -20°C ó -80°C debido a que el plásmido, de alto peso molecular, se degrada a temperatura ambiente.

3.1.4 Recombinación homóloga en células HEK293

A diferencia del punto anterior, la recombinación homóloga realizada dentro de células humanas permite la generación directa de nuevas partículas virales y por lo tanto, la generación *de novo* del genoma adenoviral por recombinación. Para realizar la recombinación, se linealiza un plásmido que contiene el extremo 5' del Adenovirus (derivado del pTG-6600), con *PacI*. Este plásmido linealizado llevará el *cassette* de interés que quiere ser incorporado dentro del genoma adenoviral. Además de esta zona de interés, este fragmento debe de contener, en su extremo 3', una zona de recombinación de unas 1-3 Kpb para permitir la recombinación con el genoma adenoviral, el cual está digerido de tal forma que queda eliminado el extremo 5' del Adenovirus y permite la recombinación homóloga con el fragmento de interés. Debido a que el vector adenoviral generado puede lisar la célula y propagarse por el medio hacia el resto de las células de la placa, se añade una capa de agarosa durante 3-4 días, limitando así la propagación a las células vecinas. Al cabo de 3-4 días, se añade una segunda capa de agarosa para aportar nutrientes y evitar que se sequen las placas. La generación de vectores adenovirales se constata mediante la aparición de calvas en la placa, que están formadas por restos de células lisadas. Cada calva contiene un clon independiente de partículas adenovirales que deberá ser aislado de forma independiente para ser traspasado a una nueva placa de 24 o 6 pozos con células permisivas HEK293 o N52.E6 para su posterior amplificación. Para realizar este experimento cabe introducir un control positivo para comprobar que el experimento es válido y no ha habido ningún problema en ninguno de los pasos empleados. Para ello, se utilizará el genoma adenoviral de igual modo conjuntamente con un plásmido control que contenga el extremo 5' del Ad sin ninguna mutación, eliminación o incorporación de ADN.

Materiales y métodos

Para la primera capa de agarosa:

Solución I:

1.8 mL de 2X DME-Completo.

0.2 mL FBS

0.04 mL 5% extracto de levadura en agua milliQ (Disco #0127-15-1) filtrado estérilmente (0,45 µm).

Calentar hasta 37°C.

Solución II:

2 mL de agarosa (1%) en agua autoclavada y calentada hasta 55°C.

Mezclar la solución I y II y dispensar 4 mL por cada pozo de placa de 6 pozos. Dejar solidificar 10 minutos a temperatura ambiente. Una vez solidificado poner a 37°C, 5% CO₂.

Una vez transcurridos 3-4 días, se prepara la segunda capa de agarosa:

Mezclar la solución I y II y dispensar 3 mL por cada pozo de placa de 6 pozos. Dejar solidificar 10 minutos a temperatura ambiente. Una vez solidificado poner a 37°C, 5% CO₂.

Si al transcurrir 3 días más no se ven calvas, cabría poner de nuevo una nueva capa de agarosa sobre la placa siguiendo el protocolo para la segunda capa (mezclando la solución I y la solución II).

2X-DME-Completo:

Añadir a 500 mL de medio 2X DME

50 mL 7.5% bicarbonato sódico.

25 mL Hepes 1M pH=7.5.

20 mL HCS

Penicilina/Streptomycin al 1%.

3.2 Preparación/Purificación del genoma adenoviral para su transfección en células HEK293

El plásmido adenoviral se linealiza por la diana *Pacl* para eliminar el origen de replicación y el gen de resistencia a Ampicilina. Digerir 100 µg de ADN con 50 U de *Pacl* en un volumen final de 200 µl durante 14-16 horas. Precipitar con 20 µl de Acetato potásico 3M pH=5.2 y 550 µl de etanol absoluto frío e incubar 30 min a -80°C. Centrifugar a 14000 rpm y 4°C y descartar el sobrenadante. Lavar las células con etanol al 70% y dejar secar durante 15 min. Resuspender las

células en agua milliQ o TE (10mM Tris-HCl/1mM EDTA, pH=8), e incubar 1 hora a 37°C.

3.3 Amplificación de fragmentos de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR: *Polymerase Chain Reaction*)

La PCR consiste en la amplificación de fragmentos de ADN mediante el uso de 2 oligonucleótidos (o cebadores) que hibridan de forma complementaria con los extremos de la zona que quiere ser amplificada. La enzima Taq polimerasa incorpora los nucleótidos necesarios hasta llegar al final de la hebra de ADN y de esta manera amplificar la zona de interés. Este proceso repetido hasta 30-35 ciclos amplifica de forma específica un fragmento de ADN.

En las PCR del presente trabajo se han utilizado los siguientes reactivos y condiciones:

Reactivos.

20-50 pmol de cada uno de los oligos a utilizar.
5 µl tampón para el enzima Taq Pol.
4 µl MgCl₂ (25 mM)
0.4 µl dNTPs (25 mM)
0.3 µl Taq Pol (5U/µl)
50 ng de ADN de interés.
Volumen final: 50 µl agua milliQ

Condiciones de amplificación del termociclador:

95°C-5 min.
94°C-30".
(94°C-30", 54°C-30 min, 74°C-1 min) 30-35 ciclos.
74°C-2 min.
25°C-5 min.
Mantener a 4°C o congelar a -20°C.

Las condiciones de amplificación pueden variar en función del número de Kpb (1 min/Kb), del ADN de partida (10 ng para plasmídico o 100 ng para genómico) o del oligonucleótido utilizado (temperatura de unión a la cadena molde).

3.4. Mutagénesis dirigida

La mutagénesis dirigida permite mutar específicamente uno o varios nucleótidos de un fragmento de ADN de interés. Las mutagénesis llevadas a cabo en esta tesis fueron realizadas para obtener dianas de restricción necesarias para las clonaciones en los vectores adenovirales.

Se utilizaron las siguientes **condiciones de PCR**:

45 μ l de *MIX high fidelity* (Platinum PCR *Supermix high fidelity* de INVITROGEN, #12532-016) Este *mix* contiene todos los elementos necesarios para la amplificación de fragmentos de ADN por PCR.

10 pmol de cada primer.

10 μ g de DNA plasmídico

Volumen final: 50 μ l de agua milliQ.

Ciclos de reacción:

95°C 1 min,

(95°C 30", 51°C 30 sec, 68°C 7 min) 15 ciclos,

68°C 7 min

25°C 5 min.

Posteriormente a la reacción de PCR, se añaden, durante 1 hora a 37°C, 5.6 μ l de tampón de *DpnI* más 10 U de enzima *DpnI*, que degrada el ADN proveniente de bacteria.

Se transforman (5 μ l de la muestra) en células competentes y se hacen crecer las colonias para una posterior comprobación mediante patrón de digestión.

4. Cultivos in Vitro

4.1 Subcultivo de células

Las células se subcultivan a una nueva placa cuando adquieren un 80-90% de confluencia en placa. Para ello se realiza el siguiente protocolo: Aspirar el medio y lavar con solución salina al 1X. Añadir 10 mL de solución salina (1X) e

incubar a temperatura ambiente durante 5-10 min. Recolectar las células y centrifugarlas a 1000-1500 rpm durante 5 min. Aspirar el sobrenadante y resuspender las células con medio de crecimiento DMEM + 10% FBS + 1% Penicilina/Estreptomina. Una vez resuspendidas, depositar una fracción del total sobre una nueva placa y añadir medio de crecimiento.

Solución salina: 50 gr cloruro de potasio, 20 gr de cloruro de sodio y agua destilada hasta 500 mL.

Medio de crecimiento: DMEM + 10% FBS + 1% P/S (Penicilina/Estreptomina).

5. Amplificación y titulación de los vectores adenovirales

5.1 Amplificación de los vectores adenovirales

5.1.1 Transfección de los plásmidos adenovirales

Preparar un complejo PEI/ADN en 2 tubos eppendorfs por separado. Utilizar 3 µg de ADN viral por cada 1E6 células en un volumen final de 150 µl de NaCl (150 mM) y en un segundo tubo, 6.8 µl de PEI (10mM) en un volumen final de 150 µl de NaCl (150mM). Una vez ambos componentes están preparados en tubos por separado, añadir la solución de PEI gota a gota sobre el ADN e incubar la mezcla 15-25' a temperatura ambiente. Añadir 700 µl de medio de cultivo (DMEM + 2% FBS). Aspirar el medio de las células y añadir suavemente la mezcla sobre 1 pozo de placa de 6 pozos al 70% de confluencia. Incubar 4 horas a 37°C, 5% CO₂. Posteriormente, aspirar el medio y añadir 2 mL de medio de crecimiento (DMEM + 10% FBS). A las 72 horas, recolectar las células y realizar 3 ciclos de congelaciones/descongelaciones (en el caso de los adenovirus que contienen la secuencia *attB*, los tiempos de producción se alargaron hasta los 5-7 días). Centrifugar las células a 4000 rpm durante 5 min y el sobrenadante (lisado crudo) se utiliza para el siguiente paso de amplificación.

PEI utilizado: Polyethylenimine MW=25 000 (Aldrich ref=40,872).

5.1.2 Crecimiento de los vectores adenovirales

Tras haber transfectado el plásmido adenoviral en placas de 6 pozos, el lisado crudo se utiliza para infectar un número mayor de células. De una placa de 6 pozos se utiliza el 100% del lisado crudo para infectar una placa de 10 cm de diámetro. Transcurridas 36 horas, recolectar las células y realizar 3 ciclos de congelaciones/descongelaciones. En el caso de los adenovirus que contienen la secuencia *attB*, los tiempos de producción se alargaron hasta las 60-72 horas. Centrifugar las células a 4000 rpm durante 5 min y el sobrenadante (lisado crudo) se utiliza para el siguiente paso de amplificación.

El lisado crudo proveniente de la placa de 10 cm se utiliza para infectar 2 placas de 15 cm de diámetro y el que se obtiene de estas placas servirá para infectar hasta 20 placas de 15 cm, siendo éste último lisado el que se utilizará para purificar el vector adenoviral de elección.

5.2 Purificación de los vectores virales de 2ª generación

Una vez recolectadas las células resuspendidas en 40-45 mL de medio del sobrenadante, se realizan 2 centrifugaciones seriadas en gradiente de CsCl. La primera se realiza con un gradiente de CsCl con 2.5 mL (1.25gr/mL) y otros 2.5 mL (1.4 gr/mL). Posteriormente, se añade suavemente la fracción de virus sobre el gradiente hasta rellenar todo el tubo de centrifugación (Beckman, *Centrifuge tubes Polyallomer, #331374*). Centrifugar los tubos en un rotor SW40 durante 1.5 horas a 35000 rpm y 18°C. De esta manera, se obtienen bandas donde están las cápsides llenas de ADN viral, las cápsides vacías y restos de proteínas virales. Se extrae la banda de cápsides llenas de ADN con una aguja hipodérmica (BBRAUN 100 Sterican 1.20X40 mm 18Gx 1.5”). En la segunda centrifugación se utiliza un gradiente de 1.34 gr/mL, que es aproximadamente la densidad de un virión formado. En este caso se depositan 5 mL de CsCl (1.34 gr/mL) y sobre éste la muestra proveniente de la primera centrifugación. Al centrifugar en un rotor SW40 durante 18 horas a 35000 rpm y 18°C, se observan normalmente 3 bandas. Una de mayor densidad con las cápsides formadas con ADN viral y dos de menor densidad que corresponden a las cápsides vacías y a las proteínas virales. Una vez centrifugado el virus, se extrae la banda con una aguja hipodérmica y se utiliza una columna de

Sephadex (PD-10 *desalting columns*, Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) para eliminar los restos de CsCl (tóxico para las células).

5.3 Titulación de los vectores adenovirales

La titulación de los vectores adenovirales se llevó a cabo por dilución límite desde 10^{-3} hasta 10^{-10} en placa de 96 pozos con células HEK293 a un 80% de confluencia. Se trabaja en triplicado para minimizar errores y en volumen de 100 μ l por pozo. Debido a que todos los adenovirus utilizados presentan expresión del gen GFP ó RFP, su titulación se realizó contabilizando las células que expresan GFP/RFP mediante microscopía de fluorescencia (NIKON *Inverted Microscope ECLIPSE TS100/TS100-F*).

6. Caracterización del ciclo viral de los adenovirus *helper*

6.1 Determinación del ciclo celular

El ciclo celular de los diferentes vectores adenovirales se estudió en placa de 24 pozos con una MOI=5 utilizando los adenovirus Ad5/FC31.2, Ad5/*attP* y Ad5/GFP y una n=3. Se recogieron muestras desde las 24 hasta las 64 horas cada 4 horas. Prácticamente, la producción de los vectores antes de las 24 horas es nula o muy baja. A continuación, se recoge por separado el sobrenadante y se añaden de 500 a 1000 μ l para recoger las células y de esta manera poder cuantificar, de forma separada, el virus extracelular del intracelular. Para calcular la producción total de adenovirus, se recogen ambas partes conjuntamente. Realizar 3 ciclos de congelaciones/descongelaciones para la fracción celular del lisado crudo (en el caso del sobrenadante no es necesario) y liberar el virus intracelular. Debido a que el número de muestras es muy elevado (>500), se utilizaron 0.5-1 μ l de la muestra directamente sobre un pozo de 96 pozos y se realizaron 4 diluciones seriadas. Normalmente, con esta cantidad de muestra es posible ver desde un 0.1 % de células infectadas hasta un 100%. De esta manera se puede visualizar fácilmente la curva sigmoideal de crecimiento que presentan estos vectores.

6.2. Análisis de la cinética de replicación viral mediante Dot blot.

El análisis de la cinética de replicación viral consiste en la cuantificación de los genomas adenovirales replicados dentro de las células HEK293 a diferentes tiempos. Posteriormente, se purifica el ADN de interés (véase punto 6.4.1), y se transfieren las muestras a una membrana mediante el uso de una bomba de vacío y se fijan mediante luz UV (*UV-stratalinker* 1800 Stratagene, La Jolla, CA) (Véase punto 6.2.1). A continuación se analizan las muestras siguiendo el protocolo que se detalla en el punto 6.2.2-3 para su posterior cuantificación.

6.2.1 Montaje del Dot Blot y aplicación de las muestras

Sumergir la membrana de nailon (HybondTM-N+, Amersham Biosciences) unos minutos en agua destilada. Depositar 3 papeles de GB-002 (Shleicher & Schuell, keene, New Hampshire) humedecidos en SSC (6X) junto con la membrana humedecida sobre ellas (Roche Diagnostics Corp, Indianápolis, IN – ref.1 417 240) en el soporte de Dot Blot (*96 well Dot Blotter*, DHM 96 SCIE-PLAS). Ajustar la membrana al soporte. Abrir el vacío del soporte de Dot Blot y lavar los pocillos con 150 µl de agua destilada. Apagar el vacío (*Diaphragm vacuum puma, vacuumbrand* GMBH+CO KG) y aplicar la muestra evitando la aparición de burbujas. Lavar los pocillos con 80 µl de NaOH 0.4M/10 mM EDTA. Aplicar el vacío durante 10 min. Sacar la membrana y lavarla en SSC (2X) durante 30 min. Secar con papel *Whatman* durante 30 min. Fijar la membrana por luz UV (*UV-stratalinker*).

20X SSC

NaCl 3M
Citrato sódico 0,3M pH=7,4

6.2.2 Marcaje y detección de la sonda

Una vez transferido y unido el ADN a la membrana se pone en contacto la sonda marcada para unirla al fragmento de ADN de interés. A continuación, se lava y se detecta según el método empleado. El marcaje de la sonda se realiza mediante el kit Alk Phos Direct de Amersham Biosciences (RPN3680) y el reactivo de detección CDP-StarTM (RPN3682) siguiendo las instrucciones facilitadas por el fabricante.

6.2.3 Hibridación y revelado

La membrana se pre-hibrida con una solución de hibridación (facilitada por el fabricante, Amersham Biosciences #RPN3680) a 55°C durante 15 min con agitación suave. A continuación, se añade la sonda, ya marcada según el punto anterior 6.2.2, durante toda la noche en agitación suave a 55°C (Horno de hibridación Problot™ Jr, Labnet). Una vez unida la sonda a la membrana, la membrana se lava para eliminar los restos de sonda sobrantes. Se calienta la solución de lavado primario durante 10 minutos a 55°C y se efectúan 3 lavados de la membrana (1 de 5 min y 2 de 10 min). A continuación se realizan 4 lavados de la membrana con la solución de lavado secundario a temperatura ambiente. Para revelar la membrana, se añade el reactivo CDP-Star encima de la membrana y se incuba durante 5 min. A continuación, se expone en el Fotodocumentador GeneGNOME (SYNGENE #51000) durante 5-30 min y se obtiene una imagen del marcaje de la sonda con el ADN de interés. Si la detección no es buena porque se ha dispuesto de poca muestra o el marcaje de la sonda es inferior al esperado, se puede detectar mediante un “film” (*High Performance chemiluminescence film*, Hyperfilm™ ECL, Amersham Biosciences).

Solución de lavado primario: 2M urea, 0.1% SDS, 50mM fosfato sódico pH=7.0, 150mM NaCl, 10 mM MgCl₂ y 0.2% agente de bloqueo).

Solución de lavado secundario 20X: 1M Tris base, 2M NaCl y ajustar el pH a 10.

Solución de lavado secundario 1X: diluir el stock 20X con agua milliQ hasta 1X y añadir 2 mL de MgCl₂ (1M).

6.3 Análisis de la cinética de producción proteica mediante FACS

El análisis por FACS de los diferentes Ad se realizó en placa de 24 pozos utilizando los adenovirus Ad5/FC31.2, Ad5/*attP* y Ad5/GFP con una n=2 y un 30% de infección. Se recogieron muestras a las 24, 30 y 36 horas. Posteriormente, se lavaron las células con PBS al 1% y se fijaron en paraformaldehído al 2%. Una vez fijadas las células, se analizaron y se cuantificaron en el servicio de FACS (*Fluorescent-Activated Cell Sorting*) del Instituto IBB-UAB (Universidad Autónoma de Barcelona).

6.4 Ensayo de empaquetamiento

Este ensayo sirve para identificar el empaquetamiento diferencial que existe entre un vector de estudio y un vector control. Además, el ensayo permite cuantificar la replicación de ambos vectores a tiempo final. De esta manera, se puede cuantificar tanto el número de genomas que se amplifican (replicados), como los que se empaquetan del vector de estudio en relación al vector control. La transfección se realizó en placas de 15 cm (5 placas) a un 85% de confluencia con una MOI=5 de cada uno de los vectores utilizados. Se recolectó el lisado crudo a las 36 horas y se realizaron 3 congelaciones/descongelaciones. Seguidamente, se procede a extraer el ADN de alto peso molecular para cuantificar el ADN replicado (Véase el apartado 6.4.1) y el ADN empaquetado mediante 2 gradientes de CsCl como se ha explicado en el punto 5.2. Una vez extraída la banda de CsCl, se extrae el ADN siguiendo el protocolo del punto 6.4.1. Se recoge un 6% del total del volumen para realizar la preparación de ADN de alto peso molecular y el resto se utiliza para realizar los gradientes de CsCl.

6.4.1 Extracción de ADN viral desde virus purificado o lisado viral

Utilizar 100 µl de lisado crudo viral o 10 µl de virus purificado en gradiente de CsCl. Añadir 7 µl de 10% SDS, 3 µl de 0.5 M EDTA y 20 µl de proteinasa K (20 mg/mL) (Roche, #3115879001). Mezclar e incubar 3 horas a 55°C en un baño de agua. Posteriormente, calentar la muestra 5' a 95°C. Llevar la muestra hasta un volumen final de 200 µl con agua milliQ y añadir 100 µl de acetato amónico 7.5M. Extraer la mezcla con 300 µl de Fenol/cloroformo/isoamil alcohol (25:24:1). Transferir la fase superior a un nuevo tubo de 1.5 mL eppendorf evitando la interfase. Añadir 600 µl de etanol 100% e incubar la muestra 30 min a -80°C. Centrifugar la muestra y lavar con etanol al 70%. Disolver el precipitado en 50 µl de agua milliQ.

6.4.2 Preparación de ADN de alto peso molecular

Extraer el lisado crudo de las placas y centrifugar a 1500 rpm durante 10 min, 4°C. Eliminar el sobrenadante y resuspender el precipitado celular en 1mL de

PBS. Centrifugar las células a 2000 rpm durante 5 min a 4°C. Aspirar el PBS del sobrenadante y resuspender las células en 1 mL de solución isotónica (150 mM NaCl, 10 mM Tris pH 7.4, 1.5 mM MgCl₂). Añadir NP40 hasta un 0.6% de concentración final y agitar con vórtex durante 10 segundos para finalmente incubarlo en hielo durante 10 min. Aspirar el sobrenadante y agitar el precipitado con vórtex a baja velocidad. Resuspender el precipitado en 200 µl (10mM Tris pH 8). Añadir 200 µl de la solución-I e incubarlo la muestra 2 horas o durante toda la noche a 50-60°C. Extraer por fenol/cloroformo hasta 3 veces y posteriormente, extraer la muestra con el mismo volumen de cloroformo 2 veces. Seguidamente añadir un 1/10 del volumen total de acetato sódico (3M) y 2 volúmenes de etanol previamente enfriado a -20°C. Precipitar con etanol (-20°C durante toda la noche o -70°C durante 20-30 min) y centrifugar la muestra a la máxima velocidad durante 20 min. Decantar el sobrenadante y lavar el precipitado con etanol al 70%. Remover el sobrenadante y dejar secar el precipitado a temperatura ambiente durante 5 min para posteriormente resuspender en 500 µl de agua milliQ o TE (10mM Tris-HC pH=8.0, EDTA 1mM pH=8). Digerir con enzimas de restricción un microgramo de ADN y aplicar la muestra para realizar un Southern Blot como se explica en el apartado 6.4.3. En el caso del ADN viral extraído de la banda purificada por ultracentrifugación en CsCl, se digieren y se aplican 100 ng de ADN viral.

Solución-I (para 10mL)

800 µl H₂O milliQ
4mL 1M Tris pH 8.0
4mL 0.25 M EDTA
1mL 10% SDS
200 µl de proteinasa K (10mg/mL)

6.4.3 Southern Blot

La técnica de Southern Blot permite la detección de fragmentos específicos de ADN previamente separados por peso molecular mediante electroforesis. La muestra se transfiere a una membrana de nailon o nitrocelulosa y posteriormente, el ADN se inmoviliza mediante luz ultravioleta y se identifica el

Materiales y métodos

fragmento de interés mediante una sonda específica que hibrida con él, que está marcada por diferentes métodos (radioactividad o quimioluminiscencia).

6.4.3.1 Protocolo de Southern Blot

Una vez realizada la electroforesis, el ADN se visualiza mediante bromuro de etidio y exposición a luz ultravioleta. De esta manera podemos observar que el patrón de bandas es correcto. A continuación, se trata el gel para conseguir una buena transferencia del ADN a la membrana y el ADN se desnaturaliza para su posterior hibridación con la sonda marcada.

Para ello, se incuba el gel 15 min con HCl (3 mL HCl en 150 mL agua destilada) para despurinizar el ADN y asegurar la transferencia de copias de alto peso molecular. Se trata 45 min en solución alcalina con 5 N de NaOH, 1.5 M de NaCl (105 mL agua destilada, 3 gr NaOH, 45 mL NaCl 5M) para desnaturalizar el ADN y de esta manera hibridar con la sonda marcada. A continuación, se neutraliza el gel con 20X SSC durante 45 min que permite neutralizar el pH y que el ADN adquiera de nuevo carga negativa.

6.4.3.. Transferencia de ADN por capilaridad a membrana

La transferencia por capilaridad consiste en la transferencia de ADN a una membrana cargada positivamente (Roche Diagnostics Corp, Indianápolis, IN – ref.1 417 240) en tampón de alta fuerza iónica (10X SSC). La transferencia se realiza mediante papeles (GB002 y GB004 – Schleicher & Schuell, keene, New Hampshire) que permiten el paso del tampón por capilaridad. La transferencia se realiza entre 2 y 18 horas. Una vez realizada la transferencia, se irradia la membrana con luz ultravioleta siguiendo el programa (*optimal crosslink*) del *UV-stratalinker* 1800 (Stratagene, La Jolla, CA) para unir el ADN a la membrana. Seguir las instrucciones del punto 6.2.2 para el marcaje y detección de la sonda y el punto 6.2.3 para su hibridación y revelado final.

6.5 Gel de electroforesis con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE), Tinción de plata y Western Blot

La electroforesis en gel de Poli-acrilamida con Dodecil Sulfato Sódico (SDS-PAGE) permite la separación de proteínas por peso molecular. Una vez

separadas las proteínas, el gel puede tratarse con tinción de plata para observar de forma global todas las proteínas o puede utilizarse la técnica de Western Blot para inmunodetectar una proteína específica.

6.5.1 Gel de electroforesis de poli-acrilamida en dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE)

El montaje de los geles se llevó a cabo en una célula de electroforesis (BIO RAD Mini-PROTEAN 3 Cell) siguiendo las instrucciones facilitadas por el fabricante. Para la separación de proteínas entre 16 y 70 KDa, se prepara un gel al 10% de poli-acrilamida. Para separar proteínas entre 12 y 45 KDa, se prepara un gel al 15% en poli-acrilamida. Para separar proteínas entre 60 y 200 KDa, preparar un gel al 5% en poli-acrilamida. Los cristales del gel se han de lavar con agua destilada y la cara que tocará el gel con etanol al 70%.

Preparación del gel separador al 10% de poli-acrilamida.

5mL 30% archilamida / 0.8% Bis-acrilamida.
3.75 mL 4XTris-HCl / SDS pH=8.8.
6.25 mL agua destilada.
50 µl Persulfato amónico (APS).
10 µl TEMED.

Mezclar bien y depositar con una pipeta *pasteur* en la parte superior del gel hasta que queden entre 2 y 3 cm por la parte superior. Añadir agua destilada para evitar la evaporación del gel y dejar solidificar el gel durante 20 min.

Preparación del gel de “*staining*”

600 µl 30% archilamida/0.8% Bis-acrilamida.
888 µl 4XTris-HCl/SDS pH=6.8
2 mL agua destilada.
50 µl Persulfato amónico (APS).
10 µl TEMED.

Mezclar bien y depositar con una pipeta *pasteur* hasta arriba del todo. Poner inmediatamente el peine de forma inclinada para evitar burbujas. Dejar solidificar de 45 min a 1 hora. Sacar el peine y limpiar los pozos con agua destilada y secar con papel *Whatman*.

Materiales y métodos

Preparación de las muestras.

Utilizar el peine adecuado dependiendo del volumen de muestra a cargar (20-50 µl). Añadir tampón de carga 2X a las muestras según su volumen final. Utilizar un marcador de proteínas para identificar el peso molecular de las proteínas de la muestra (SDS-PAGE Molecular *weight standards, Broad Range*; #161-0317, BIORAD) y utilizar el tampón de carga si éste no lo incorpora. Desnaturalizar muestras y marcador 10 min a 100°C. Depositar en hielo durante 2 minutos.

Tampón de carga 2X

Para 10 mL
2mL 0.5 M Tris-HCl, pH=6.8.
2 mL 20% SDS.
2 ml glicerol.
2mL 1M DTT.
añadir azul de bromofenol (200 µl).

Electroforesis del gel SDS-PAGE

Se cargan las muestras con puntas de pipeta alargadas para facilitar la carga. Correr el gel a 100 V durante 90 minutos. Transcurrido el tiempo de electroforesis, se extrae el gel para ser transferido.

Tampón de electroforesis 5X

15.1 gr. Tris base.
72 gr. Glicina.
5 gr. SDS (5%).
Añadir agua destilada hasta 1 L.

Tampón de transferencia 5X

15.1 gr Tris base.
72 gr. Glicina.
Añadir agua destilada hasta 1 L.

Tampón de transferencia 1X

200 mL tampón de transferencia 5X.
200 mL de metanol.
600 mL de agua destilada.

6.5.2 Tinción de plata de proteínas virales

Una vez separadas las proteínas en un gel de SDS-PAGE, tratar el gel con el siguiente protocolo:

- 1.- 400 mL (50% Metanol/10% Ácido acético) 20 min.
- 2.- 400 mL (10% Metanol/5% Ácido acético) 20 min.
- 3.- 32.6 μ M DTT (7.5 μ l de un stock 1 M) 20 min.
- 4.- 250 mL 12 mM AgNO₃ (0.51 gr para 250 mL) 15 min.
- 5.- 2x250 mL (2% Carbonato potásico + 300 μ l de Formaldehido al 37%) de 2-8 min. Al aparecer las bandas de proteínas del gel, traspasar el gel a la misma solución nueva.
- 6.- Para parar la reacción utilizar Ácido acético al 1%.
- 7.- Lavar con agua destilada 2-3 veces.

En el caso de que la membrana del gel sea pequeña los volúmenes pueden reducirse 4-5 veces.

6.5.3 Western Blot e inmunodetección

Transferencia del gel SDS-PAGE.

El gel fue transferido a una membrana de PVDF (*Hybond P*, Amersham-Pharmacia) mediante *Trans-Blot* (*Trans-blot SD semi-dry transfer cell*, BIORAD). El proceso se realizó durante 45 min a 25 V.

Tinción de Ponceau de la membrana.

El Ponceau es un colorante que tiñe las proteínas de manera reversible. Esta tinción permite ver si el ADN se ha separado correctamente y si las proteínas se han transferido a la membrana.

Colocar la membrana en una bandeja y añadir el colorante (*Ponceau*).

Dejar en agitación durante 5 min.

Lavar con agua destilada hasta que se vean las bandas de proteína.

Solución: 0.5 g de colorante *Ponceau*, 1 mL ácido acético y hasta 100 mL agua destilada.

Inmunodetección

Lavar la membrana con TBS durante 5 min.

Materiales y métodos

Bloquear la membrana con solución de bloqueo al 10% 1 hora a temperatura ambiente o 12 horas a 4°C en agitación.

Incubar el anticuerpo primario diluído en solución de bloqueo al 5% 12 horas a 4°C y en agitación.

Lavados con TBST:

3 lavados rápidos enjuagando la membrana con TBST.

1 lavado de 10 min.

1 lavado de 5 min.

Incubación del anticuerpo secundario diluido en Solución de bloqueo al 5% 1 hora a temperatura ambiente en agitación.

Lavados con TBST:

3 lavados rápidos enjuagando la membrana con TBST.

1 lavado de 10 min.

1 lavado de 5 min.

Lavar con TBS 5 min o hasta que se haga la detección.

TBS 10X

30.2 gr. Tris base.

43.8 gr. NaCl.

Ajustar pH entre 7.5-7.9 con HCl.

Hasta 500 mL de agua destilada.

Autoclavar.

TBST

500 mL TBS 1X

0.1% Tween-20 (500 µl)

10% Solución de bloqueo

para 50mL:

5 gr. NFDm (leche en polvo desnatada)

TBST hasta 50 mL.

Detección.

La detección se realizó mediante el kit ECL de Pierce (*Super signal best pico chemiluminescent substrate*) siguiendo las instrucciones facilitadas por el fabricante.

6.6 Ensayo de EMSA (*electrophoretic Mobility Shift Assay*)

El ensayo de EMSA consiste en la detección de la unión específica de una o varias proteínas a una secuencia de ADN concreta. Las proteínas se obtienen a partir de extractos nucleares y la unión ADN-proteína es detectada gracias a una sonda marcada radioactivamente por ^{32}P .

6.6.1 Preparación de extractos nucleares

Los extractos nucleares se preparan a partir de células HEK293 infectadas o no infectadas por adenovirus (control) en una placa de 15 cm al 75-80% de confluencia. Preparar 100 mL de PBS con PMSF (phenylmethanesulphonylfluoride) (250 mM) enfriado en hielo. Se recolectan las células y se le añaden 2.5 mL de PBS-PMSF. Centrifugar a 2000 rpm, 10 min a 4°C. Aspirar el sobrenadante y resuspender en 7.5 mL de PBS/PMSF. Repetir la centrifugación y estimar el volumen del precipitado celular (PC) recolectado. El precipitado se resuspende en 4 volúmenes de PC de tampón A con inhibidores de proteasas. Incubar en hielo durante 1 hora y transferir el concentrado a un macerador de vidrio. Macerar la muestra 20 veces. Transferir el contenido a un nuevo tubo y centrifugar la muestra a 2700 rpm 5 min a 4°C. Eliminar el sobrenadante y resuspender el precipitado en 1 mL de tampón A. Volver a centrifugar y eliminar nuevamente el sobrenadante. Resuspender el precipitado en 3 volúmenes de PC de tampón B y transferir a un nuevo tubo de microcentrifuga. Incubar en hielo durante 30-60 min. Centrifugar el precipitado durante 30' a 14000 rpm, 4°C. Transferir el sobrenadante a un criotubo donde se guardarán los extractos a -80°C.

Materiales y métodos

Tampón A

10 mM HEPES (pH=7.5)
10 mM KCl
1.5 mM MgCl₂
Agua milliQ.

Para 1 mL, añadir:

5 µl DTT 1M.
2 µl PMSF 250 mM
1 µl aprotinina (10 mg/mL), 1 µl leupeptina (1000X), 1 µl pepstatina (1000X).
4 µl Benzamidina (250 mM), 4 µl NaF (1M), 4 µl NaV (1M).

Tampón B

20 mM HEPES (pH=7.5).
20% Glicerol.
450 mM NaCl.
1.5 mM MgCl₂.
0.2 mM EDTA
Agua milliQ.

Para 1.5 mL, añadir:

7.5 µl DTT (1M)
3 µl PMSF (250 mM)
1.5 µl aprotinina (10 mg/mL), 1.5 µl leupeptina (1000X), 1.5 µl pepstatina (1000X).
6 µl Benzamidina (250 mM), 6 µl NaF (1M), 6 µl NaV (1M).

Los extractos nucleares se cuantificaron por el método de BCA (*Bicinchoninic Acid*) siguiendo el protocolo facilitado por el fabricante (#23227 BCATM Protein Assay Kit de PIERCE).

6.6.2 Preparación del gel y de la muestra.

El **gel de carga** se preparó con el siguiente protocolo:

Agua destilada 38.8 mL

2.5 mL TBE pH=8.3 (10X)
5.6 mL acrilamida (40%)
2.8 mL bis-acrilamida (2%)
300 µl APS (10%)

El gel se desgasifica al vacío y se le añade TEMED (40 µl). Mezclar y depositar el gel en un soporte de geles. Dejar solidificar. El soporte de geles se prepara, de forma casera, separando dos cristales con una cinta de silicona y dejando una separación de pocos milímetros entre ambos. Para que queden sujetos ambos cristales con la goma de silicona se ajustan con clips.

TBE (pH=8.3)

60.6 gr Tris Base
30.9 gr. Ácido Bórico
3.4 gr. Na₂EDTA.

Se disuelve en 800 mL de agua milliQ y se ajusta el pH a 8.3 si se requiere. Añadir agua milliQ hasta 1 L. Autoclavar.

Preparación de las muestras

2.6 µl 5X tampón de unión (IVa2 o normal)*.
2 µl competidor del ADN (ADN de esperma de Salmón o dIdC)
5.9 µl agua milliQ.
1.5 µl del extracto nuclear.
1 µl sonda marcada.

*Este tampón varía en función de las condiciones de unión entre ADN y proteínas. El tampón para IVa2 se ha descrito en la bibliografía [54].

Es recomendable empezar con el siguiente tampón de unión:

Tampón de unión 5X

Hepes 20 mM
NaCl 50 mM
MgCl₂ 5 mM
DTT 1mM
10% glicerol

La muestra se incuba en hielo durante 30 min exactos para permitir la unión entre el extracto y la sonda marcada. Justo el tiempo que necesita el gel para

Materiales y métodos

ser pre-corrído (30 min) a 4°C. Una vez pre-corrído se preparan las muestras añadiendo 1.5 µl de tampón de carga (TBE 0.5X con colorante) y se cargan en el gel. Se corren las muestras, a bajo voltaje, durante 90 min a 4°C.

5X tampón de unión

50 mM HEPES (pH=7.9).

100 mM KCl.

15 mM MgCl₂.

50 mM EDTA.

12% glicerol.

Disolver los primeros componentes y añadir:

1500 µg/mL BSA.

5mM DTT.

6.6.3 Preparación de la sonda

La sonda se ha preparado según el método de “*random primer*” con ³²P descrito por Feinberg y Bogelstein [287].

6.6.3.1 Unión/Hibridación de oligonucleótidos

Los oligonucleótidos se hibridaron utilizando 5 µg de cada uno en un volumen final de 200 µl (Tris pH=8.0 50 mM, NaCl 0.1 M y MgCl₂ 5 mM). Calentar la muestra hasta 98°C y dejar enfriar lentamente hasta temperatura ambiente.

6.6.4. Detección de la sonda

La detección del ³²P se realizó mediante un casete sensible a la radiación durante toda la noche y posteriormente detectado mediante revelador y software específico (phosphorImager (ABI Storm 680), ImageQuant software),

6.7 Microscopía electrónica de partículas adenovirales

La microscopía electrónica fue realizada por el servicio de microscopía electrónica del edificio *Lab Sciences* de la universidad Stony Brook, Nueva York. El servicio empleó el método de tinción con Acetato de Uranil.

6.8 Determinación de la densidad de las partículas virales purificadas

La determinación de la densidad de las partículas virales fue determinada por refractometría de luz visible. También es posible realizar la medida mediante el peso de la muestra y del volumen de la muestra para calcular su densidad (densidad = masa en g/volumen).

6.9 Ensayo de la entrada de ADN al núcleo celular

El ensayo de la entrada de ADN al núcleo se llevó a cabo mediante la infección de células HEK293 al 80% de confluencia (placa de 15 cm). A las 6 horas se lavan las células con PBS (1X) y se recolectan. Se realiza una extracción del ADN intracelular siguiendo el protocolo del punto 6.4.2. y se lleva a cabo un Southern Blot siguiendo el protocolo del punto 6.5.3.

7. Generación de nuevas líneas celulares con las recombinasas Cre y Φ C31

Las líneas celulares utilizadas en este trabajo han sido modificadas para la incorporación de genes de recombinasas mediante el uso de antibióticos selectivos.

7.1 Generación de las líneas celulares HEK-293Cre/FC31 y N52.E6Cre/FC31

La generación de las líneas HEK-293Cre/FC31 y N52.E6Cre/FC31 se llevó a cabo en colaboración con el grupo del Dr. Rubén Hernández, del centro CIMA Navarra, a partir de las líneas celulares HEK293Cre y N52.E6Cre, las cuales contenían la recombinasa Cre. Se transfectó el plásmido pZeo-FC31 con resistencia a Zeozina en los clones HEK-293Cre y N52.E6Cre. Tras varios pasos de amplificación con selección a Zeozina, se aislaron los clones resistentes y se analizó la actividad de la recombinasa Φ C31 por RT-PCR.

7.2 Análisis de la actividad de las recombinasas Cre y Φ C31

La actividad de las recombinasas Cre y Φ C31 se analizó mediante la producción de partículas víricas que contenían en su genoma las secuencias de recombinación flanqueando su señal de empaquetamiento. De esta manera, al saltar dicha señal, el genoma no se empaqueta y disminuye su producción respecto un adenovirus control. Para ello, se infectaron células HEK-293Cre/FC31 y N52.E6Cre/FC31 al 80% de confluencia en placas de 6 pozos con diferentes vectores adenovirales (n=3). El lisado crudo se recolectó a las 36 y 56 horas. Se realizaron 3 ciclos de congelaciones/descongelaciones para liberar las partículas virales y se realizó una titulación siguiendo el protocolo descrito en el punto 5.3.

7.3 Análisis de la actividad de escisión de la señal de empaquetamiento de los diferentes Ad *helper* en líneas restrictivas con Cre y Φ C31

Para determinar específicamente la actividad de escisión de las recombinasas Cre y Φ C31 se analizó el número de copias del genoma adenoviral que habían perdido la señal de empaquetamiento con respecto el número de copias del genoma adenoviral completo. Para ello, se infectaron células HEK-293, HEK-293Cre, HEK-293Cre/FC31 y N52.E6Cre/FC31 al 80% de confluencia con vectores adenovirales controles y con adenovirus *helper* que llevaban secuencias de recombinación flanqueando su señal de empaquetamiento durante 48 horas. Se recogió el lisado crudo y se aplicaron 3 ciclos de congelaciones/descongelaciones para liberar las partículas virales. Se utilizaron 2 mL del lisado crudo para realizar una extracción de ADN siguiendo el protocolo descrito en el punto 6.4.1. y se utilizó la técnica de Southern Blot para separar y visualizar las bandas de interés tal y como se detalla en el punto 6.4.3. La sonda utilizada se extrajo mediante la digestión del plásmido pTG-6600 con los enzimas *BsiW* I y *Spe* I y aislando la banda de 181 pares de bases.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Venter, J.C., et al., *The sequence of the human genome*, in *Science*. 2001. p. 1304-51.
2. Lander, E.S., et al., *Initial sequencing and analysis of the human genome*. *Nature*, 2001. **409**(6822): p. 860-921.
3. Brody, S.L. and R.G. Crystal, *Adenovirus-mediated in vivo gene transfer*. *Ann N Y Acad Sci*, 1994. **716**: p. 90-101; discussion 101-3.
4. O'Neal, W.K. and A.L. Beaudet, *Somatic gene therapy for cystic fibrosis*. *Hum Mol Genet*, 1994. **3 Spec No**: p. 1497-502.
5. Ali, M., N.R. Lemoine, and C.J. Ring, *The use of DNA viruses as vectors for gene therapy*. *Gene Ther*, 1994. **1**(6): p. 367-84.
6. Mitani, K., et al., *Gene transfer therapy for heritable disease: cell and expression targeting*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 1993. **339**(1288): p. 217-24.
7. Alemany, R., *Cancer selective adenoviruses*. *Mol Aspects Med*, 2007.
8. Roberts, D.M., et al., *Hexon-chimaeric adenovirus serotype 5 vectors circumvent pre-existing anti-vector immunity*. *Nature*, 2006. **441**(7090): p. 239-43.
9. Mir, L.M., et al., *Electric pulse-mediated gene delivery to various animal tissues*. *Adv Genet*, 2005. **54**: p. 83-114.
10. Porteus, M.H., J.P. Connelly, and S.M. Pruetz, *A look to future directions in gene therapy research for monogenic diseases*. *PLoS Genet*, 2006. **2**(9): p. e133.
11. Cavazzana-Calvo, M., et al., *Gene therapy for severe combined immunodeficiency*. *Annu Rev Med*, 2005. **56**: p. 585-602.
12. Hacein-Bey-Abina, S., et al., *Sustained correction of X-linked severe combined immunodeficiency by ex vivo gene therapy*. *N Engl J Med*, 2002. **346**(16): p. 1185-93.
13. Cavazzana-Calvo, M., et al., *Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease*. *Science*, 2000. **288**(5466): p. 669-72.
14. *The ADA human gene therapy clinical protocol*. *Hum Gene Ther*, 1990. **1**(3): p. 327-62.
15. Anderson, W.F., R.M. Blaese, and K. Culver, *The ADA human gene therapy clinical protocol: Points to Consider response with clinical protocol, July 6, 1990*. *Hum Gene Ther*, 1990. **1**(3): p. 331-62.
16. Raper, S.E., et al., *A pilot study of in vivo liver-directed gene transfer with an adenoviral vector in partial ornithine transcarbamylase deficiency*. *Hum Gene Ther*, 2002. **13**(1): p. 163-75.
17. Manno, C.S., et al., *AAV-mediated factor IX gene transfer to skeletal muscle in patients with severe hemophilia B*. *Blood*, 2003. **101**(8): p. 2963-72.
18. Kay, M.A., et al., *Evidence for gene transfer and expression of factor IX in haemophilia B patients treated with an AAV vector*. *Nat Genet*, 2000. **24**(3): p. 257-61.
19. Manno, C.S., et al., *Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response*. *Nat Med*, 2006. **12**(3): p. 342-7.
20. Khuri, F.R., et al., *a controlled trial of intratumoral ONYX-015, a selectively-replicating adenovirus, in combination with cisplatin and 5-*

VIII. Bibliografía

- fluorouracil in patients with recurrent head and neck cancer.* Nat Med, 2000. **6**(8): p. 879-85.
21. Vecil, G.G. and F.F. Lang, *Clinical trials of adenoviruses in brain tumors: a review of Ad-p53 and oncolytic adenoviruses.* J Neurooncol, 2003. **65**(3): p. 237-46.
22. Habib, N.A., et al., *E1B-deleted adenovirus (dl1520) gene therapy for patients with primary and secondary liver tumors.* Hum Gene Ther, 2001. **12**(3): p. 219-26.
23. Hacein-Bey-Abina, S., et al., *LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1.* Science, 2003. **302**(5644): p. 415-9.
24. Raper, S.E., et al., *Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer.* Mol Genet Metab, 2003. **80**(1-2): p. 148-58.
25. Ariga, T., et al., *T-cell lines from 2 patients with adenosine deaminase (ADA) deficiency showed the restoration of ADA activity resulted from the reversion of an inherited mutation.* Blood, 2001. **97**(9): p. 2896-9.
26. Raper, S.E., et al., *Developing adenoviral-mediated in vivo gene therapy for ornithine transcarbamylase deficiency.* J Inherit Metab Dis, 1998. **21 Suppl 1**: p. 119-37.
27. Bischoff, J.R., et al., *An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells.* Science, 1996. **274**(5286): p. 373-6.
28. Barker, D.D. and A.J. Berk, *Adenovirus proteins from both E1B reading frames are required for transformation of rodent cells by viral infection and DNA transfection.* Virology, 1987. **156**(1): p. 107-21.
29. Peng, Z., *Current status of gendicine in China: recombinant human Ad-p53 agent for treatment of cancers.* Hum Gene Ther, 2005. **16**(9): p. 1016-27.
30. Groth, A.C., et al., *A phage integrase directs efficient site-specific integration in human cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(11): p. 5995-6000.
31. Ortiz-Urda, S., et al., *Stable nonviral genetic correction of inherited human skin disease.* Nat Med, 2002. **8**(10): p. 1166-70.
32. Thyagarajan, B., et al., *Site-specific genomic integration in mammalian cells mediated by phage phiC31 integrase.* Mol Cell Biol, 2001. **21**(12): p. 3926-34.
33. Thorpe, H.M. and M.C. Smith, *In vitro site-specific integration of bacteriophage DNA catalyzed by a recombinase of the resolvase/invertase family.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(10): p. 5505-10.
34. Hackett, P.B., et al., *Sleeping beauty transposon-mediated gene therapy for prolonged expression.* Adv Genet, 2005. **54**: p. 189-232.
35. Dupuy, A.J., N.A. Jenkins, and N.G. Copeland, *Sleeping beauty: a novel cancer gene discovery tool.* Hum Mol Genet, 2006. **15 Spec No 1**: p. R75-9.
36. Russell, D.W. and R.K. Hirata, *Human gene targeting by viral vectors.* Nat Genet, 1998. **18**(4): p. 325-30.
37. Kaiser, J., *Gene therapy. Putting the fingers on gene repair.* Science, 2005. **310**(5756): p. 1894-6.

38. Rowe, W.P., et al., *Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture*. Proc Soc Exp Biol Med, 1953. **84**(3): p. 570-3.
39. Enders, J.F., et al., *Adenoviruses: group name proposed for new respiratory-tract viruses*. Science, 1956. **124**(3212): p. 119-20.
40. Horwitz, M.S., *Adenoviruses*, in *Virology*. 1990, B. N. Fields, D. M. Knipe et al. Raven Press Ltd.: New York. p. 1723-1740.
41. Breslow, L., *Epidemic of Acute Respiratory Disease Associated with Atypical Pneumonia*. J Clin Invest, 1945. **24**(6): p. 775-9.
42. Chen, H.L., et al., *Respiratory adenoviral infections in children: a study of hospitalized cases in southern Taiwan in 2001--2002*. J Trop Pediatr, 2004. **50**(5): p. 279-84.
43. Shenk, T., *Adenoviridae : The viruses and their replication*. Vol. II. 1996, Lippincott-Raven, Philadelphia: Fields NB, Knipe DM, Howely PM. 2111-2148.
44. Russell, W.C., *Update on adenovirus and its vectors*. J Gen Virol, 2000. **81**(Pt 11): p. 2573-604.
45. Horwitz, M., *Adenoviridae and their replication*. Virology. 1990. 1679-1720.
46. Fabry, C.M., et al., *A quasi-atomic model of human adenovirus type 5 capsid*. Embo J, 2005. **24**(9): p. 1645-54.
47. Li, Q.G. and G. Wadell, *Comparison of 17 genome types of adenovirus type 3 identified among strains recovered from six continents*. J Clin Microbiol, 1988. **26**(5): p. 1009-15.
48. Ginsberg, H.S., et al., *A proposed terminology for the adenovirus antigens and virion morphological subunits*. Virology, 1966. **28**(4): p. 782-3.
49. Rux, J.J. and R.M. Burnett, *Adenovirus structure*. Hum Gene Ther, 2004. **15**(12): p. 1167-76.
50. Green, N.M., et al., *Evidence for a repeating cross-beta sheet structure in the adenovirus fibre*. Embo J, 1983. **2**(8): p. 1357-65.
51. Vellinga, J., S. Van der Heijdt, and R.C. Hoeben, *The adenovirus capsid: major progress in minor proteins*. J Gen Virol, 2005. **86**(Pt 6): p. 1581-8.
52. van Oostrum, J. and R.M. Burnett, *Molecular composition of the adenovirus type 2 virion*. J Virol, 1985. **56**(2): p. 439-48.
53. Anderson, C.W., *The proteinase polypeptide of adenovirus serotype 2 virions*. Virology, 1990. **177**(1): p. 259-72.
54. Zhang, W. and M.J. Imperiale, *Interaction of the adenovirus IVa2 protein with viral packaging sequences*. J Virol, 2000. **74**(6): p. 2687-93.
55. Ostapchuk, P. and P. Hearing, *Control of adenovirus packaging*. J Cell Biochem, 2005. **96**(1): p. 25-35.
56. Persson, H. and L. Philipson, *Regulation of adenovirus gene expression*. Curr Top Microbiol Immunol, 1982. **97**: p. 157-203.
57. Akusjarvi, G., et al., *The gene for the adenovirus 2 hexon polypeptide*. J Biol Chem, 1984. **259**(22): p. 13976-9.
58. Shinagawa, M., et al., *Phylogenetic relationships between adenoviruses as inferred from nucleotide sequences of inverted terminal repeats*. Gene, 1987. **55**(1): p. 85-93.
59. Van der Vliet, P.C., *Adenovirus DNA replication*. Curr Top Microbiol Immunol, 1995. **199** (Pt 2): p. 1-30.

VIII. Bibliografía

60. Kidd, A.H., D. Garwicz, and M. Oberg, *Human and simian adenoviruses: phylogenetic inferences from analysis of VA RNA genes*. *Virology*, 1995. **207**(1): p. 32-45.
61. Mathews, M.B. and T. Shenk, *Adenovirus virus-associated RNA and translation control*. *J Virol*, 1991. **65**(11): p. 5657-62.
62. Tomko, R.P., R. Xu, and L. Philipson, *HCAR and MCAR: the human and mouse cellular receptors for subgroup C adenoviruses and group B coxsackieviruses*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(7): p. 3352-6.
63. Bergelson, J.M., et al., *Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5*. *Science*, 1997. **275**(5304): p. 1320-3.
64. Howitt, J., C.W. Anderson, and P. Freimuth, *Adenovirus interaction with its cellular receptor CAR*. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2003. **272**: p. 331-64.
65. Honda, T., et al., *The coxsackievirus-adenovirus receptor protein as a cell adhesion molecule in the developing mouse brain*. *Brain Res Mol Brain Res*, 2000. **77**(1): p. 19-28.
66. Walters, R.W., et al., *Adenovirus fiber disrupts CAR-mediated intercellular adhesion allowing virus escape*. *Cell*, 2002. **110**(6): p. 789-99.
67. Zhang, Y. and J.M. Bergelson, *Adenovirus receptors*. *J Virol*, 2005. **79**(19): p. 12125-31.
68. Wickham, T.J., et al., *Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 promote adenovirus internalization but not virus attachment*. *Cell*, 1993. **73**(2): p. 309-19.
69. Rentsendorj, A., et al., *Typical and atypical trafficking pathways of Ad5 penton base recombinant protein: implications for gene transfer*. *Gene Ther*, 2006. **13**(10): p. 821-36.
70. Li, E., et al., *Adenovirus endocytosis via alpha(v) integrins requires phosphoinositide-3-OH kinase*. *J Virol*, 1998. **72**(3): p. 2055-61.
71. Li, E., et al., *Association of p130CAS with phosphatidylinositol-3-OH kinase mediates adenovirus cell entry*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(19): p. 14729-35.
72. Stewart, P.L., et al., *Cryo-EM visualization of an exposed RGD epitope on adenovirus that escapes antibody neutralization*. *Embo J*, 1997. **16**(6): p. 1189-98.
73. Meier, O. and U.F. Greber, *Adenovirus endocytosis*. *J Gene Med*, 2004. **6 Suppl 1**: p. S152-63.
74. Seth, P., et al., *Evidence that the penton base of adenovirus is involved in potentiation of toxicity of Pseudomonas exotoxin conjugated to epidermal growth factor*. *Mol Cell Biol*, 1984. **4**(8): p. 1528-33.
75. Seth, P., I. Pastan, and M.C. Willingham, *Adenovirus-dependent changes in cell membrane permeability: role of Na⁺, K⁺-ATPase*. *J Virol*, 1987. **61**(3): p. 883-8.
76. Blumenthal, R., et al., *pH-dependent lysis of liposomes by adenovirus*. *Biochemistry*, 1986. **25**(8): p. 2231-7.
77. Kelkar, S.A., et al., *Cytoplasmic dynein mediates adenovirus binding to microtubules*. *J Virol*, 2004. **78**(18): p. 10122-32.
78. Suomalainen, M., et al., *Microtubule-dependent plus- and minus end-directed motilities are competing processes for nuclear targeting of adenovirus*. *J Cell Biol*, 1999. **144**(4): p. 657-72.

79. Chardonnet, Y. and S. Dales, *Early events in the interaction of adenoviruses with HeLa cells. I. Penetration of type 5 and intracellular release of the DNA genome.* Virology, 1970. **40**(3): p. 462-77.
80. Wang, K., et al., *Regulation of adenovirus membrane penetration by the cytoplasmic tail of integrin beta5.* J Virol, 2000. **74**(6): p. 2731-9.
81. Trotman, L.C., et al., *Import of adenovirus DNA involves the nuclear pore complex receptor CAN/Nup214 and histone H1.* Nat Cell Biol, 2001. **3**(12): p. 1092-100.
82. Akusjarvi, G., *Proteins with transcription regulatory properties encoded by human adenoviruses.* Trends Microbiol, 1993. **1**(5): p. 163-70.
83. Martin, M.E. and A.J. Berk, *Adenovirus E1B 55K represses p53 activation in vitro.* J Virol, 1998. **72**(4): p. 3146-54.
84. Swaminathan, S. and B. Thimmapaya, *Regulation of adenovirus E2 transcription unit.* Curr Top Microbiol Immunol, 1995. **199 (Pt 3)**: p. 177-94.
85. Wold, W.S., A.E. Tollefson, and T.W. Hermiston, *E3 transcription unit of adenovirus.* Curr Top Microbiol Immunol, 1995. **199 (Pt 1)**: p. 237-74.
86. Horwitz, M.S., *Function of adenovirus E3 proteins and their interactions with immunoregulatory cell proteins.* J Gene Med, 2004. **6 Suppl 1**: p. S172-83.
87. Tollefson, A.E., et al., *The adenovirus death protein (E3-11.6K) is required at very late stages of infection for efficient cell lysis and release of adenovirus from infected cells.* J Virol, 1996. **70**(4): p. 2296-306.
88. Tollefson, A.E., et al., *The E3-11.6-kDa adenovirus death protein (ADP) is required for efficient cell death: characterization of cells infected with adp mutants.* Virology, 1996. **220**(1): p. 152-62.
89. Tollefson, A.E., et al., *The 11,600-MW protein encoded by region E3 of adenovirus is expressed early but is greatly amplified at late stages of infection.* J Virol, 1992. **66**(6): p. 3633-42.
90. Evans, J.D. and P. Hearing, *Relocalization of the Mre11-Rad50-Nbs1 complex by the adenovirus E4 ORF3 protein is required for viral replication.* J Virol, 2005. **79**(10): p. 6207-15.
91. Kanopka, A., et al., *Regulation of adenovirus alternative RNA splicing by dephosphorylation of SR proteins.* Nature, 1998. **393**(6681): p. 185-7.
92. Nordqvist, K., K. Ohman, and G. Akusjarvi, *Human adenovirus encodes two proteins which have opposite effects on accumulation of alternatively spliced mRNAs.* Mol Cell Biol, 1994. **14**(1): p. 437-45.
93. Nordqvist, K. and G. Akusjarvi, *Adenovirus early region 4 stimulates mRNA accumulation via 5' introns.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(24): p. 9543-7.
94. Evans, J.D. and P. Hearing, *Distinct roles of the Adenovirus E4 ORF3 protein in viral DNA replication and inhibition of genome concatenation.* J Virol, 2003. **77**(9): p. 5295-304.
95. Dobner, T., et al., *Blockage by adenovirus E4orf6 of transcriptional activation by the p53 tumor suppressor.* Science, 1996. **272**(5267): p. 1470-3.
96. Huang, M.M. and P. Hearing, *Adenovirus early region 4 encodes two gene products with redundant effects in lytic infection.* J Virol, 1989. **63**(6): p. 2605-15.

VIII. Bibliografía

97. de Jong, R.N., L.A. Meijer, and P.C. van der Vliet, *DNA binding properties of the adenovirus DNA replication priming protein pTP*. *Nucleic Acids Res*, 2003. **31**(12): p. 3274-86.
98. Lindenbaum, J.O., J. Field, and J. Hurwitz, *The adenovirus DNA binding protein and adenovirus DNA polymerase interact to catalyze elongation of primed DNA templates*. *J Biol Chem*, 1986. **261**(22): p. 10218-27.
99. Dekker, J., et al., *Multimerization of the adenovirus DNA-binding protein is the driving force for ATP-independent DNA unwinding during strand displacement synthesis*. *Embo J*, 1997. **16**(6): p. 1455-63.
100. Hay, R.T., et al., *Molecular interactions during adenovirus DNA replication*. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1995. **199 (Pt 2)**: p. 31-48.
101. de Jong, R.N. and P.C. van der Vliet, *Mechanism of DNA replication in eukaryotic cells: cellular host factors stimulating adenovirus DNA replication*. *Gene*, 1999. **236**(1): p. 1-12.
102. Shaw, A.R. and E.B. Ziff, *Transcripts from the adenovirus-2 major late promoter yield a single early family of 3' coterminal mRNAs and five late families*. *Cell*, 1980. **22**(3): p. 905-16.
103. Hearing, P., et al., *Identification of a repeated sequence element required for efficient encapsidation of the adenovirus type 5 chromosome*. *J Virol*, 1987. **61**(8): p. 2555-8.
104. Wissen-Siegert, I. and H.J. Welkoborsky, *[Value and status of neurologic, serologic, internal medicine and orthopedic studies in routine diagnosis of sudden deafness]*. *Laryngorhinootologie*, 1990. **69**(3): p. 140-4.
105. Weiss, M.A., et al., *Viral-mediated gene transfer in the cochlea*. *Int J Dev Neurosci*, 1997. **15**(4-5): p. 577-83.
106. Grable, M. and P. Hearing, *Adenovirus type 5 packaging domain is composed of a repeated element that is functionally redundant*. *J Virol*, 1990. **64**(5): p. 2047-56.
107. Schmid, S.I. and P. Hearing, *Bipartite structure and functional independence of adenovirus type 5 packaging elements*. *J Virol*, 1997. **71**(5): p. 3375-84.
108. Maeda, Y., et al., *Cre/loxP-mediated adenovirus type 5 packaging signal excision demonstrates that core element VI is sufficient for virus packaging*. *Virology*, 2003. **309**(2): p. 330-8.
109. Schmid, S.I. and P. Hearing, *Cellular components interact with adenovirus type 5 minimal DNA packaging domains*. *J Virol*, 1998. **72**(8): p. 6339-47.
110. Ostapchuk, P. and P. Hearing, *Regulation of adenovirus packaging*. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2003. **272**: p. 165-85.
111. Erturk, E., et al., *Binding of CCAAT displacement protein CDP to adenovirus packaging sequences*. *J Virol*, 2003. **77**(11): p. 6255-64.
112. Gustin, K.E., P. Lutz, and M.J. Imperiale, *Interaction of the adenovirus L1 52/55-kilodalton protein with the IVa2 gene product during infection*. *J Virol*, 1996. **70**(9): p. 6463-7.
113. Ostapchuk, P., et al., *Functional interaction of the adenovirus IVa2 protein with adenovirus type 5 packaging sequences*. *J Virol*, 2005. **79**(5): p. 2831-8.
114. Perez-Romero, P., K.E. Gustin, and M.J. Imperiale, *Dependence of the encapsidation function of the adenovirus L1 52/55-kilodalton protein on*

- its ability to bind the packaging sequence.* J Virol, 2006. **80**(4): p. 1965-71.
115. Hasson, T.B., et al., *Adenovirus L1 52- and 55-kilodalton proteins are required for assembly of virions.* J Virol, 1989. **63**(9): p. 3612-21.
116. Gustin, K.E. and M.J. Imperiale, *Encapsidation of viral DNA requires the adenovirus L1 52/55-kilodalton protein.* J Virol, 1998. **72**(10): p. 7860-70.
117. Zhang, W., et al., *Role for the adenovirus IVa2 protein in packaging of viral DNA.* J Virol, 2001. **75**(21): p. 10446-54.
118. Ostapchuk, P., et al., *The L4 22-kilodalton protein plays a role in packaging of the adenovirus genome.* J Virol, 2006. **80**(14): p. 6973-81.
119. Perez-Romero, P., et al., *Analysis of the interaction of the adenovirus L1 52/55-kilodalton and IVa2 proteins with the packaging sequence in vivo and in vitro.* J Virol, 2005. **79**(4): p. 2366-74.
120. Zhang, W. and R. Arcos, *Interaction of the adenovirus major core protein precursor, pVII, with the viral DNA packaging machinery.* Virology, 2005. **334**(2): p. 194-202.
121. Weber, J.M., *Adenovirus endopeptidase and its role in virus infection.* Curr Top Microbiol Immunol, 1995. **199 (Pt 1)**: p. 227-35.
122. Anderson, C.W., P.R. Baum, and R.F. Gesteland, *Processing of adenovirus 2-induced proteins.* J Virol, 1973. **12**(2): p. 241-52.
123. Weber, J., *Genetic analysis of adenovirus type 2 III. Temperature sensitivity of processing viral proteins.* J Virol, 1976. **17**(2): p. 462-71.
124. Weber, J.M., *Adenain, the adenovirus endoprotease (a review).* Acta Microbiol Immunol Hung, 2003. **50**(1): p. 95-101.
125. Bhatti, A.R. and J. Weber, *Protease of adenovirus type 2. Subcellular localization.* J Biol Chem, 1979. **254**(24): p. 12265-8.
126. Everitt, E., S.A. Meador, and A.S. Levine, *Synthesis and processing of the precursor to the major core protein of adenovirus type 2.* J Virol, 1977. **21**(1): p. 199-214.
127. Boudin, M.L., et al., *Human adenovirus type 2 protein IIIa. II. Maturation and encapsidation.* Virology, 1980. **101**(1): p. 144-56.
128. Tremblay, M.L., et al., *In vitro cleavage specificity of the adenovirus type 2 proteinase.* Biochim Biophys Acta, 1983. **743**(2): p. 239-45.
129. Mangel, W.F., et al., *Viral DNA and a viral peptide can act as cofactors of adenovirus virion proteinase activity.* Nature, 1993. **361**(6409): p. 274-5.
130. Mangel, W.F., M.L. Baniecki, and W.J. McGrath, *Specific interactions of the adenovirus proteinase with the viral DNA, an 11-amino-acid viral peptide, and the cellular protein actin.* Cell Mol Life Sci, 2003. **60**(11): p. 2347-55.
131. Greber, U.F., *Virus assembly and disassembly: the adenovirus cysteine protease as a trigger factor.* Rev Med Virol, 1998. **8**(4): p. 213-222.
132. Khittoo, G., et al., *Role of the nuclear matrix in adenovirus maturation.* Virus Res, 1986. **4**(4): p. 391-403.
133. Chen, P.H., D.A. Ornelles, and T. Shenk, *The adenovirus L3 23-kilodalton proteinase cleaves the amino-terminal head domain from cytokeratin 18 and disrupts the cytokeratin network of HeLa cells.* J Virol, 1993. **67**(6): p. 3507-14.
134. Zhang, Y. and R.J. Schneider, *Adenovirus inhibition of cell translation facilitates release of virus particles and enhances degradation of the cytokeratin network.* J Virol, 1994. **68**(4): p. 2544-55.

VIII. Bibliografía

135. Tibbetts, C. and C.Z. Giam, *In vitro* association of empty adenovirus capsids with double-stranded DNA. *J Virol*, 1979. **32**(3): p. 995-1005.
136. D'Halluin, J.C., *Virus assembly*. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1995. **199** (Pt 1): p. 47-66.
137. Ishibashi, M. and J.V. Maizel, Jr., *The polypeptides of adenovirus. V. Young virions, structural intermediate between top components and aged virions*. *Virology*, 1974. **57**(2): p. 409-24.
138. Maizel, J.V., Jr., D.O. White, and M.D. Scharff, *The polypeptides of adenovirus. II. Soluble proteins, cores, top components and the structure of the virion*. *Virology*, 1968. **36**(1): p. 126-36.
139. Prage, L., S. Hoglund, and L. Philipson, *Structural proteins of adenoviruses. 8. Characterization of incomplete particles of adenovirus type 3*. *Virology*, 1972. **49**(3): p. 745-57.
140. Cepko, C.L. and P.A. Sharp, *Analysis of Ad5 hexon and 100K ts mutants using conformation-specific monoclonal antibodies*. *Virology*, 1983. **129**(1): p. 137-54.
141. Wodrich, H., et al., *Switch from capsid protein import to adenovirus assembly by cleavage of nuclear transport signals*. *Embo J*, 2003. **22**(23): p. 6245-55.
142. Morin, N. and P. Boulanger, *Morphogenesis of human adenovirus type 2: sequence of entry of proteins into previral and viral particles*. *Virology*, 1984. **136**(1): p. 153-67.
143. D'Halluin, J.C., et al., *Temperature-sensitive mutant of adenovirus type 2 blocked in virion assembly: accumulation of light intermediate particles*. *J Virol*, 1978. **26**(2): p. 344-56.
144. Everitt, E., et al., *Structural proteins of adenoviruses. X. Isolation and topography of low molecular weight antigens from the virion of adenovirus type 2*. *Virology*, 1973. **52**(1): p. 130-47.
145. D'Halluin, J.C., et al., *Adenovirus type 2 assembly analyzed by reversible cross-linking of labile intermediates*. *J Virol*, 1978. **26**(2): p. 357-63.
146. Oberg, B., et al., *Identification of the in vitro translation products of adenovirus mRNA by immunoprecipitation*. *J Virol*, 1975. **15**(1): p. 199-207.
147. Edvardsson, B., et al., *Intermediates in adenovirus assembly*. *J Virol*, 1976. **19**(2): p. 533-47.
148. Hasson, T.B., D.A. Ornelles, and T. Shenk, *Adenovirus L1 52- and 55-kilodalton proteins are present within assembling virions and colocalize with nuclear structures distinct from replication centers*. *J Virol*, 1992. **66**(10): p. 6133-42.
149. Takahashi, E., et al., *Quantitation of adenovirus type 5 empty capsids*. *Anal Biochem*, 2006. **349**(2): p. 208-17.
150. Graham, F.L. and A.J. van der Eb, *A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA*. *Virology*, 1973. **52**(2): p. 456-67.
151. Mizuguchi, H., M.A. Kay, and T. Hayakawa, *Approaches for generating recombinant adenovirus vectors*. *Adv Drug Deliv Rev*, 2001. **52**(3): p. 165-76.
152. Stow, N.D., *Cloning of a DNA fragment from the left-hand terminus of the adenovirus type 2 genome and its use in site-directed mutagenesis*. *J Virol*, 1981. **37**(1): p. 171-80.

153. Bett, A.J., et al., *An efficient and flexible system for construction of adenovirus vectors with insertions or deletions in early regions 1 and 3*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(19): p. 8802-6.
154. He, T.C., et al., *A simplified system for generating recombinant adenoviruses*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(5): p. 2509-14.
155. Chartier, C., et al., *Efficient generation of recombinant adenovirus vectors by homologous recombination in Escherichia coli*. J Virol, 1996. **70**(7): p. 4805-10.
156. Mittereder, N., K.L. March, and B.C. Trapnell, *Evaluation of the concentration and bioactivity of adenovirus vectors for gene therapy*. J Virol, 1996. **70**(11): p. 7498-509.
157. Sweeney, J.A. and J.P. Hennessey, Jr., *Evaluation of accuracy and precision of adenovirus absorptivity at 260 nm under conditions of complete DNA disruption*. Virology, 2002. **295**(2): p. 284-8.
158. Nyberg-Hoffman, C., et al., *Sensitivity and reproducibility in adenoviral infectious titer determination*. Nat Med, 1997. **3**(7): p. 808-11.
159. Croyle, M.A., et al., *Factors that influence stability of recombinant adenoviral preparations for human gene therapy*. Pharm Dev Technol, 1998. **3**(3): p. 373-83.
160. Nyberg-Hoffman, C. and E. Aguilar-Cordova, *Instability of adenoviral vectors during transport and its implication for clinical studies*. Nat Med, 1999. **5**(8): p. 955-7.
161. Croyle, M.A., X. Cheng, and J.M. Wilson, *Development of formulations that enhance physical stability of viral vectors for gene therapy*. Gene Ther, 2001. **8**(17): p. 1281-90.
162. Bett, A.J., L. Prevec, and F.L. Graham, *Packaging capacity and stability of human adenovirus type 5 vectors*. J Virol, 1993. **67**(10): p. 5911-21.
163. Parks, R.J. and F.L. Graham, *A helper-dependent system for adenovirus vector production helps define a lower limit for efficient DNA packaging*. J Virol, 1997. **71**(4): p. 3293-8.
164. Hutchins, B., et al., *Working toward an adenoviral vector testing standard*. Mol Ther, 2000. **2**(6): p. 532-4.
165. Palmer, D.J. and P. Ng, *Physical and infectious titers of helper-dependent adenoviral vectors: a method of direct comparison to the adenovirus reference material*. Mol Ther, 2004. **10**(4): p. 792-8.
166. Volpers, C. and S. Kochanek, *Adenoviral vectors for gene transfer and therapy*. J Gene Med, 2004. **6 Suppl 1**: p. S164-71.
167. Danthinne, X. and M.J. Imperiale, *Production of first generation adenovirus vectors: a review*. Gene Ther, 2000. **7**(20): p. 1707-14.
168. Bruder, J.T., et al., *Expression of gp19K increases the persistence of transgene expression from an adenovirus vector in the mouse lung and liver*. J Virol, 1997. **71**(10): p. 7623-8.
169. Ilan, Y., et al., *Insertion of the adenoviral E3 region into a recombinant viral vector prevents antiviral humoral and cellular immune responses and permits long-term gene expression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(6): p. 2587-92.
170. Graham, F.L., et al., *Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5*. J Gen Virol, 1977. **36**(1): p. 59-74.
171. Lochmuller, H., et al., *Emergence of early region 1-containing replication-competent adenovirus in stocks of replication-defective adenovirus*

VIII. Bibliografía

- recombinants (delta E1 + delta E3) during multiple passages in 293 cells. Hum Gene Ther, 1994. 5(12): p. 1485-91.*
172. Hehir, K.M., et al., *Molecular characterization of replication-competent variants of adenovirus vectors and genome modifications to prevent their occurrence. J Virol, 1996. 70(12): p. 8459-67.*
 173. Fallaux, F.J., et al., *New helper cells and matched early region 1-deleted adenovirus vectors prevent generation of replication-competent adenoviruses. Hum Gene Ther, 1998. 9(13): p. 1909-17.*
 174. Fallaux, F.J., et al., *Characterization of 911: a new helper cell line for the titration and propagation of early region 1-deleted adenoviral vectors. Hum Gene Ther, 1996. 7(2): p. 215-22.*
 175. Schiedner, G., S. Hertel, and S. Kochanek, *Efficient transformation of primary human amniocytes by E1 functions of Ad5: generation of new cell lines for adenoviral vector production. Hum Gene Ther, 2000. 11(15): p. 2105-16.*
 176. Yang, Y., et al., *Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenoviruses for gene therapy. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. 91(10): p. 4407-11.*
 177. Gilgenkrantz, H., et al., *Transient expression of genes transferred in vivo into heart using first-generation adenoviral vectors: role of the immune response. Hum Gene Ther, 1995. 6(10): p. 1265-74.*
 178. Yang, Y., et al., *Cellular and humoral immune responses to viral antigens create barriers to lung-directed gene therapy with recombinant adenoviruses. J Virol, 1995. 69(4): p. 2004-15.*
 179. Dai, Y., et al., *Cellular and humoral immune responses to adenoviral vectors containing factor IX gene: tolerization of factor IX and vector antigens allows for long-term expression. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. 92(5): p. 1401-5.*
 180. Benihoud, K., P. Yeh, and M. Perricaudet, *Adenovirus vectors for gene delivery. Curr Opin Biotechnol, 1999. 10(5): p. 440-7.*
 181. Gao, G.P., Y. Yang, and J.M. Wilson, *Biology of adenovirus vectors with E1 and E4 deletions for liver-directed gene therapy. J Virol, 1996. 70(12): p. 8934-43.*
 182. Alba, R., A. Bosch, and M. Chillon, *Gutless adenovirus: last-generation adenovirus for gene therapy. Gene Ther, 2005. 12 Suppl 1: p. S18-27.*
 183. Gorziglia, M.I., et al., *Elimination of both E1 and E2 from adenovirus vectors further improves prospects for in vivo human gene therapy. J Virol, 1996. 70(6): p. 4173-8.*
 184. Zhou, H., et al., *Development of a complementing cell line and a system for construction of adenovirus vectors with E1 and E2a deleted. J Virol, 1996. 70(10): p. 7030-8.*
 185. Gorziglia, M.I., et al., *Generation of an adenovirus vector lacking E1, e2a, E3, and all of E4 except open reading frame 3. J Virol, 1999. 73(7): p. 6048-55.*
 186. Lusky, M., et al., *In vitro and in vivo biology of recombinant adenovirus vectors with E1, E1/E2A, or E1/E4 deleted. J Virol, 1998. 72(3): p. 2022-32.*
 187. Engelhardt, J.F., et al., *Ablation of E2A in recombinant adenoviruses improves transgene persistence and decreases inflammatory response in mouse liver. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. 91(13): p. 6196-200.*

188. Amalfitano, A., et al., *Production and characterization of improved adenovirus vectors with the E1, E2b, and E3 genes deleted*. J Virol, 1998. **72**(2): p. 926-33.
189. Armentano, D., et al., *Effect of the E4 region on the persistence of transgene expression from adenovirus vectors*. J Virol, 1997. **71**(3): p. 2408-16.
190. Armentano, D., et al., *Characterization of an adenovirus gene transfer vector containing an E4 deletion*. Hum Gene Ther, 1995. **6**(10): p. 1343-53.
191. Wang, Q., et al., *Persistent transgene expression in mouse liver following in vivo gene transfer with a delta E1/delta E4 adenovirus vector*. Gene Ther, 1997. **4**(5): p. 393-400.
192. Andrews, J.L., et al., *Generation and characterization of E1/E2a/E3/E4-deficient adenoviral vectors encoding human factor VIII*. Mol Ther, 2001. **3**(3): p. 329-36.
193. Qian, H.S., et al., *Improved adenoviral vector for vascular gene therapy : beneficial effects on vascular function and inflammation*. Circ Res, 2001. **88**(9): p. 911-7.
194. Amalfitano, A., C.R. Begy, and J.S. Chamberlain, *Improved adenovirus packaging cell lines to support the growth of replication-defective gene-delivery vectors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(8): p. 3352-6.
195. Brough, D.E., et al., *A gene transfer vector-cell line system for complete functional complementation of adenovirus early regions E1 and E4*. J Virol, 1996. **70**(9): p. 6497-501.
196. Wang, Q., X.C. Jia, and M.H. Finer, *A packaging cell line for propagation of recombinant adenovirus vectors containing two lethal gene-region deletions*. Gene Ther, 1995. **2**(10): p. 775-83.
197. Schagen, F.H., et al., *Immune responses against adenoviral vectors and their transgene products: a review of strategies for evasion*. Crit Rev Oncol Hematol, 2004. **50**(1): p. 51-70.
198. Muruve, D.A., et al., *Adenoviral gene therapy leads to rapid induction of multiple chemokines and acute neutrophil-dependent hepatic injury in vivo*. Hum Gene Ther, 1999. **10**(6): p. 965-76.
199. Yang, Y., et al., *Immune responses to viral antigens versus transgene product in the elimination of recombinant adenovirus-infected hepatocytes in vivo*. Gene Ther, 1996. **3**(2): p. 137-44.
200. Kafri, T., et al., *Cellular immune response to adenoviral vector infected cells does not require de novo viral gene expression: implications for gene therapy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(19): p. 11377-82.
201. Morral, N., et al., *Administration of helper-dependent adenoviral vectors and sequential delivery of different vector serotype for long-term liver-directed gene transfer in baboons*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(22): p. 12816-21.
202. Kremer, E.J., et al., *Canine adenovirus vectors: an alternative for adenovirus-mediated gene transfer*. J Virol, 2000. **74**(1): p. 505-12.
203. Muruve, D.A., *The innate immune response to adenovirus vectors*. Hum Gene Ther, 2004. **15**(12): p. 1157-66.
204. Worgall, S., et al., *Innate immune mechanisms dominate elimination of adenoviral vectors following in vivo administration*. Hum Gene Ther, 1997. **8**(1): p. 37-44.

VIII. Bibliografía

205. McCoy, R.D., et al., *Pulmonary inflammation induced by incomplete or inactivated adenoviral particles*. Hum Gene Ther, 1995. **6**(12): p. 1553-60.
206. Schnell, M.A., et al., *Activation of innate immunity in nonhuman primates following intraportal administration of adenoviral vectors*. Mol Ther, 2001. **3**(5 Pt 1): p. 708-22.
207. Zhang, Y., et al., *Acute cytokine response to systemic adenoviral vectors in mice is mediated by dendritic cells and macrophages*. Mol Ther, 2001. **3**(5 Pt 1): p. 697-707.
208. Zsengeller, Z., et al., *Internalization of adenovirus by alveolar macrophages initiates early proinflammatory signaling during acute respiratory tract infection*. J Virol, 2000. **74**(20): p. 9655-67.
209. Girardin, S.E., P.J. Sansonetti, and D.J. Philpott, *Intracellular vs extracellular recognition of pathogens--common concepts in mammals and flies*. Trends Microbiol, 2002. **10**(4): p. 193-9.
210. Tabeta, K., et al., *Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(10): p. 3516-21.
211. Aderem, A. and R.J. Ulevitch, *Toll-like receptors in the induction of the innate immune response*. Nature, 2000. **406**(6797): p. 782-7.
212. Kawai, T. and S. Akira, *Innate immune recognition of viral infection*. Nat Immunol, 2006. **7**(2): p. 131-7.
213. Akira, S. and K. Takeda, *Toll-like receptor signalling*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(7): p. 499-511.
214. Liu, Q., et al., *The role of capsid-endothelial interactions in the innate immune response to adenovirus vectors*. Hum Gene Ther, 2003. **14**(7): p. 627-43.
215. Linsley, P.S., et al., *Binding of the B cell activation antigen B7 to CD28 costimulates T cell proliferation and interleukin 2 mRNA accumulation*. J Exp Med, 1991. **173**(3): p. 721-30.
216. Yang, Y., et al., *Upregulation of class I major histocompatibility complex antigens by interferon gamma is necessary for T-cell-mediated elimination of recombinant adenovirus-infected hepatocytes in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(16): p. 7257-61.
217. Kvist, S., et al., *Molecular association between transplantation antigens and cell surface antigen in adenovirus-transformed cell line*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1978. **75**(11): p. 5674-8.
218. Kaplan, J.M., et al., *Novel role for E4 region genes in protection of adenovirus vectors from lysis by cytotoxic T lymphocytes*. J Virol, 1999. **73**(5): p. 4489-92.
219. Paul, W.E. and R.A. Seder, *Lymphocyte responses and cytokines*. Cell, 1994. **76**(2): p. 241-51.
220. Mack, C.A., et al., *Circumvention of anti-adenovirus neutralizing immunity by administration of an adenoviral vector of an alternate serotype*. Hum Gene Ther, 1997. **8**(1): p. 99-109.
221. Michou, A.I., et al., *Adenovirus-mediated gene transfer: influence of transgene, mouse strain and type of immune response on persistence of transgene expression*. Gene Ther, 1997. **4**(5): p. 473-82.

222. Tripathy, S.K., et al., *Immune responses to transgene-encoded proteins limit the stability of gene expression after injection of replication-defective adenovirus vectors*. Nat Med, 1996. **2**(5): p. 545-50.
223. Glover, C.P., et al., *Long-term transgene expression can be mediated in the brain by adenoviral vectors when powerful neuron-specific promoters are used*. J Gene Med, 2003. **5**(7): p. 554-9.
224. Lee, Y.B., et al., *Increased utility in the CNS of a powerful neuron-specific tetracycline-regulatable adenoviral system developed using a post-transcriptional enhancer*. J Gene Med, 2005. **7**(5): p. 576-83.
225. Mitani, K., et al., *Rescue, propagation, and partial purification of a helper virus-dependent adenovirus vector*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(9): p. 3854-8.
226. Kochanek, S., et al., *A new adenoviral vector: Replacement of all viral coding sequences with 28 kb of DNA independently expressing both full-length dystrophin and beta-galactosidase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(12): p. 5731-6.
227. Fisher, K.J., et al., *Recombinant adenovirus deleted of all viral genes for gene therapy of cystic fibrosis*. Virology, 1996. **217**(1): p. 11-22.
228. Kumar-Singh, R. and J.S. Chamberlain, *Encapsidated adenovirus minichromosomes allow delivery and expression of a 14 kb dystrophin cDNA to muscle cells*. Hum Mol Genet, 1996. **5**(7): p. 913-21.
229. Parks, R.J., et al., *A helper-dependent adenovirus vector system: removal of helper virus by Cre-mediated excision of the viral packaging signal*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(24): p. 13565-70.
230. Alemany, R., et al., *Complementation of helper-dependent adenoviral vectors: size effects and titer fluctuations*. J Virol Methods, 1997. **68**(2): p. 147-59.
231. Hardy, S., et al., *Construction of adenovirus vectors through Cre-lox recombination*. J Virol, 1997. **71**(3): p. 1842-9.
232. Morral, N., et al., *High doses of a helper-dependent adenoviral vector yield supraphysiological levels of alpha1-antitrypsin with negligible toxicity*. Hum Gene Ther, 1998. **9**(18): p. 2709-16.
233. Morsy, M.A., et al., *An adenoviral vector deleted for all viral coding sequences results in enhanced safety and extended expression of a leptin transgene*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(14): p. 7866-71.
234. Schiedner, G., et al., *Genomic DNA transfer with a high-capacity adenovirus vector results in improved in vivo gene expression and decreased toxicity*. Nat Genet, 1998. **18**(2): p. 180-3.
235. Balague, C., et al., *Sustained high-level expression of full-length human factor VIII and restoration of clotting activity in hemophilic mice using a minimal adenovirus vector*. Blood, 2000. **95**(3): p. 820-8.
236. Maione, D., et al., *Prolonged expression and effective readministration of erythropoietin delivered with a fully deleted adenoviral vector*. Hum Gene Ther, 2000. **11**(6): p. 859-68.
237. Maione, D., et al., *An improved helper-dependent adenoviral vector allows persistent gene expression after intramuscular delivery and overcomes preexisting immunity to adenovirus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(11): p. 5986-91.
238. Zou, L., et al., *Helper-dependent adenoviral vector-mediated gene transfer in aged rat brain*. Hum Gene Ther, 2001. **12**(2): p. 181-91.

VIII. Bibliografía

239. Ehrhardt, A. and M.A. Kay, *A new adenoviral helper-dependent vector results in long-term therapeutic levels of human coagulation factor IX at low doses in vivo*. *Blood*, 2002. **99**(11): p. 3923-30.
240. Dudley, R.W., et al., *Sustained improvement of muscle function one year after full-length dystrophin gene transfer into mdx mice by a gutted helper-dependent adenoviral vector*. *Hum Gene Ther*, 2004. **15**(2): p. 145-56.
241. Pastore, L., et al., *Helper-dependent adenoviral vector-mediated long-term expression of human apolipoprotein A-I reduces atherosclerosis in apo E-deficient mice*. *Gene*, 2004. **327**(2): p. 153-60.
242. Nomura, S., et al., *Low-density lipoprotein receptor gene therapy using helper-dependent adenovirus produces long-term protection against atherosclerosis in a mouse model of familial hypercholesterolemia*. *Gene Ther*, 2004. **11**(20): p. 1540-8.
243. Ghosh-Choudhury, G., Y. Haj-Ahmad, and F.L. Graham, *Protein IX, a minor component of the human adenovirus capsid, is essential for the packaging of full length genomes*. *Embo J*, 1987. **6**(6): p. 1733-9.
244. Sandig, V., et al., *Optimization of the helper-dependent adenovirus system for production and potency in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(3): p. 1002-7.
245. Palmer, D. and P. Ng, *Improved system for helper-dependent adenoviral vector production*. *Mol Ther*, 2003. **8**(5): p. 846-52.
246. Sato, M., et al., *Replication and packaging of helper-dependent adenoviral vectors*. *Gene Ther*, 2002. **9**(7): p. 472-6.
247. Soudais, C., N. Skander, and E.J. Kremer, *Long-term in vivo transduction of neurons throughout the rat CNS using novel helper-dependent CAV-2 vectors*. *Faseb J*, 2004. **18**(2): p. 391-3.
248. Gluzman, Y. and K. Van Doren, *Palindromic adenovirus type 5-simian virus 40 hybrid*. *J Virol*, 1983. **45**(1): p. 91-103.
249. Zhang, W.W., et al., *Development and application of a minimal-adenoviral vector system for gene therapy of hemophilia A*. *Thromb Haemost*, 1999. **82**(2): p. 562-71.
250. Ng, P., et al., *Development of a FLP/frt system for generating helper-dependent adenoviral vectors*. *Mol Ther*, 2001. **3**(5 Pt 1): p. 809-15.
251. Umana, P., et al., *Efficient FLPe recombinase enables scalable production of helper-dependent adenoviral vectors with negligible helper-virus contamination*. *Nat Biotechnol*, 2001. **19**(6): p. 582-5.
252. Parks, R.J., *Adenovirus protein IX: a new look at an old protein*. *Mol Ther*, 2005. **11**(1): p. 19-25.
253. Sargent, K.L., et al., *Development of a size-restricted pIX-deleted helper virus for amplification of helper-dependent adenovirus vectors*. *Gene Ther*, 2004. **11**(6): p. 504-11.
254. Kubo, S., et al., *An HSV amplicon-based helper system for helper-dependent adenoviral vectors*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003. **307**(4): p. 826-30.
255. Cheshenko, N., et al., *A novel system for the production of fully deleted adenovirus vectors that does not require helper adenovirus*. *Gene Ther*, 2001. **8**(11): p. 846-54.

256. Catalucci, D., et al., *An adenovirus type 5 (Ad5) amplicon-based packaging cell line for production of high-capacity helper-independent deltaE1-E2-E3-E4 Ad5 vectors*. J Virol, 2005. **79**(10): p. 6400-9.
257. Ehrhardt, A., et al., *Molecular analysis of chromosomal rearrangements in mammalian cells after phiC31-mediated integration*. Hum Gene Ther, 2006. **17**(11): p. 1077-94.
258. Liu, J., et al., *Phi c31 integrase induces chromosomal aberrations in primary human fibroblasts*. Gene Ther, 2006. **13**(15): p. 1188-90.
259. Scilimenti, C.R., B. Thyagarajan, and M.P. Calos, *Directed evolution of a recombinase for improved genomic integration at a native human sequence*. Nucleic Acids Res, 2001. **29**(24): p. 5044-51.
260. Calos, M.P., *The phiC31 integrase system for gene therapy*. Curr Gene Ther, 2006. **6**(6): p. 633-45.
261. Raymond, C.S. and P. Soriano, *High-Efficiency FLP and PhiC31 Site-Specific Recombination in Mammalian Cells*. PLoS ONE, 2007. **2**: p. e162.
262. Andreas, S., et al., *Enhanced efficiency through nuclear localization signal fusion on phage PhiC31-integrase: activity comparison with Cre and FLPe recombinase in mammalian cells*. Nucleic Acids Res, 2002. **30**(11): p. 2299-306.
263. Vilquin, J.T., et al., *FK506 immunosuppression to control the immune reactions triggered by first-generation adenovirus-mediated gene transfer*. Hum Gene Ther, 1995. **6**(11): p. 1391-401.
264. Chen, H.H., et al., *DNA from both high-capacity and first-generation adenoviral vectors remains intact in skeletal muscle*. Hum Gene Ther, 1999. **10**(3): p. 365-73.
265. O'Neal, W.K., et al., *Toxicity associated with repeated administration of first-generation adenovirus vectors does not occur with a helper-dependent vector*. Mol Med, 2000. **6**(3): p. 179-95.
266. Brunetti-Pierri, N., et al., *Acute toxicity after high-dose systemic injection of helper-dependent adenoviral vectors into nonhuman primates*. Hum Gene Ther, 2004. **15**(1): p. 35-46.
267. Croyle, M.A., et al., *PEGylated helper-dependent adenoviral vectors: highly efficient vectors with an enhanced safety profile*. Gene Ther, 2005.
268. Mok, H., et al., *Evaluation of polyethylene glycol modification of first-generation and helper-dependent adenoviral vectors to reduce innate immune responses*. Mol Ther, 2005. **11**(1): p. 66-79.
269. Harui, A., et al., *Vaccination with helper-dependent adenovirus enhances the generation of transgene-specific CTL*. Gene Ther, 2004. **11**(22): p. 1617-26.
270. Mian, A., et al., *Long-term correction of ornithine transcarbamylase deficiency by WPRE-mediated overexpression using a helper-dependent adenovirus*. Mol Ther, 2004. **10**(3): p. 492-9.
271. Gilbert, R., et al., *Improved performance of a fully gutted adenovirus vector containing two full-length dystrophin cDNAs regulated by a strong promoter*. Mol Ther, 2002. **6**(4): p. 501-9.
272. Koehler, D.R., et al., *Protection of Cftr knockout mice from acute lung infection by a helper-dependent adenoviral vector expressing Cftr in airway epithelia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(26): p. 15364-9.

VIII. Bibliografía

273. Bilbao, R., et al., *Comparison of high-capacity and first-generation adenoviral vector gene delivery to murine muscle in utero*. *Gene Ther*, 2005. **12**(1): p. 39-47.
274. Chen, H.H., et al., *Persistence in muscle of an adenoviral vector that lacks all viral genes*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(5): p. 1645-50.
275. Morral, N., et al., *Lethal toxicity, severe endothelial injury, and a threshold effect with high doses of an adenoviral vector in baboons*. *Hum Gene Ther*, 2002. **13**(1): p. 143-54.
276. Mizuguchi, H. and T. Hayakawa, *Targeted adenovirus vectors*. *Hum Gene Ther*, 2004. **15**(11): p. 1034-44.
277. Lyons, M., et al., *Adenovirus type 5 interactions with human blood cells may compromise systemic delivery*. *Mol Ther*, 2006. **14**(1): p. 118-28.
278. Stone, D., et al., *Adenovirus-platelet interaction in blood causes virus sequestration to the reticulo-endothelial system of liver*. *J Virol*, 2007.
279. Shayakhmetov, D.M., et al., *Adenovirus binding to blood factors results in liver cell infection and hepatotoxicity*. *J Virol*, 2005. **79**(12): p. 7478-91.
280. Sakhuja, K., et al., *Optimization of the generation and propagation of gutless adenoviral vectors*. *Hum Gene Ther*, 2003. **14**(3): p. 243-54.
281. Kojima, H., et al., *NeuroD-beta cellulin gene therapy induces islet neogenesis in the liver and reverses diabetes in mice*. *Nat Med*, 2003. **9**(5): p. 596-603.
282. Fiedler, M., et al., *Helper-dependent adenoviral vector-mediated delivery of woodchuck-specific genes for alpha interferon (IFN-alpha) and IFN-gamma: IFN-alpha but not IFN-gamma reduces woodchuck hepatitis virus replication in chronic infection in vivo*. *J Virol*, 2004. **78**(18): p. 10111-21.
283. Kremer, E.J., *CAR chasing: canine adenovirus vectors-all bite and no bark?* *J Gene Med*, 2004. **6 Suppl 1**: p. S139-51.
284. Bulfield, G., et al., *X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1984. **81**(4): p. 1189-92.
285. Gilbert, R., et al., *Prolonged dystrophin expression and functional correction of mdx mouse muscle following gene transfer with a helper-dependent (guttled) adenovirus-encoding murine dystrophin*. *Hum Mol Genet*, 2003. **12**(11): p. 1287-99.
286. Ng, P., et al., *Cre levels limit packaging signal excision efficiency in the Cre/loxP helper-dependent adenoviral vector system*. *J Virol*, 2002. **76**(9): p. 4181-9.
287. Feinberg, A.P. and B. Vogelstein, *A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity*. *Anal Biochem*, 1983. **132**(1): p. 6-13.