



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BARCELONA
FACULTAD DE BIOCENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR
PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

**AUMENTO DE LA POTENCIA ONCOLÍTICA DE LOS ADENOVIRUS
MEDIANTE EL USO DE VIRUS ADENO-ASOCIADOS
Y
GENERACIÓN DE UN ADENOVIRUS ONCOLÍTICO CANINO COMO
TRATAMIENTO PARA LA CLÍNICA VETERINARIA Y MODELO PARA
LA CLÍNICA HUMANA CON ADENOVIRUS**

**Eduardo Laborda Jambrina
MAYO 2013**

**AUMENTO DE LA POTENCIA ONCOLÍTICA DE LOS ADENOVIRUS MEDIANTE
EL USO DE VIRUS ADENO-ASOCIADOS
Y
GENERACIÓN DE UN ADENOVIRUS ONCOLÍTICO CANINO COMO
TRATAMIENTO PARA LA CLÍNICA VETERINARIA Y MODELO PARA LA CLÍNICA
HUMANA CON ADENOVIRUS**

Memoria presentada por

Eduardo Laborda Jambrina

Beneficiario de la beca predoctoral para la formación de profesorado universitario FPU AP2007-01425, concedida por el Ministerio de Educación y Ciencia

Para optar al grado de

Doctor por la Universidad Autònoma de Barcelona

Tesis realizada bajo la direcció del Dr. Ramon Alemany Bonastre, del *Laboratori de Recerca Translacional* del *Institut Català d'Oncologia-IDIBELL* y bajo la tutela de la Dra. Assumpció Bosch Merino, del Centro de Biotecnología Animal y Terapia Génica (CBATEG) de la UAB

El director

El autor

El tutor

Ramon Alemany Bonastre

Eduardo Laborda Jambrina

Assumpció Bosch Merino

Barcelona, Mayo de 2013

Abreviaturas

%	Tanto por ciento
$\Delta 24$	Deleción delta 24, deleción de 24 pares de bases
$\Delta 21$	Deleción delta 21, deleción de 21 pares de bases
Ad	Adenovirus
ADP	En inglés, Adenovirus Death protein (proteína de muerte del Ad)
AFP	α -fetoproteína
AINEs	Antiinflamatorios no esteroideos
ALT	Alanina aminotransferasa
ALKP	Fosfatasa alcalina
AAV	Virus adeno-asociado
ATCC	En inglés, American Type Culture Collection
BSA	En inglés, Bovine Serum Albumin
CAR	En inglés, Coxsackie and Adenovirus Receptor
CAV	En inglés, Adenovirus canino
CDK	Ciclina dependiente de Kinasa
CE	En inglés, Cell Extract (Extracto celular)
CEC	En inglés, Clarified CE (Extracto celular clarificado)
Cel/cell	Célula
CID	Coagulación Intravascular Diseminada
CMV	Citomegalovirus
C-terminal	Carboxi-terminal
ddNTP	Trifosfato de dideoxinucleósido
DMEM	En inglés, Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Di-metil-sulfóxido
DNA	Ácido desoxiribonucleico
dNTP	Trifosfato de deoxinucleótidos
DO	Densidad óptica
DS	Desviación Estándar
ECM	En inglés, Extracellular matrix
EDTA	Ácido etilendiaminotetra acético
FBS	Suero Fetal Bovino
FELASA	En inglés, Federation of European Laboratory Animal Science Associations
g	Fuerza G
gr	Gramos
GFP	En inglés, Green Fluorescent Protein
h	Horas
HA	Ácido Hialurónico
hAd	En inglés, human adenovirus
HDACs	Acetilasa de Histonas
HPV	Virus del Papiloma Humano
HSV	En inglés, Herpes Simplex Virus
Hx	Hexón
IC ₅₀	Concentración inhibitoria 50
ITR	Repetición terminal invertida
it	Intratumoral
iv	Intravenoso
Kb	Kilobase
KDa	Kilodalton
M	Molar
MCT	Mastocitoma
MHC	Complejo de histocompatibilidad principal
MLP	Promotor principal tardío del adenovirus
ml	Mililitro
mg	Milígramo
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
min	Minutos
mm	Milímetro

Abreviaturas

mM	Milimolar
mm ³	Milímetro cúbico
MMP	Metaloproteinasas
m.o.i	En inglés, Multiplicity Of Infection (unidades de traducción por célula)
nAB's	En inglés, Neutralizing antibodies
ng	Nanogramo
nm	Nanometro
nM	Nanomolar
N-terminal	Amino-terminal
°C	Grados centígrados
OC	Osteocalcina
OS	Osteosarcoma
P/S	Penicilina/estreptocitosina
pb	Pares de bases
Pb	Base del pentón
PBS	En inglés, Phosphate Buffered Saline
PBS ⁺⁺	PBS suplementado con Calcio y Magnesio
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEG	Polietilenglicol
Pg	Picogramo
PT	Tiempo de protrombina
PTT	Tiempo de tromboplastina activada
PSA	Antígeno específico de prostata
RB	Retinoblastoma
RECIST	En inglés, Response Evaluation Criteria in Solid Tumors
RGD	Arginina-Glicina-Ácido Aspártico
RNA	Ácido ribonucleico
RT-PCR	PCR a tiempo real
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecilsulfato sódico
SE	Error estándar
Seg	Segundos
SN	Sobrenadante
TAE	Tris-acetato-EDTA
TE	Tris-EDTA
TRIS	En inglés, tri-hidroximetil aminometano
TU	En inglés, transducing unit (unidades de transducción)
vp	Partículas virales
µg	Microgramo
µl	Microlitro

Índice

ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN.....	11
INTRODUCCIÓN	13
1. El cáncer.....	15
1.1. La vía del Retinoblastoma.....	15
2. La viroterapia del cáncer	17
3. Los adenovirus oncolíticos.....	19
3.1. Estructura de los adenovirus	20
3.2. Biología de los adenovirus	21
3.3. Selectividad tumoral de los adenovirus oncolíticos	24
3.3.1. Deleciones de genes virales como estrategia para conferir selectividad por célula tumoral	24
3.3.2. Control de la replicación viral: direccionamiento transcripcional y traduccional	26
3.3.3. Direccionamiento de la infectividad viral: direccionamiento transduccional.....	28
4. Limitaciones en la aplicación de la viroterapia	29
4.1. Llegada del adenovirus al tumor	30
4.2. Dispersión intratumoral de los adenovirus	31
4.3. Potencia oncolítica de los adenovirus.....	33
4.4. Modelos empleados	35
5. Estrategias para mejorar la eficacia terapéutica de los adenovirus	36
5.1. Mejora del control de E1A	36
5.2. Bioselección de adenovirus.....	36
5.3. Adenovirus oncolíticos armados	37
5.4. Combinación con drogas u otras terapias.....	37
5.5. Utilización de modelos más completos.....	38
6. El ICOVIR17	39
7. Los Virus Adeno-asociados	40
8. Introducción Capítulo I	42
9. Introducción Capítulo II	44

OBJETIVOS	47
MATERIAL Y MÉTODOS.....	51
1. Técnicas de manipulación de bacterias.....	53
1.1. Preparación de bacterias competentes.....	53
1.2. Transformación de las bacterias competentes por electroporación	53
1.3. Aislamiento de DNA plasmídico	54
1.3.1. Preparaciones a pequeña escala	54
1.3.2. Preparaciones a gran escala	54
2. Técnicas de manipulación de levaduras.....	54
2.1. Preparación de levaduras competentes.....	55
2.2. Transformación de levaduras por el método LiAc/SS-CARRIER DNA/PEG.....	56
2.3. Aislamiento del DNA plasmídico	56
3. Cultivos celulares.....	57
3.1. Condiciones de cultivo de las líneas celulares.....	59
3.2. Recuento celular	59
3.3. Congelación y descongelación de las líneas celulares.....	59
3.4. Control de micoplasma en las líneas celulares en cultivo.....	60
4. Adenovirus recombinantes	60
4.1. Construcción de los Adenovirus caninos recombinantes.....	60
4.1.1. Construcción del plásmido pCAL-CAV2	62
4.1.2. Construcción del Adenovirus canino CAV2RGD	63
4.1.3. Construcción del Adenovirus canino ICOCaV15 e ICOCaV15noRGD	63
4.1.4. Construcción del Adenovirus canino ICOCaV17	63
4.2. Generación de adenovirus recombinantes por transfección con fosfato cálcico	64
4.3. Selección de clones de adenovirus recombinantes mediante el ensayo de formación de calvas	65
4.4. Amplificación y purificación de los adenovirus	65
4.4.1. Amplificación de adenovirus	66
4.4.2. Purificación de adenovirus	66
5. Técnicas empleadas para titular adenovirus.....	68
5.1. Determinación de las partículas físicas por espectrofotometría (vp/ml)	68

5.2. Determinación de las partículas físicas por PCR a tiempo real (vp/ml).....	68
5.2.1. Preparación de las muestras.....	69
5.2.2. RT-PCR.....	69
5.3. Determinación de las partículas virales funcionales (tu/ml) por tinción del hexón.....	70
6. Técnicas con Virus Adeno-asociados.....	70
6.1. Generación de extractos celulares de AAV2 y AAV6 a pequeña escala	71
6.2. Generación y purificación de AAV6 a gran escala.....	71
6.3. Detección de Virus Adeno-asociados en extractos celulares y purificados de Adenovirus	71
7. Técnicas utilizadas para la caracterización de adenovirus.....	72
7.1. Obtención del DNA viral.....	72
7.1.1. Obtención del DNA de adenovirus a partir del sobrenadante de células infectadas.....	72
7.1.2. Obtención del DNA de adenovirus a partir de células infectadas (Hirt's).....	72
7.1.3. Obtención del DNA de adenovirus a partir de virus purificado.....	73
7.2. Digestión con enzimas de restricción y secuenciación del DNA de adenovirus	73
7.2.1. Digestión con enzimas de restricción	73
7.2.2. Reacción de secuenciación	73
8. Ensayos <i>in vitro</i> con adenovirus recombinantes.....	74
8.1. Ensayos de comparación del tamaño de calvas de los adenovirus humanos coinfectando o no con AAV	74
8.2. Ensayos de infectividad de los adenovirus caninos	74
8.3. Ensayo de producción y liberación viral de los adenovirus	75
8.4. Análisis de la citotoxicidad	75
8.4.1. Recuento celular y cuantificación de los niveles de LDH.....	75
8.4.2. Morfología celular.....	76
8.4.3. Análisis de la proteína total	76
8.4.4. Análisis de la actividad metabólica mitocondrial	77
8.5. Análisis de la expresión de proteínas por Western blot	77
8.5.1. Obtención del extracto proteico.....	77
8.5.2. Titulación del extracto proteico.....	78
8.5.3. SDS-PAGE y transferencia a membrana.....	78

8.5.4. Bloqueo, hibridación y detección de las proteínas.....	78
8.6. Ensayo de actividad hialuronidasa del adenovirus canino ICOCV17	79
8.7. Biodistribución de los adenovirus caninos en sangre de ratón	79
8.8. Biodistribución de los adenovirus caninos en sangre de perro	80
9. Técnicas utilizadas en los ensayos <i>in vivo</i> en ratones con adenovirus recombinantes	80
9.1. Implantación subcutánea de células tumorales en ratones	80
9.2. Administración de virus	81
9.2.1. Inyección intratumoral	81
9.2.2. Inyección sistémica de adenovirus caninos en ratones	81
10. Obtención de muestras y procesamiento	81
10.1. Obtención de muestras de sangre y suero	81
10.2. Obtención de tumores y órganos.....	82
10.3. Inclusión de tejidos en parafina	82
10.4. Inclusión de tejidos en OCT	82
11. Técnicas histológicas	83
11.1. Obtención de cortes histológicos.....	83
11.2. Cortes histológicos parafinados	83
11.3. Inmunohistoquímica en cortes parafinados	83
12. Tratamiento de pacientes caninos con ICOCV17.....	85
12.1. Pacientes	85
12.2. Protocolo con ICOCV17	85
12.3. Monitorización clínica de los perro.....	85
12.4. Obtención de muestras	86
12.4.1. Obtención de orina	86
12.4.2. Obtención de saliva.....	86
12.4.3. Obtención de heces	86
12.4.4. Obtención de sangre	86
12.5. Determinación de las partículas virales por tinción del hexón en orina, saliva y heces.....	86
12.6. Determinación de las partículas virales por PCR a tiempo real en sangre	87
12.7. Ensayo de neutralización de anticuerpos antiadenovirus	87
13. Análisis estadístico	87

Resultados	89
1. Aumento de la potencia oncolítica de los adenovirus mediante el uso de virus adeno- asociados	91
1.1. Cambio de fenotipo del tamaño de calva del adenovirus salvaje (Adwt) y del Adenovirus (Ad) oncolítico ICOVIR15 por coinfección con Virus Adenoasociados (AAV) serotipo 2 y 6	91
1.2. Caracterización de la liberación viral al coinfectar con AAV en tres líneas celulares.....	92
1.3. Caracterización del efecto de diferentes dosis de AAV6 en la eficiencia de liberación de virus en A549	95
1.4. Caracterización del efecto de la coinfección con 1000 partículas virales de AAV6 sobre la expresión de proteínas de ICOVIR15	97
1.5. Efecto de la coinfección con AAV6 sobre la citotoxicidad de ICOVIR15 en A549 en ensayos de una sola ronda de replicación	98
1.6. Efectos de la coinfección con AAV6 sobre la propagación de ICOVIR15	101
1.6.1. Efectos de la coinfección con AAV6 sobre la propagación de ICOVIR15 en dos líneas celulares de tumor humanas infectando con virus desnudo	101
1.6.2. Efecto de la coinfección con AAV6 sobre la propagación de ICOVIR15 en líneas celulares de tumor murino y de hámster infectando con virus desnudo	102
1.6.3. Efecto de la coinfección con AAV6 sobre la propagación de ICOVIR15 en dos líneas celulares mediante el uso de células transportadoras.....	103
1.7. Ensayos <i>in vivo</i>	105
1.7.1. Análisis de la eficacia antitumoral del ICOVIR15 solo o coinyectado con AAV6 en dos modelos de cáncer humanos en ratones inmunodeficientes Balb/c <i>nu/nu</i>	105
1.7.2. Supervivencia de ratones con tumores subcutáneos de A549 ó NP9	106
2. Desarrollo de un adenovirus oncolítico canino como tratamiento para la clínica veterinaria y modelo para la clínica humana con adenovirus	107
2.1. Construcción de los adenovirus caninos oncolíticos.....	108

2.2.	Caracterización <i>in vitro</i> de los Ad oncolíticos caninos	109
2.2.1.	Comparación de la infectividad entre CAV2 y CAV2RGD en 4 líneas tumorales caninas.....	109
2.2.2.	Actividad del promotor canino de E1A modificado mediante cajas E2F y Sp-I y la delección $\Delta 21$	109
2.2.3.	Determinación de la expresión de Hialuronidasa de ICOCAV17	111
2.3.	Análisis de la capacidad citotóxica de los adenovirus caninos.....	111
2.4.	Ensayos en modelos murinos	113
2.4.1.	Biodistribución del Adenovirus canino salvaje CAV2 y el Adenovirus canino CAV2RGD	114
2.4.1.1.	Biodistribución en ratón	114
2.4.1.2.	Biodistribución en sangre de perro	115
2.4.1.3.	Biodistribución en sangre de ratón	116
2.4.2.	Perfil de toxicidad de los adenovirus caninos en ratones	117
2.4.3.	Eficacia antitumoral <i>in vivo</i> de los adenovirus caninos	119
2.4.3.1.	Eficacia antitumoral de los adenovirus caninos en un modelo de melanoma canino por administración intravenosa.....	119
2.4.3.2.	Eficacia antitumoral de los adenovirus caninos en dos modelos tumorales caninos por administración intratumoral	120
2.4.3.3.	Supervivencia de ratones inyectados intratumoralmente	122
2.5.	Determinación de la presencia de Ácido Hialuronico (HA) en tres modelos xenógrafos de tumor canino.....	122
2.6.	Casos clínicos	123
2.6.1.	Caso I.....	124
2.6.2.	Caso II.....	125
2.6.3.	Caso III.....	127
2.6.4.	Caso IV.....	128
2.6.5.	Caso V	129
2.6.6.	Ensayos de control de los pacientes tratados	131
2.6.6.1.	Cuantificación de los títulos de anticuerpos	131
2.6.6.2.	Cuantificación de la carga viral en sangre	131
2.6.6.3.	Detección de partículas virales infectivas en secreciones.....	131

Discusión.....	137
1. Aumento de la potencia oncolítica de los adenovirus mediante el uso de virus adeno- asociados	137
1.1. Fenotipo de calva	139
1.2. Aumento de la liberación.....	140
1.3. Incremento de citotoxicidad	141
1.4. Mecanismo del fenotipo	142
1.5. Incremento de la propagación adenoviral.....	143
1.6. Aumento de la eficacia terapéutica	144
1.7. Aplicaciones potenciales y posibles mejoras.....	144
2. Desarrollo de un adenovirus oncolítico canino como tratamiento para la clínica veterinaria y modelo para la clínica humana con adenovirus	146
2.1. Modificación de la cápside	148
2.2. Modificación del promotor de E1A.....	149
2.3. Inserción de la PH20	150
2.4. Ensayos de potencia oncolítica y toxicidad	151
2.5. Casos clínicos	152
2.6. Visión global y perspectivas	155
Conclusiones.....	157
Bibliografía.....	161

Resumen

El cáncer es una de las principales causas de muerte en la población humana del mundo desarrollado. Los avances en las terapias convencionales, cirugía, quimioterapia, radioterapia, detección y diagnóstico del cáncer han permitido una mejora en los niveles de supervivencia y calidad de vida de los pacientes. Sin embargo, restan multitud de tipos de enfermedades oncológicas donde poco o nada se puede hacer por combatirlos.

La viroterapia con adenovirus emerge como una aproximación esperanzadora para el tratamiento del cáncer. Esta terapia permite minimizar la dosis inicial administrada gracias a la replicación viral en el tumor, amplificando exponencialmente los niveles de virus. Además, los avances en el conocimiento biológico del adenovirus y de las técnicas moleculares, permite conferir selectividad y potencia oncolítica a los adenovirus. Por otra parte, el gran número de vías implicadas en la replicación viral impide la aparición de las clásicas resistencias a los agentes quimioterapéuticos. De todas formas, al alcanzar los ensayos preclínicos *in vivo* y sobretudo las fases clínicas en pacientes humanos, se hacen patentes nuevas limitaciones relacionadas con esta terapia.

Una de estas limitaciones es la falta de potencia oncolítica. Esta falta se debe, en parte, al ciclo viral del adenovirus salvaje, el cual está optimizado para maximizar su producción, limitando la liberación viral al medio inicialmente y disminuyendo la respuesta inmune antiviral. En los tumores existe, sin embargo, un estado de inmunidad deprimida. Además, el aumento y aceleración de la liberación adenoviral se correlaciona con mayor actividad antitumoral.

En el primer capítulo de este trabajo hemos combinado los adenovirus con virus adeno-asociados ya que previamente se ha descrito un aumento de la apoptosis y necrosis celular al darse coinfecciones de ambos virus. Esta combinación ha resultado en un aumento de la liberación adenoviral al medio, aumentando la propagación y la citotoxicidad *in vitro* de los adenovirus y la actividad antitumoral *in vivo* tras la administración intratumoral de ambos virus.

Otra limitación de la viroterapia adenoviral es la falta de modelos adecuados que reflejen fielmente la realidad que los adenovirus oncolíticos se encuentran en pacientes humanos. Los modelos murinos son ampliamente utilizados para los ensayos de toxicidad y eficacia. Sin embargo, son poco o nada permisivos a la replicación viral, disponen de sistemas inmunes comprometidos para permitir la implantación artificial de tumores humanos, que evolucionaran de forma muy diferente a los tumores espontáneos de los pacientes. Esto provoca bajas correlaciones de los índices terapéuticos y, a veces, de los efectos adversos, entre modelos y pacientes.

En el segundo capítulo de este trabajo hemos generado y caracterizado preclínicamente un adenovirus canino oncolítico, ICOCV17, para su uso como agente terapéutico en la clínica veterinaria y como modelo para la viroterapia en clínica humana. Su replicación esta ligada a la vía del Retinoblastoma, incorpora el gen de la hialuronidasa para aumentar su diseminación intratumoral y hemos insertado el motivo RGD en su cápside para aumentar la infectividad de células tumorales. Además, cinco pacientes caninos con diferentes tipos de tumores han sido tratados intratumoralmente. Los resultados obtenidos indican que ICOCV17 parece seguro administrado por vía intratumoral y su actividad antitumoral ha sido comprobada en tres pacientes observando necrosis y reducciones tumorales.

Introducción

1. El cáncer

El cáncer se puede definir como una patología causada por el crecimiento incontrolado de un conjunto de células. Este crecimiento puede provocar la invasión del tejido circundante y producir focos de crecimiento de éstas mismas células en zonas alejadas de la lesión primaria viajando por la circulación sanguínea o linfática. Estos focos o lesiones se denominan metástasis. Ambas características de invasión diferencian un tumor maligno de uno benigno, en el que no se invade tejido adyacente ni se forman nuevos focos de crecimiento tumoral. A nivel mundial el cáncer representa un grave problema, siendo una de las principales causas de muerte en humanos. Se estima que una de cada ocho muertes se debe al cáncer.

Actualmente, el tratamiento del cáncer se realiza mediante técnicas convencionales como la quimioterapia, la radioterapia o la cirugía, todas ellas con claros avances en los últimos tiempos. Nuevas técnicas de diagnóstico precoz y caracterización molecular ayudan también a aumentar el tiempo de supervivencia de los pacientes. Sin embargo, existen ciertos tipos de tumores con baja sensibilidad a los tratamientos convencionales y que junto con los casos de enfermedad diseminada (metastásis), presentan tasas de supervivencia muy bajas, haciendo necesario el desarrollo de nuevas aproximaciones para el tratamiento de esta enfermedad.

Las nuevas aproximaciones deben ir encaminadas a suplir las deficiencias de las convencionales. Un bajo perfil de toxicidad, un mecanismo de acción único que permita actuar sobre las células resistentes a las terapias convencionales y la posibilidad de combinarlas con las terapias ya existentes con el fin de obtener sinergias deberían ser los objetivos principales.

1.1. La vía del Retinoblastoma

Para que una célula normal, se convierta en una célula tumoral, se deben producir varias mutaciones que afecten diferentes funciones celulares. La pérdida de control sobre la

apoptosis, la autosuficiencia en señales de crecimiento, la insensibilidad a señales de detención de crecimiento o la capacidad de angiogénesis y migración son algunas de ellas. Generalmente la desregulación de estas funciones se produce por afectación de diferentes vías o mecanismos, aunque algunos de ellos son esenciales, estando presentes en la mayoría o en todos los casos de desarrollo de esta enfermedad (Hanahan and Weinberg, 2000).

La desregulación de la vía del Retinoblastoma (RB/p16) se ha postulado como un requisito indispensable para la oncogénesis (Hahn and Weinberg, 2002). Las proteínas pRB, p130 y p107 (proteínas de la familia de RB) interaccionan físicamente con muchas proteínas, entre ellas las de los miembros de la familia de los factores de transcripción E2F (en asociación con los miembros de la familia DP), siendo clave para el control de la replicación celular. Los complejos RB-E2F-DP reprimen la transcripción de los promotores controlados por E2F gracias a la acción de las acetilasas de histonas (HDACs) y otros factores que remodelan la cromatina (Black and Azizkhan-Clifford, 1999). Por otro lado, la fosforilación de las proteínas de la familia de RB por parte de las quinasas dependientes de ciclina (CDK), impide su unión a E2F y a las HDACs, liberando E2F y activando la transcripción de los promotores controlados por este factor. A su vez las CDKs se activan por señales mitogénicas y se inhiben por proteínas como p15, p16, p18 ó p19. Esta red de interacciones es lo que se conoce como vía del Retinoblastoma. Así, las formas hipofosforiladas de las proteínas de la familia de RB bloquean la entrada de la célula a la fase de replicación o fase S y viceversa. Entre los genes que controla E2F se encuentra el mismo E2F-1, el cual se encuentra sujeto a un estricto bucle de autorepresión o activación debido a su papel en la apoptosis y replicación del DNA (Johnson and Degregori, 2006). Para que pueda darse este estricto control de la expresión, el promotor de este gen dispone de una estructura única formada por cuatro lugares de unión a E2F organizados en dos palíndromos imperfectos (Neuman et al., 1994 y 1995).

Por tanto la desregulación de la vía de RB a cualquiera de sus niveles es esencial para que la célula entre en un estado de replicación y posterior oncogénesis. Esto la convierte en una óptima diana para el desarrollo de nuevas terapias encaminadas al tratamiento de un amplio abanico de tipos tumorales.

2. La viroterapia del cáncer

La viroterapia se define como el uso de virus para el tratamiento de ciertas patologías, en este caso el cáncer. En el caso de la terapia génica, los virus son utilizados como vectores para la transferencia de material genético, mientras que en el caso de la viroterapia se aprovecha la capacidad lítica del virus, al replicarse en las células, para destruirlas. Los virus utilizados son modificados confiriéndoles selectividad hacia células tumorales y mayor capacidad de destrucción de estas células. Estos virus modificados se denominan virus oncolíticos. Una vez infectan las células tumorales, éstos se replican dando lugar a nueva progenie viral que se libera al medio, infectando nuevas células tumorales. Este ciclo se da múltiples veces, amplificando la dosis viral y eliminando la masa tumoral.

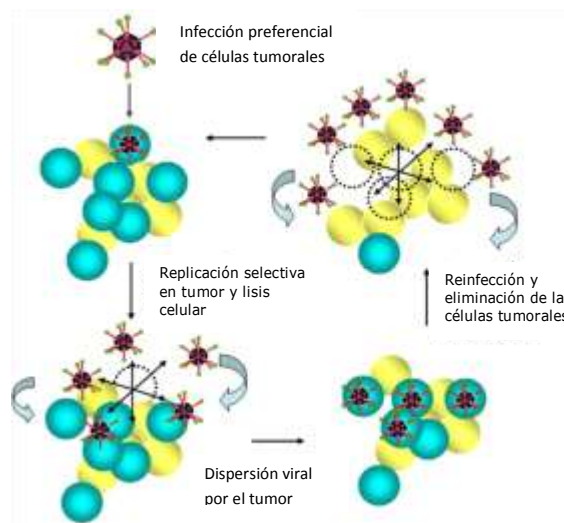


Figura 1. Esquema del sistema de propagación de los virus oncolíticos. Los virus oncolíticos infectan y se replican preferentemente en las células tumorales. La replicación del virus da lugar a la muerte de la célula infectada y a la liberación de la progenie viral al medio extracelular. Los nuevos viriones vuelven a infectar nuevas células tumorales, amplificando la dosis inicial del agente terapéutico y eliminando la masa tumoral (Hedley et al., 2006).

El concepto de viroterapia se remonta a principios del siglo XX cuando se observaron remisiones espontáneas de tumores en pacientes que habían padecido infecciones virales o recibido alguna vacuna. La mayoría de las remisiones espontáneas observadas ocurrieron en pacientes con leucemia o linfoma, generalmente en pacientes jóvenes con sistemas inmunes

comprometidos. Por ejemplo, en 1904 un paciente con leucemia mieloide crónica tuvo una bajada drástica de leucocitos durante una infección gripal. En 1912, DePace observó una regresión notable de un carcinoma de cuello uterino después de administrar la vacuna de la rabia, siendo el primero en atribuir este efecto a la acción de un virus (DePace, 1912). Desde entonces se han descrito numerosas remisiones tumorales tras la infección con el virus de la hepatitis, del sarampión, la rabia o de la varicela (Moore, 1954). Todos estos casos de remisiones tumorales junto con los progresos técnicos en la caracterización y amplificación de los virus *in vitro* llevaron a probar entre los años 50 y 80, gran variedad de virus como el adenovirus, el virus de las paperas, de la viruela o el del Oeste del Nilo entre otros, en pacientes con cáncer terminal (Arakawa et al., 1987; Asada, 1974; Huebner et al., 1956; Hunter-Craig et al. 1970; Milton and Brown, 1966; Roenigk et al., 1974; Shimizu et al., 1988; Southam and Moore, 1951). A partir de estos estudios, se publicaron datos sobre seguridad y eficacia. Si bien la mayoría de los virus administrados indujeron alguna respuesta terapéutica, incluyendo remisiones en algunos tumores, la variabilidad, junto con el bajo cociente eficacia/toxicidad hizo que el estudio de la viroterapia perdiese interés.

A partir de la década de los 90, se empezaron a utilizar los principios de la terapia génica en el tratamiento del cáncer. La restauración de la expresión de algún gen de la célula tumoral (p.ej. p53) (Lang et al., 1999) o la inserción de algún gen suicida como la Timidina Quinasa (Song et al., 2003) fueron los primeros objetivos. La gran limitación de esta aproximación, debido a la falta de replicación de los vectores utilizados, fue la necesidad de alcanzar todas de células tumorales, disminuyendo su eficacia terapéutica.

Los avances en el conocimiento de la biología molecular del cáncer y la ingeniería genética aplicada a los virus han permitido recuperar el concepto de viroterapia del cáncer. Se han generado agentes muy prometedores, selectivos para células tumorales, con baja patogenicidad en tejidos normales y gran capacidad oncolítica. La gran ventaja respecto a la terapia génica es la capacidad de replicación de los virus, permitiendo una amplificación del agente utilizado de manera selectiva en el tumor, disminuyendo los efectos adversos en otros tejidos. Además la generación de resistencias es prácticamente inviable ya que el ciclo lítico implica un gran número de vías (Chiocca, 2002). En 1991, Martuza y colaboradores

fueron pioneros en el diseño de un virus de replicación condicional mediante la modificación genética del Virus Herpes Simplex (HSV) (Martuza et al., 1991). También durante los años 90, gracias a los mejores conocimientos de las funciones de los genes virales, Frank McCormick propuso el adenovirus dl1520, para el tratamiento de tumores con la vía de p53 alterada (Bischoff et al., 1996). Actualmente, diversos virus han sido modificados genéticamente para mejorar tanto la selectividad por célula tumoral como la potencia antitumoral. Varios de ellos, como el Vaccinia, el Herpes, el Adenovirus o el virus del sarampión han sido administrados en ensayos clínicos (Russell et al., 2012) e incluso uno de ellos, el adenovirus H101, ha sido aprobado y se comercializa en China (Huang et al., 2009).

3. Los adenovirus oncolíticos

A la hora de decidir utilizar una especie viral como agente terapéutico, debemos tener en consideración diversos aspectos como la eficacia, la seguridad y la facilidad de manipulación del virus. El agente viral debe infectar, replicarse y destruir las células tumorales de forma selectiva. Además su fisiología natural debe ser causa, idealmente, de una patología leve y bien caracterizada. El genoma viral debe ser estable garantizando homogeneidad tanto en los parámetros de seguridad como en los de producción. Por otro lado, el genoma debe ser manipulable, pudiendo conferirle selectividad para células tumorales y a la vez potencia. Finalmente la producción debe poderse realizar a gran escala para su uso en ensayos clínicos.

Los adenovirus cumplen gran parte de estos requisitos, siendo de gran utilidad como virus oncolíticos. Son patógenos comunes, causantes de patologías leves en condiciones de inmunidad adecuadas. Son virus replicativos, destruyendo la célula huésped durante su ciclo. Los niveles de amplificación durante el ciclo viral son elevados pudiendo llegar a producir 10000 partículas virales a partir de una sola célula infectada favoreciendo la diseminación del agente. Su genoma es fácilmente manipulable gracias a su gran conocimiento y las técnicas de biología molecular actuales, pudiéndoles conferir selectividad tumoral e incrementos de la capacidad oncolítica. A parte de la gran capacidad de amplificación, las

técnicas actuales permiten concentrar los adenovirus unas 100 veces, obteniendo títulos muy elevados de 10^{12} partículas virales por mililitro.

3.1. Estructura de los adenovirus

Los adenovirus, tanto humanos (hAd) como caninos (CAV), se clasifican dentro de la familia Adenoviridae. Los hAd más utilizados son los del serotipo 2 y 5 (Ad2 y Ad5). En perros dos serotipos de CAV han sido descritos, CAV1 y CAV2. CAV1 es responsable de la hepatitis infecciosa canina, mientras que CAV2 ocasiona una infección leve/moderada en el tracto respiratorio superior, produciendo congestión nasal tos y conjuntivitis, similar a la patología que inducen los Ad2 y Ad5 humanos.

Cada virión está compuesto por una cápside icosaédrica, sin envuelta lipídica, que envuelve al núcleo de ADN genómico (Figura 2). La cápside está formada por 8 proteínas estructurales, entre ellas la proteína del hexón (Hx) que forma las 20 caras del icosaedro. La proteína del pentón base (Pb) que forma los doce vértices del icosaedro, desde los cuales se proyecta a modo de antena la proteína de la fibra (Figura 2). La fibra está constituida por tres dominios: la cola del extremo N-terminal (*tail*), una región central o cuerpo de la fibra (*shaft*) y el dominio *Knob*, que corresponde al extremo C-terminal, responsable de la interacción del virus con el receptor CAR (*Coxsackie-Adenovirus Receptor*). El núcleo del virión está compuesto por un ADN linear de doble cadena asociado a varias proteínas. El genoma de los hAd es de 36Kb, mientras que el de los CAVs presenta un tamaño de 31.3 Kb.

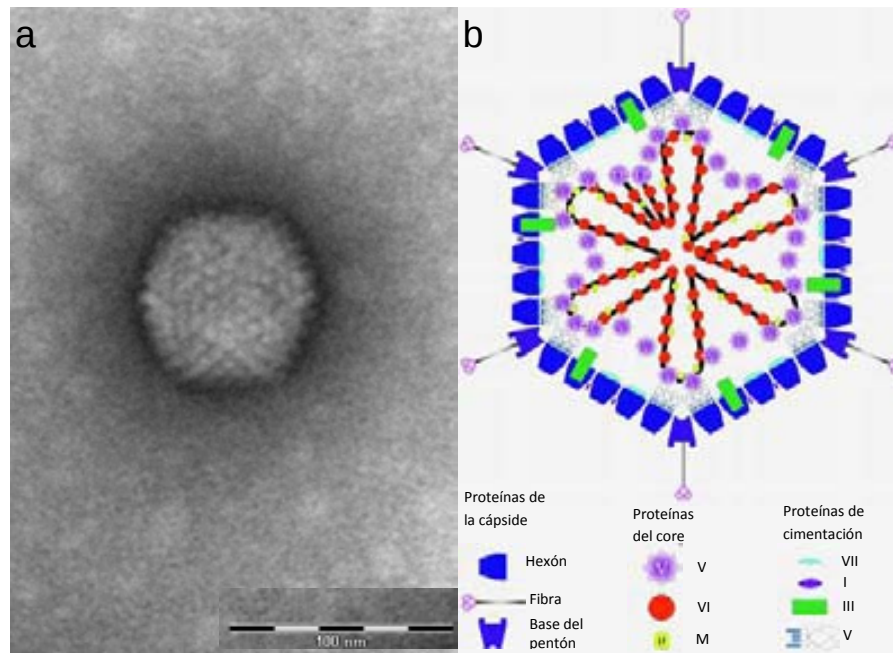


Figura 2. Estructura del adenovirus. (a) Imagen de microscopía electrónica (E. Mercader y E. Laborda, 2009, no publicado) del virión de adenovirus humano. (b) Estructura proteica del adenovirus humano. Las proteínas estructurales y de cimentación se encuentran localizadas de manera específica mientras que la localización de los componentes del núcleo y del DNA viral es coyuntural (modificado de Russell, 2000).

3.2. Biología de los adenovirus

Los adenovirus son virus con un ciclo lítico. La entrada a la célula huésped tiene lugar mediante el reconocimiento y la interacción del dominio *Knob* de la fibra con el receptor celular de alta afinidad CAR. Posteriormente, la mayoría de los hAd media una interacción con las integrinas celulares mediante el dominio RGD (Arg-Gly-Asp) del pentón que permite la internalización del virus mediante la formación de vesículas de clatrina. Sin embargo, los CAV no presentan un dominio RGD, ni similar, de interacción con integrinas en las proteínas de la cápside. Esto sugiere la presencia de otros receptores auxiliares o mecanismos de internalización diferentes a los comúnmente conocidos para el Ad2 y Ad5 (Chillon and Kremer, 2001; Hay, 2003; Seiradake et al., 2009; Soudais et al., 2000). Durante el transporte hacia el núcleo, se produce la disgregación de la cápside, permitiendo la translocación del núcleo viral al núcleo de la célula. Una vez dentro del núcleo, el virus aprovecha la maquinaria transcripcional celular para iniciar la transcripción de los genes virales.

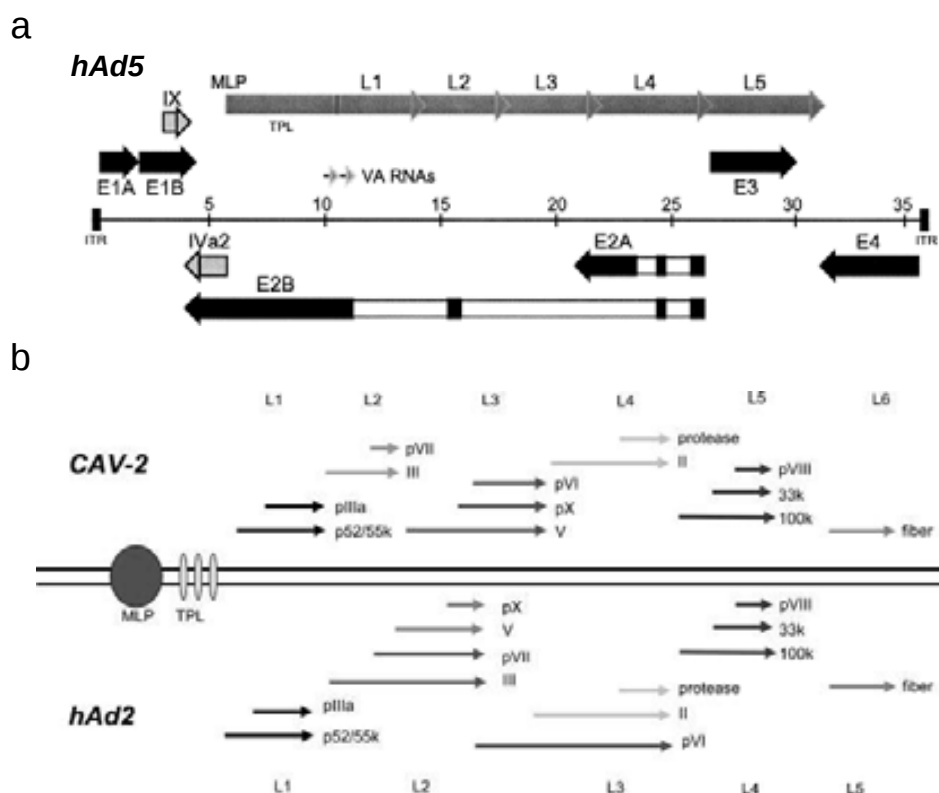


Figura 3. Estructura y organización genómica del adenovirus humano y canino. (a) Organización transcripcional del genoma del Ad5 humano. El DNA de doble cadena se representa como una línea delgada en el centro de la figura, flanqueado por las dos repeticiones terminales invertidas (ITRs). Sobre la línea se indica la referencia del tamaño en kilobases. Los genes tempranos se indican con flechas negras y los intermedios y tardíos con flechas grises (basado en el esquema de Tauber i Dobner, 2001). (b) Detalle de las unidades de transcripción tardías de los adenovirus humano y canino. Las unidades de transcripción tardías del CAV2 y del adenovirus humano 2, se muestran sobre y por debajo del genoma del adenovirus (doble línea) respectivamente (Szelechowski et al., 2009).

Durante la fase temprana la célula huésped se convierte en una productora eficiente del genoma viral. Debido a que la mayoría de las células huésped se encuentran en un estado quiescente en el momento de la infección, las proteínas virales deben interaccionar con las proteínas de la célula huésped para activar la replicación y la división celular. El primer gen del genoma viral que se transcribe es E1A y su producto se une a diferentes proteínas celulares como pRB, p107 y p130. Esta interacción impide que estas proteínas celulares se unan al factor de transcripción E2F y lo bloqueen. De esta manera se activa el ciclo celular y

comienza la replicación del ADN viral. Sin embargo, la desregulación del ciclo celular provocada por E1A induce la acumulación del gen supresor tumoral p53. La activación de la vía de p53 conduce a la inducción de apoptosis, previniendo así la supervivencia de la célula dañada. La expresión del producto del gen adenoviral E1B impide la muerte prematura de la célula huésped. La proteína E1B-55kD se une a p53 e induce su degradación, mientras la proteína E1B-19KD presenta funciones similares a las del factor antiapoptótico Bcl2. A través de estos mecanismos antiapoptóticos el virus mantiene la célula viva el máximo de tiempo posible para maximizar la producción viral. La región E2 codifica para las proteínas necesarias para llevar a cabo el proceso de la replicación del genoma. Los productos sintetizados a partir de la transcripción de la región E3 inhiben la respuesta inmune antiviral, permitiendo así la supervivencia de la célula infectada el tiempo necesario para que se dé la producción viral. Finalmente, la unidad transcripcional E4 codifica para proteínas implicadas en la replicación viral, el transporte del RNA viral y la expresión de genes tardíos. Entre estas proteínas destaca la E4-6/7, que actúa como un transactivador de la transcripción complementando la función de E1A. E4-6/7 es capaz de unirse a E2F y desplazar las proteínas pRB y p107 formando un complejo con dos moléculas de E2F. Este complejo induce la unión estable de E2F con la estructura única de lugares de unión a E2F que presenta el promotor de E2F-1, incrementando de manera exponencial su transcripción (Schaley et al., 2000). Una vez que el DNA se ha replicado, se activa el promotor principal tardío (*Major Late Promoter-MLP*), que conduce a la expresión de un transcrito de RNA mensajero que, por corte y ligación diferencial, genera todos los RNA que codifican para las proteínas estructurales que forman la cápside. Finalmente, la encapsidación del core y la formación de nuevos viriones, que salen de la célula huésped mediante la lisis celular, cierran el ciclo y consecuentemente inducen la muerte celular.

3.3. Selectividad tumoral de los adenovirus oncolíticos

A diferencia de otros virus, como el Reovirus o el Virus de la Estomatitis Vesicular, el adenovirus salvaje no presenta selectividad natural por las células tumorales. Con el fin de conferir a los adenovirus replicativos selectividad por las células tumorales se pueden utilizar tres estrategias: la primera es la delección de funciones virales que son necesarias para la replicación en células normales, pero prescindibles para la replicación en células tumorales; la segunda es situar el control de los genes virales que inician la replicación viral bajo promotores específicos de tumor; la tercera implica modificaciones de las proteínas de la cápside viral implicadas en la infección de la célula huésped.

3.3.1. Deleciones de genes virales como estrategia para conferir selectividad por célula tumoral

Los adenovirus requieren de la maquinaria de la célula huésped para la replicación de su material genético. Mutaciones o deleciones en los genes virales implicados en la activación de la replicación celular o la inhibición de la apoptosis generan virus incapaces de replicarse en células normales. Por otro lado, en las células tumorales donde la replicación celular está activada y las vías de apoptosis inhibidas el virus es capaz de replicarse y consecuentemente de provocar la lisis de la célula tumoral (Chu et al., 2004).

El primer gen viral que fue delecionado en este sentido fue E1B. La delección de una región del gen que codifica por la proteína E1B-55k dio origen al adenovirus dl1520 (también llamado ONYX-015). Con esta mutación, el dl1520 era capaz de replicarse sólo en células con la proteína p53 inactivada, como ocurre en las células tumorales (Bischoff et al., 1996). Posteriormente, deleciones en la región conservada 2 de E1A generó nuevos virus de replicación selectiva, como el Ad Δ 24 o dl922-947 (Fueyo et al., 2000; Heise et al., 2000). Las deleciones en esta región otorgan selectividad en células con alteraciones en la vía de pRB, al impedir que E1A se una a pRB liberando E2F e impidiendo que la célula entre en fase de

replicación en células normales. En célula tumoral esta vía se encuentra alterada, siendo la función de E1A prescindible (Figura 4).

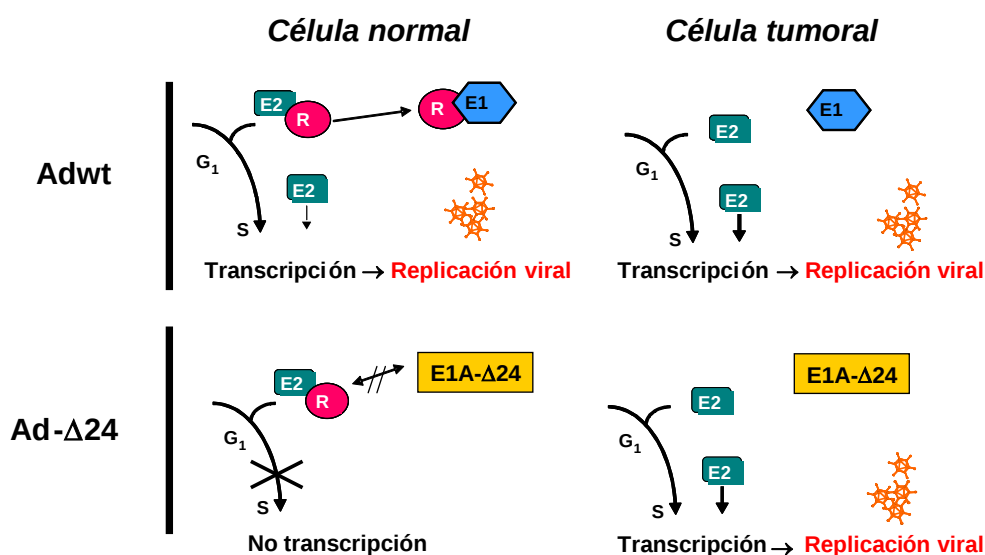


Figura 4. Mecanismo de selectividad tumoral del Ad-Δ24. La proteína E1A del adenovirus secuestra pRB para inducir la entrada de la célula en fase S y permitir la replicación viral. En célula tumoral esta función no es necesaria ya que la vía de Rb está alterada y E2F está libre. En las células normales la delección Δ24 impide la disociación de RB y E2F, inhibiendo la replicación viral.

Sin embargo, la selectividad de estos virus es limitada debido a que la región conservada 1 de E1A mantiene su función, induciendo en cierto grado la entrada de las células a la fase S mediante la unión con p300. Otra delección utilizada para otorgar selectividad a los adenovirus es la delección de los genes VA-RNA (Casallo et al., 2003; Casallo et al., 2006), que dependen de la activación de la vía RAS o del truncamiento de la vía del interferón, alteraciones que se presentan comúnmente en las células tumorales (Grander, 1998).

Aunque se ha otorgado cierto grado de selectividad a estos virus mediante estas mutaciones, las proteínas virales, sobretodo E1A, se continúan expresando en células normales. Después de la administración sistémica, la expresión de E1A en células hepáticas provoca una elevada toxicidad (Engler et al., 2004). Por tanto es necesario mejorar la selectividad, reduciendo así la toxicidad de los virus, para el tratamiento sistémico de pacientes de cáncer.

3.3.2. Control de la replicación viral: direccionamiento transcripcional y traduccional

Otra estrategia para conferir selectividad tumoral a los adenovirus es a través de la regulación de la expresión de genes virales –como por ejemplo E1A, E1B, E2 ó E4- mediante la inserción de secuencias exógenas para que la expresión de estos genes sólo se dé en células donde el promotor esté activo. Entre las proteínas a controlar destaca la E1A, ya que es la primera a expresarse y la que inducirá la expresión del resto de proteínas virales.

Para aumentar la selectividad hacia tejidos se han utilizado diferentes promotores, como por ejemplo el del antígeno específico de próstata (PSA) para el cáncer de próstata (Rodriguez et al., 1997), el de la α -fetoproteína (AFP) para el hepatocarcinoma (Hallenbeck et al., 1999) o el de la osteocalcina (OC) para el osteosarcoma o cáncer de próstata (Hsieh et al., 2002; Matsubara et al., 2001). Este promotor (OC) también se ha utilizado para el diseño del adenovirus canino oncolítico, OCCAV, con la expresión de E1A bajo el control del promotor de la osteocalcina (Hemminki et al., 2003). Sin embargo, y aunque el uso de promotores específicos de tumor confiere una gran selectividad a los virus, el uso de un promotor activo en un amplio rango de tumores representa una clara ventaja orientada al tratamiento de pacientes con tipos diferentes de tumor mediante el mismo agente e incluso casos de enfermedad avanzada donde los marcadores específicos de la lesión inicial se hayan perdido. Incluso dentro de un mismo tumor la expresión de marcadores puede ser diferente (Chu et al., 2004), priorizando por tanto el uso de promotores que exploten características esenciales de las células tumorales.

Un promotor potente que esté activado en células tumorales y reprimido en células normales es clave para obtener altos índices de oncolisis con bajos niveles de toxicidad. Debido a la desregulación de la vía de RB en todos los tumores, los promotores que responden al factor de transcripción de E2F otorgan un amplio tropismo a los virus oncolíticos (Cascallo et al., 2007; Johnson et al., 2002; Rojas et al., 2009 y 2010; Tsukuda et al., 2002). Entre estos promotores destaca el E2F-1, ya que su estructura única de lugares de unión a E2F le confiere un alto poder de transcripción. En células normales los virus que incorporan este promotor controlando E1A inhiben su transcripción mediante la unión de

complejos pRB-E2F-HDAC. En células tumorales la unión de E2F libre activa la transcripción de E1A, iniciando el ciclo viral y la transcripción del resto de proteínas del adenovirus. Entre ellas la E4-6/7, que se une al E2F libre provocando un potente ciclo de autoactivación debido a una unión más fuerte a los lugares de unión E2F y provocando mayor expresión de E1A.

Otra estrategia para el control de la transcripción de los genes virales es la construcción de promotores artificiales. Estos promotores se basan en secuencias modulares formadas por lugares de unión a factores de transcripción y factores de silenciación o potenciadores de la transcripción, unido todo ello al núcleo de un promotor (Hernández-Alcoceba et al., 2002; Peter et al., 2003). Una estrategia similar utilizada con el fin de conservar tanto el espacio genómico disponible del virus como la composición original de los promotores virales es la inserción de lugares de unión a factores de transcripción directamente en los promotores virales. Se debe tener muy en cuenta la estructura de los promotores virales, ya que el lugar de inserción y la distancia entre estos será clave para el éxito de la estrategia. En este sentido en nuestro grupo se ha construido el ICOVIR15 (Rojas et al., 2010). Este virus proviene de la evolución, siguiendo los pasos descritos en este mismo apartado, de ICOVIR5 (E1A bajo el control del promotor de E2F) e ICOVIR7 (E1A bajo el control del promotor de E2F modificado mediante la inserción de cajas con lugares de unión a E2F). Para la construcción de ICOVIR15, se partió del AdΔ24-RGD, y se insertaron detrás de la señal de encapsidación ocho lugares de unión a E2F organizados en cuatro palíndromos imperfectos. También se incluyó un lugar de unión a Sp-1 ya que se ha descrito la cooperación entre ambos factores para activar la transcripción. Mediante estas modificaciones se confirió al virus selectividad por células con la vía de RB alterada (células tumorales) a la vez que se reprimía la expresión de E1A en células normales, disminuyendo notablemente la toxicidad asociada a la administración intravenosa. Otro aspecto a destacar de ICOVIR15 es que sólo incorpora 151pb extras para obtener esta selectividad, mientras que sus predecesores necesitaban mucho más espacio al incluir todo el promotor de E2F, impidiendo incluir nuevos transgenes para potenciar la oncolisis.

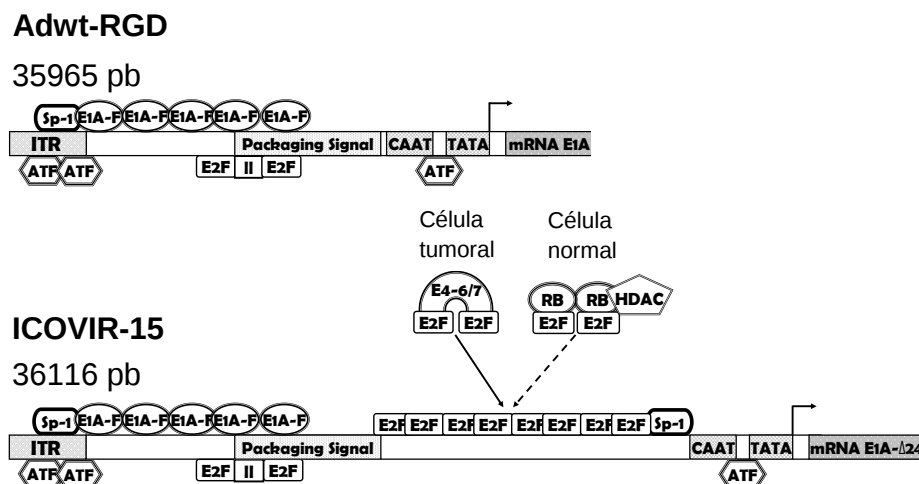


Figura 5. Representación esquemática del control transcripcional de E1A por ICovIR-15. ICovIR-15, además de los factores de transcripción que controlan la transcripción de E1A en el adenovirus salvaje, incorpora 8 lugares de unión a E2F organizados en cuatro palíndromos imperfectos. Además incorpora un lugar de unión a Sp-1 detrás de los palíndromos. Según el virus infecte una célula tumoral o normal, la unión de diferentes complejos a los nuevos lugares de unión activará o reprimirá la transcripción. En la figura además se indican los pesos moleculares de los dos genomas (Rojas et al., 2010).

3.3.3. Direccionamiento de la infectividad viral: direccionamiento transduccional

Otra estrategia para direccionar al adenovirus hacia la célula tumoral consiste en modificar su cápside para que infecte preferentemente células tumorales. El tropismo preferencial por las células tumorales requiere el bloqueo de la unión del virus con sus receptores naturales o *detargeting*. Mientras que el redireccionamiento del adenovirus hacia la célula tumoral diana necesita de un ligando específico de tumor o *retargeting*.

Debido al importante papel que juega el hígado en la eliminación del virus del organismo y los factores sanguíneos a la hora de inducir el tropismo hepático del virus, la eliminación de la interacción con estos factores ha demostrado reducir la cantidad de virus retenida en el hígado y a su vez aumentar la cantidad de virus en el tumor (Bayo-Puxan et al., 2006; Waddington et al., 2008). Sin embargo, en nuestro grupo se ha demostrado que esta eliminación de la interacción con factores sanguíneos también afecta negativamente la entrada de virus a las células tumorales (Giménez-Alejandre et al., 2008), dificultando el *detargeting* y priorizando la búsqueda de nuevos sistemas de *targeting* tumoral.

Una aproximación para aumentar el *targeting* tumoral es la construcción de fibras adenovirales quiméricas que contienen, por ejemplo, el *shaft* de la fibra del hAd5 y el *knob* de la fibra del CAV1 ó CAV2 (Paul et al., 2008; Zheng et al., 2007). De todas formas las estrategias de *targeting* más utilizadas han sido la inserción de motivos de unión específicos de tumor en diferentes regiones de la cápside (hexón, pentón, proteína IX ó *knob*). Los lugares de incorporación deben estar expuestos, para permitir la interacción de las moléculas entre ellas. Entre ellos el bucle HI (*HI loop*) del domino *Knob* de la fibra ha sido ampliamente utilizado con éxito (Krasnykh et al., 1998; Xia et al., 2000; Belousova et al., 2002). Entre los motivos de unión incorporados a la fibra destaca el motivo CDCRGDCFC, conocido como RGD-4C. Este motivo se ha insertado en el *HI-loop* del *Knob* de la fibra adenoviral permitiendo la entrada del virus a la célula tumoral mediante la interacción con integrinas, ya que el receptor *CAR* –que media la entrada a la célula- se encuentra poco expresado en células tumorales (Bauerschmitz et al., 2002), en cambio las integrinas que interaccionan con este motivo se encuentran sobreexpresadas en gran cantidad de tumores. De esta forma se aumenta la infectividad del virus en las células tumorales (Bauerschmitz et al., 2002).

En el caso del adenovirus canino, no se han descrito motivos de interacción con integrinas en ninguna proteína de la cápside viral (Chillón and Kremer, 2001). Se han utilizado partes de su fibra para redireccionar el tropismo de los adenovirus humanos y se ha estudiado la interacción (unión e internalización) del CAV2 con células humanas y de hámster modificadas para expresar diversos tipos de integrinas y receptores de superficie (Soudais et al., 2000), aunque su interacción con células tumorales caninas resta por estudiar.

4. Limitaciones en la aplicación de la viroterapia

En el caso de los hAd las interacciones con los elementos sanguíneos celulares y serológicos, al igual que la biodistribución sistémica por los diferentes órganos, están muy bien estudiadas. No es el caso de los CAV, donde la información disponible es limitada. Los conceptos siguientes son de aplicación a los hAd, aunque debido a las similitudes biológicas

entre CAV2, hAd 2 y 5 en sus respectivas especies es posible que se comporten de manera similar.

4.1. Llegada del adenovirus al tumor

Los requisitos para la llegada de los adenovirus al tumor dependerán de la localización y diseminación o no de éste. Cuando la enfermedad aún no se encuentra diseminada, la administración local es una buena opción. Por el contrario en casos de enfermedad metastásica, la administración intravenosa será recomendable, aunque presente ciertos problemas (Figura 6). En el caso de la administración intratumoral es aconsejable distribuir la dosis viral en múltiples lugares de la lesión evitando concentrarla en un solo punto y favoreciendo la diseminación del agente terapéutico por la masa tumoral.

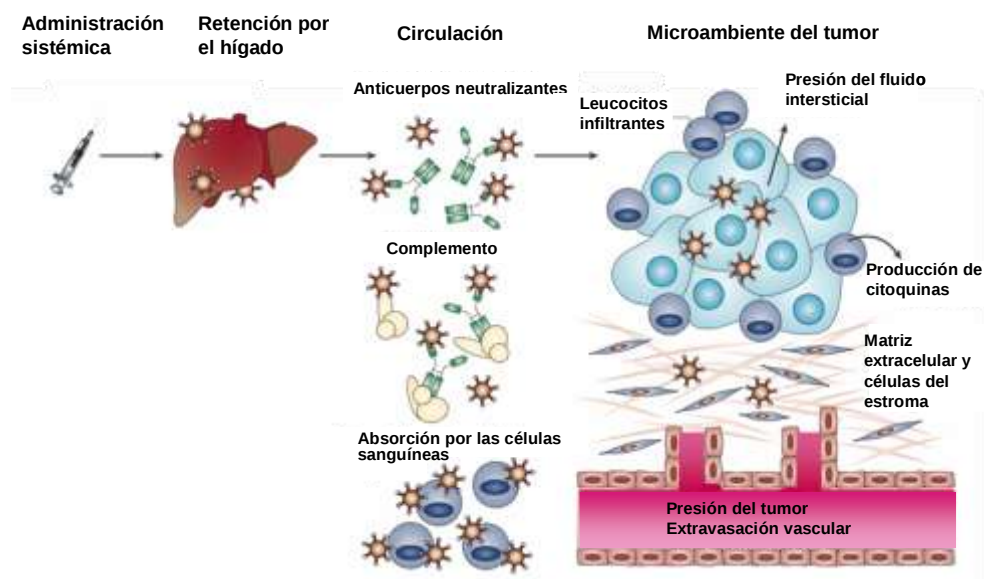


Figura 6. Barreras que dificultan la distribución de adenovirus oncolíticos en los tumores *in vivo*. Después de la administración sistémica de un adenovirus existen diferentes barreras que limitan la llegada del virus al tumor e infección de las células tumorales. La mayoría del virus administrado es retenido por el hígado. El poco virus que escapa puede ser neutralizado por absorción en las células sanguíneas, por la cascada del complemento o por los anticuerpos neutralizantes. Para que el virus acceda al tumor debe salir del torrente sanguíneo atravesando la pared del endotelio en contra del gradiente de presión presente en el fluido intersticial. Una vez en el tumor, la dispersión de virus puede verse perjudicada por la presencia de la matriz extracelular y las células del estroma. Finalmente, los leucocitos infiltrantes del tumor pueden limitar la dispersión del virus célula a célula mediante su actividad antiviral o de forma indirecta mediante la secreción de interferones y otras citoquinas.

El adenovirus no está adaptado a la circulación por el torrente sanguíneo y se elimina rápidamente después de la administración sistémica (Alemany et al., 2000). La cascada del complemento y la unión a plaquetas y eritrocitos neutralizan al Ad al entrar en el torrente sanguíneo (Carlisle et al., 2009; Shimony et al., 2009). La presencia de anticuerpos contra los adenovirus, tanto en la especie humana como en la canina, también contribuye a la inactivación. Posteriormente el hígado, mediante las células Kupffer y la infección masiva de hepatocitos debido a la retención del virus en los espacios de Disse, elimina la mayor parte del virus administrado, disminuyendo la biodisponibilidad y causando además toxicidad hepática.

La alta permeabilidad y desestructuración de la vascularización tumoral favorece la llegada del virus y otros agentes terapéuticos por vía sanguínea (Jang et al., 2003). El nivel de vascularización de cada tumor, influirá en la capacidad de los adenovirus de diseminarse por la masa tumoral. Tumores más pequeños suelen estar más vascularizados, los grandes pueden presentar zonas avasculares y necróticas. Por último los adenovirus deben atravesar el espacio intersticial, delimitado por las membranas de las células del endotelio vascular y las tumorales. Este espacio presenta una presión aumentada en comparación con un tejido normal dificultando la llegada de los agentes terapéuticos (Baumgartner et al., 1998). Además, las concentraciones elevadas de matriz extracelular en este espacio también dificultan el transporte de los adenovirus (Jang et al., 2003).

4.2. Dispersión intratumoral de los adenovirus

La replicación, amplificación y diseminación de los adenovirus por el tumor es la gran ventaja de la viroterapia respecto a otras aproximaciones terapéuticas. La dispersión intratumoral del virus es esencial para que a partir de una dosis inicial baja se amplifique el efecto oncolítico hasta eliminar la totalidad de la masa (McCormick, 2005). La dificultad para obtener remisiones completas incluso en modelos de laboratorio, señala que la distribución del virus dentro del tumor es insuficiente (Sauthoff et al., 2003). El tejido tumoral presenta elevadas concentraciones de matriz extracelular (ECM). Las células tumorales y del estroma

sintetizan una matriz de colágeno, fibras elásticas y ácido hialurónico que junto a la elevada presión intersticial tumoral dificultan el transporte de las macromoléculas por el espacio intersticial. Estos componentes han sido identificados como causantes de la resistencia al transporte de moléculas en los tumores (Jang et al., 2003).

Entre los componentes de la matriz extracelular destaca el ácido hialurónico (HA). Esta molécula es un glicosaminoglicano compuesto por unidades repetidas de dos disacáridos. Se sintetiza a partir de dos hialuron sintasas y se degrada por unos enzimas, llamados hialuronidasas (Toole, 2004). En la especie humana existen diversas hialuronidasas, Hyal 1, 2 y 3 son las formas mayoritarias presentes en la mayoría de tejidos, en el plasma, la médula ósea y testículos por ejemplo. Otra hialuronidasa, la PH20, se encuentra en el esperma de mamíferos y cumple con funciones relacionadas con la fertilización.

El HA se encuentra sobreexpresado en diferentes tipos de cáncer. Sus niveles están correlacionados con comportamientos invasivos y metástasicos, siendo en muchos tumores un indicador pronóstico desfavorable (Auvinen et al., 2000; Hautmann et al., 2001; Knudson, 1996; Setälä et al., 1999). En los tejidos tumorales, el HA favorece la formación de metástasis induciendo la migración y la adhesión de las células tumorales (Hayen et al., 1999; Hobarth et al., 1992; Itano et al., 2002; Liu et al., 2001b) mediante la interacción con varios receptores celulares como el CD44 y el receptor de la motilidad mediada por ácido hialurónico (Girish and Kemparaju, 2007). En modelos de laboratorio, la manipulación de los niveles de HA o de su interacción con los receptores celulares altera el curso de la progresión de diferentes tipos tumorales. La degradación o inhibición de la expresión del HA se ha asociado a una reducción del crecimiento tumoral en varios modelos tumorales (Simpson et al., 2002; Jacobson et al., 2002; Shuster et al., 2002), mientras que la sobreexpresión de HA incrementa el crecimiento tumoral y la presencia de metástasis (Itano et al., 1999; Jacobson et al., 2002; Kosaki et al., 1999; Liu et al., 2001a). En contra de estos resultados, existen estudios que relacionan la sobreexpresión de hialuronidasas con la progresión y malignidad tumoral (Franzmann et al., 2003; Hautmann et al., 2001; Lokeshwar et al., 2001; Lokeshwar et al., 1999). También se ha asociado la presencia de productos de bajo peso molecular provenientes de la degradación del HA con la formación de neovascularización dentro del

tumor (Kumar et al., 1989). Al contrario, el HA de alto peso molecular se ha descrito como antiangiogénico. Además, los fragmentos de bajo peso molecular estimulan la producción de metaloproteasas y pueden promover la migración celular.

Por tanto, aunque la relación del HA y sus productos de degradación con la progresión tumoral, la angiogénesis y la malignidad tumoral es compleja y variable, la mayoría de estudios sitúan al HA como una diana terapéutica importante para evitar la progresión tumoral (Toole, 2004).

4.3. Potencia oncolítica de los adenovirus

Los resultados obtenidos en ensayos clínicos indican que es necesario el diseño y la obtención de nuevos virus o mecanismos que muestren mayor eficacia antitumoral (Russell et al., 2012). Diferentes adenovirus se han administrado en ensayos clínicos, el más conocido y probado es el ONYX-015. Actualmente están en curso diversos ensayos clínicos con varios Ad y vías de administración para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer (Tabla 1). Por otro lado, sin llegar a cumplir con los requisitos de un ensayo clínico, el programa Advanced Therapy Access Program (ATAP) del Dr Akseli Hemminki está administrando por varias vías una gran variedad de adenovirus oncolíticos en pacientes oncológicos. En general, los efectos secundarios han sido reversibles y de carácter leve, incluyendo sintomatología gripal, elevaciones de transaminasas hepáticas o hiperbilirrubinemia, demostrando la elevada seguridad de la viroterapia mediante el uso de múltiples vías de administración. Sin embargo, la eficacia ha sido limitada. Por tanto, los resultados hasta la fecha en la mayoría de ensayos realizados en pacientes humanos muestran una eficacia limitada y temporal (Russell et al., 2012). Mediante el uso aislado de agentes víricos, se ha demostrado actividad antitumoral, aunque la respuesta terapéutica ha sido baja generalmente. El uso combinado con quimioterapia ha sido más prometedor, aumentando la eficacia antitumoral sin aumentar la toxicidad. En este sentido, existen varias estrategias destinadas a compensar las carencias de los adenovirus oncolíticos con el fin de aumentar directa o indirectamente su

potencia oncolítica. Además, algunas de ellas como la inserción de transgenes dotan al virus de nuevas herramientas para luchar contra los impedimentos que imponen los tumores.

Tabla 1. Ensayos clínicos con adenovirus oncolíticos

Virus	Modificaciones	Fase	Tumor	Ruta	Combinación	Lugar
Oncorine (H101)	E1B-55k-E3-	2	SCCHN	IT	Cisplatin	Multicenter
		3	SCCHN	IT	Cisplatin	Multicenter
Onyx-015	E1B-55k-E3B-	1	Lung Mets	IV	–	Multicenter
		1	Glioma	Intracavity	–	Multicenter
		1	Ovarian cancer	IP	–	Multicenter
		1	SCCHN	IT	–	Multicenter
		1	Solid tumors	IV	Enbrel	Mary Crowley
		1	Sarcoma	IT	Mitomycin-C Dox, cisplatin	Mayo Clinic
		1/2	PanCa	IT	Gemzar	UCLA
		2	CRC	IV	–	Multicenter
		2	Hepatobiliary	IT	–	Montefiore
		2	CRC, PanCa	IA	–	Multicenter
		2	SCCHN	IT	–	Multicenter
		2	SCCHN	IT	Cisplatin, 5-FU	Multicenter
		2	CRC	IV	5-FU/leucovorin	Stanford
CG7060	PSA control	1	Prostate cancer	IT	RT	Johns Hopkins
CG7870/CV787	Rat probasin-E1A hPSA-E1B E3+	1/2	Prostate cancer	IV	–	Multicenter
		1/2	Prostate cancer	IV	Docetaxel	Mary Crowley
CG0070	E2F-1, GM-CSF	2/3	Bladder cancer	Intracavity	–	UCSF
Telomelysin	hTERT	1	Solid tumors	IT	–	Mary Crowley
Ad5-CD/TKrep	CD/TK	1	Prostate cancer	IT	5-FC & GCV	Henry Ford, Detroit
		1	Prostate cancer	IT	5-FC+GCV+RT	Henry Ford, Detroit
Ad5-D24-RGD	RGD, Delta-24	1	Ovarian cancer	IP	–	UAB
		1	Glioma	IT	–	MD Andersen
		1/2	Glioma	IT	–	Erasmus Medical Center
Ad5-SSTR/TK-RGD	SSTR, TK, RGD	1	Ovarian cancer	IP	GCV	UAB
CGTG-102	Ad5/3, GM-CSF Delta-24	1/2	Solid tumors	IT	–	Baylor
		1	Solid tumors	IT/IV	Metronomic CTX	Docrates Hospital Helsinki
INGN-007 (VRX-007)	wtE1a, ADP	1	Solid tumors	IT	–	Mary Crowley
ColoAd1	Ad3/11p	1/2	CRC, HCC		–	PsiOxus

Modificado de Russell et al., 2012

4.4. Modelos empleados

Se han utilizado diversas especies como modelos en la terapia del cáncer con adenovirus (Jogler et al., 2005). Los ensayos de eficacia suelen realizarse en ratones inmunodeficientes con tumores xenógrafos humanos, mientras que los ensayos de toxicidad suelen realizarse en ratones inmunocompetentes (Halldén et al., 2003; Lichtenstein et al., 2009). Es importante considerar que aunque estos ensayos se realicen en ratones, esta especie no es permisiva a la replicación de los adenovirus humanos. El Hámster Sirio se ha propuesto como un modelo más completo que el ratón (Thomas et al., 2006; Lichtenstein et al., 2009; Ying et al., 2009) debido a la semipermisividad que presentan sus células a la replicación de los adenovirus humanos. Aunque esta ventaja supone un gran avance respecto al modelo murino, los tumores deben ser implantados de manera artificial. Esto provoca que dichos tumores tengan estructuras y cinéticas de progresión muy diferentes a la de los tumores que se generan de manera espontánea. Por tanto, estos modelos, aunque son excelentes herramientas para definir preclínicamente las características de toxicidad y potencia de los adenovirus, están poco correlacionados con el entorno que los adenovirus oncolíticos encontrarán en los pacientes humanos. Al entrar en fases clínicas, los argumentos anteriormente citados, provocan que los índices de eficacia terapéutica difieran con los observados en los modelos preclínicos. Por otro lado, y de manera menos frecuente, aparecen efectos adversos no esperados (Raper et al., 2003). La falta de buenos modelos impide la extrapolación fiable y exacta de los resultados de eficacia y toxicidad. Además las diferencias y alteraciones en la inmunidad y la evolución tumoral de estos modelos impiden la posibilidad de clarificar el papel que juega el sistema inmune y el microentorno tumoral del paciente sobre los efectos del virus.

5. Estrategias para mejorar la eficacia terapéutica de los adenovirus

5.1. Mejora del control de E1A

La mayoría de modificaciones transcripcionales de E1A provocan una pérdida de la cantidad de E1A expresada en células tumorales. Aunque ligeras pérdidas no parecen tener gran importancia en la potencia oncolítica de los adenovirus (Hitt and Graham, 1990; Nettelbeck et al., 2002), cuando estos virus se prueban en una gran variedad de líneas tumorales la pérdida de potencia oncolítica se hace evidente. La restauración o incluso el aumento de la expresión de E1A del adenovirus salvaje permiten aumentar la cantidad de virus producido. Una mayor cantidad de virus producido implica mayores cantidades de virus liberado al medio extracelular y esto ha sido postulado mediante un modelo matemático como un punto crítico para el éxito de la viroterapia (Wein et al., 2003).

5.2. Bioselección de adenovirus

Una estrategia utilizada para desarrollar virus más potentes se basa en el cribado en condiciones controladas en el laboratorio de un stock de virus previamente mutagenizado. De esta forma se dará ventaja selectiva a aquellos mutantes que cumplan un conjunto de condiciones predefinidas. Esta estrategia ha sido ampliamente usada en el campo de la virología y más recientemente en el campo de la viroterapia con adenovirus oncolíticos (Yan et al., 2003; Subramanian et al., 2006). En nuestro grupo se ha seleccionado una mutación en la proteína E3-19K (Gros et al., 2008) que provoca un aumento de la permeabilización de la membrana plasmática celular, actuando de forma similar a una vioporina. Este aumento de la permeabilización permite una mayor liberación al medio de virus, lo que se traduce en un aumento de potencia oncolítica.

5.3. Adenovirus oncolíticos armados

La expresión de un transgén desde el genoma del adenovirus oncolítico es una aproximación muy interesante ya que aporta herramientas exógenas a los virus con funciones que por ellos mismo no pueden realizar. Esta estrategia representa la combinación de la terapia génica y la viroterapia. Esta estrategia permite multiplicar la cantidad de transgén administrado mediante la replicación viral, y además la expresión de este transgén puede multiplicar el efecto antitumoral de la viroterapia (Kim et al., 2006).

Cuando insertamos un transgén debemos tener en cuenta dos factores. Por un lado la replicación viral no se puede ver comprometida por la misma inserción o por la función de la proteína por la que codifica. El segundo factor es la capacidad de incorporar nuevo material genético al genoma, en el caso del adenovirus humano ésta es del 105%. Otras especies como el adenovirus ovino dispone de mayor capacidad (114%), mientras que en el caso de los CAV todavía no existen estudios. La incorporación de estos transgenes busca aumentar la capacidad citotóxica de los virus, modificar el microambiente tumoral o la respuesta inmune frente a la célula tumoral. En el caso de la matriz extracelular que bloquea la distribución del virus por el tumor, la inserción de un transgén que degrade o disminuya la producción de la matriz extracelular reduciendo la presión intersticial puede aumentar notablemente la diseminación del virus y por consiguiente su capacidad de oncolisis.

5.4. Combinación con drogas u otras terapias

Además de la modificación genética de los adenovirus oncolíticos, la combinación con las terapias convencionales del cáncer puede beneficiar la actividad antitumoral de los agentes viroterapéuticos. La muerte de las células tumorales por las drogas amplía el espacio intersticial libre y permite una mejor difusión de los adenovirus (Jang et al., 2003). Se han demostrado efectos sinérgicos de hAd con varias drogas como el cisplatino, 5-fluorouracil, doxorubicina o paclitaxel y también con la radioterapia o fármacos que inducen autofagia como el RAD001 o la rapamicina (Li et al., 2001; Cheong et al., 2008; Dilley et al., 2005;

Alonso et al., 2008; Yokoyama et al., 2008), así como también con algunos bloqueantes de los canales del calcio como el verapamilo (Gros et al., 2010). Además el uso de drogas inmunosupresoras como la ciclofosfamida inhiben la respuesta antiviral aumentando el efecto antitumoral de la viroterapia (Thomas et al., 2008). Por otro lado la incorporación de un transgén que permita degradar la ECM, favorece la diseminación tanto del virus como del agente quimioterápico, aumentando el efecto terapéutico de ambos (Baumgartner et al., 1998; Desoize et al., 2000). La combinación con diferentes agentes puede ampliar el margen de posibilidades para potenciar el efecto oncolítico.

5.5. Utilización de modelos más completos

El perro se ha propuesto como un nuevo modelo singénico más completo que el ratón y el hámster (Hemminki et al., 2003; Smith et al., 2006; Arendt et al., 2009). Los perros de compañía desarrollan tumores de manera espontánea debido a un aumento de su esperanza de vida y de una exposición a condiciones medioambientales similares a la nuestras (Paoloni and Khanna, 2008). Es importante recalcar, que los modelos anteriormente citados, provienen de animales con una tasa de consanguinidad elevadísima, por tanto con una diversidad genética mínima. En el caso del perro, y aunque existan razas consanguíneas, el nivel de consanguinidad es menos intenso y los animales cruzados o la inclusión en los ensayos de animales de varias razas amplía la diversidad genética existente. Además la proximidad entre el genoma humano y el canino es mayor que entre el humano y los modelos anteriormente citados (Kirkness et al., 2003). Por otro lado, la terapia ocurrirá en un entorno inmune intacto, favoreciendo el esclarecimiento del papel del sistema inmune. Finalmente, el comportamiento biológico y la presentación clínica de ciertos tumores caninos, son similares a los de la especie humana (Hansen et al., 2004).

Hasta la fecha se han identificado dos serotipos de adenovirus canino (Morrison et al., 1997). El CAV1 es el agente causante de la hepatitis infecciosa canina (Decaro et al., 2008) mientras que el CAV2, es un virus menos patogénico causante de una enfermedad respiratoria leve, pero muy contagiosa, llamada tos de las perreras, (Buonavoglia et al., 2007) similar a la

patología causada en la especie humana por los Ad2 ó Ad5. Además, los perros son vacunados rutinariamente con el CAV2 para protegerles de la hepatitis producida por el CAV1 ya que se da una protección sérica cruzada. Por tanto, los perros presentan diferentes niveles de anticuerpos contra estos virus, como suele ocurrir en la especie humana con los anticuerpos contra Ad2 ó Ad5, aumentando el margen de seguridad de los tratamientos (Dhar et al., 2009). Con todo lo dicho, la terapia de pacientes caninos con un adenovirus oncolítico basado en el CAV2, cumpliría con todos los requisitos previamente citados para ser un buen modelo predictivo de la viroterapia con adenovirus de pacientes de cáncer humanos.

6. El ICOVIR17

El ICOVIR17 es un adenovirus oncolítico diseñado en nuestro grupo para el tratamiento de neoplasias diseminadas mediante la administración sistémica (Guedan et al., 2010). Este virus combina varias modificaciones genéticas para aumentar la selectividad tumoral, inhibir la replicación del virus en tejidos normales y aumentar la diseminación del virus en el tumor. La replicación de ICOVIR17 está condicionada por la vía de RB, como en su virus parental, ICOVIR15 (Rojas et al., 2010, Figura 5). Este método de control de la replicación aprovecha el potente bucle de autoactivación que se genera entre los lugares palindrómicos de unión a E2F, que controlan la expresión de E1A y E4-6/7. ICOVIR17 dispone de 8 lugares de unión a E2F detrás de la señal de encapsidación organizados en cuatro palíndromos imperfectos. Además también incorpora un lugar de unión a Sp-I, activando complementariamente la transcripción junto a E2F (Karlseder et al., 1996). En la figura 5 se puede ver un esquema de como interactúan los diferentes factores de transcripción que se unen al promotor de E1A. La unión de E2F libre a los lugares de unión activaría la transcripción de E1A en células tumorales, activando a su vez el resto de proteínas virales, incluyendo E4-6/7, que forma un complejo con E2F libre y se une de forma activa a los palíndromos presentes en el promotor de E1A y de E2 iniciando la replicación viral y la lisis de la células. Al contrario, en células quiescentes, la unión de los complejos E2F-pRB-HDAC a los palíndromos debería inhibir la

transcripción de E1A y la replicación viral. En este caso también la delección $\Delta 24$ en E1A evitaría la disrupción de los complejos E2F-pRB en caso de que hubiese ciertos niveles basales de expresión del promotor. ICOVIR17 también tiene el péptido RGD insertado en el *HI-loop* de la fibra, como ICOVIR15, para incrementar la infectividad de las células tumorales. Además, incorpora el gen de la hialuronidasa humana PH20 detrás de la fibra, permitiéndole degradar la matriz extracelular, en concreto el HA, y confiriéndole mayor capacidad de diseminación por el tumor.

7. Los Virus Adeno-asociados

Los virus adeno-asociados (AAV), son virus muy pequeños de entre 20 y 25 nm de diámetro, sin envoltura lipídica, de cadena simple de DNA. Pertenecen a la familia Parvoviridae (Hoggan, 1970; Berns, 1990). Las partículas virales tienen forma icosaédrica y presentan una resistencia elevada a la temperatura, pH ácido, detergentes y disolventes, haciéndolas mucho más estables que la de otros virus (Lai et al., 2002). Entre el 80 y el 90% de la población es seropositiva para AAV y se ha detectado la presencia de estos virus en el tracto genital humano. De todas formas, los AAV no se han asociado a ninguna patología. Es más, se ha vinculado a estos virus con cierto grado de protección frente al cáncer de cerviz uterino causado por el virus del papiloma.

El genoma del AAV se encapsida en forma monocatenaria, y tiene un tamaño aproximado (según serotipo) de 4.5Kb, con ITRs de 145 bases a cada extremo. El genoma dispone de dos marcos de lectura abiertos que codifican para las proteínas no estructurales (proteínas Rep) y estructurales (proteínas Cap). Se han encontrado tres promotores (p5, p19 y p40) que codifican para cuatro proteínas no estructurales (Rep 40, 52, 68, 78) y tres estructurales (VP1, 2 y 3). Cada una de las ITRs se compone de dos pequeños palíndromos flanqueados por un palíndromo más grande. Esta organización permite formar una estructura de T que actúa como cebador para la replicación viral (Hong et al., 1992). En la figura 7 se muestra (a) una imagen de microscopia electrónica donde se observan 3 virus adeno-asociados (círculo

verde) junto con un adenovirus, de tamaño mucho mayor, y (b) un esquema de la organización de su genoma.

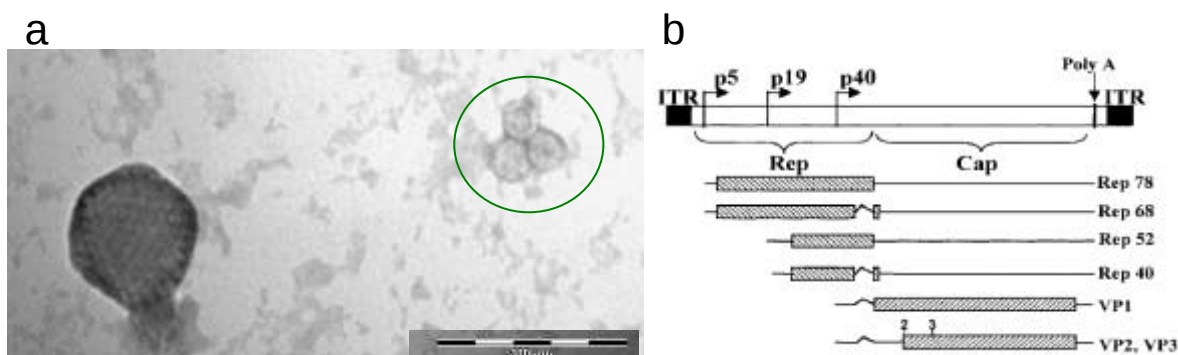


Figura 7. Estructura del virus adeno-asociado. (a) Imagen de microscopía electrónica (E. Mercader y E. Laborda, 2009, no publicado) de tres viriones de virus adeno-asociado (círculo verde), donde aparece también un adenovirus (izquierda). (b) Organización transcripcional del genoma del AAV2. El DNA de cadena simple se representa como un rectángulo alargado flanqueado por las dos repeticiones terminales invertidas (ITRs). Sobre él se indican los tres promotores (p5, p19 y p40) y bajo él las proteínas a las que dan lugar después del proceso de corte (Lai et al., 2002).

Los AAV pertenecen al género Dependovirus, tal y como su nombre indica dependen de otros virus llamados *helper* para completar su ciclo viral. Estos virus se descubrieron en 1965, como contaminantes de stocks de adenovirus (Figura 7a). Los virus *helper* más comunes son los adenovirus y los herpesvirus (Casto et al., 1967; Buller et al., 1981). No todos los genes de los virus *helper* son necesarios para la replicación de los AAV, en el caso del adenovirus se han descrito los genes de E1, E2A, E4 y los VA RNA como necesarios (Janik et al., 1981; Weindler and Heilbronn, 1991) aunque mediante el aporte de un único gen adenoviral, el E4orf6, ha sido posible generar elevadas cantidades de vectores adeno-asociados (Allen et al., 2000). Por otro lado, es posible que en el caso de incorporar agentes genotóxicos al cultivo celular se pueda dar cierto grado de replicación, pero a niveles muy bajos. En ausencia de estos virus *helper*, los AAV entran en fase de latencia, integrándose en el cromosoma 19 humano de forma específica (Samulski et al., 1991). Cuando se da la coinfección con un virus *helper* vuelven a la fase lítica productiva. El genoma integrado es rescatado y se da la replicación viral y formación de nueva progenie viral. En la figura 8 se muestra un pequeño esquema del ciclo viral de los AAV.

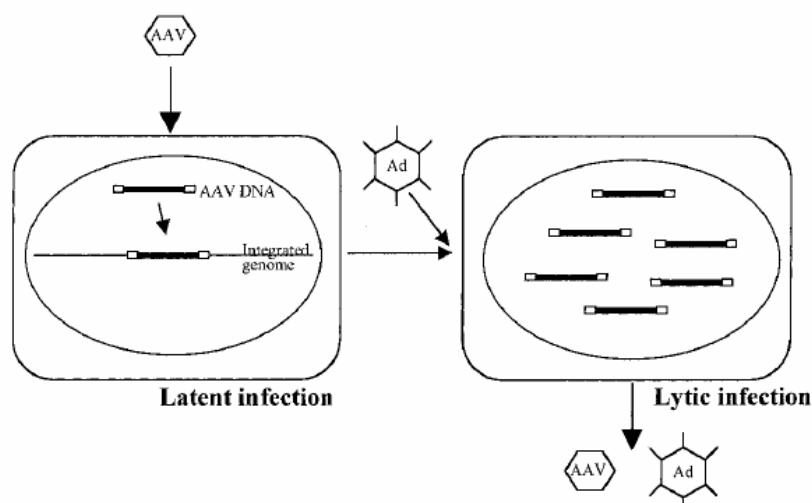


Figura 8. Ciclo viral del virus adeno-asociado. En ausencia de un virus *helper*, el genoma del AAV se integra específicamente en el cromosoma 19 humano, permaneciendo latente (latent infection). Al darse la coinfección con un virus *helper* el genoma es rescatado y se inicia la replicación viral, entrando en la fase lítica del ciclo y produciendo progenie viral de ambos virus (Lai et al., 2002).

8. Introducción Capítulo I

Las expectativas de buenos resultados en el campo de la viroterapia son muy elevadas. Sin embargo, la eficacia limitada en múltiples ensayos clínicos sugiere la necesidad de aumentar la potencia oncolítica de estos agentes (Russell et al., 2012). En este sentido, un adenovirus oncolítico potente debería ser capaz de liberar su progenie viral de la célula rápidamente e infectar las células próximas para poder propagarse por el tumor de forma eficaz.

La liberación de los adenovirus es bastante lenta, ya que ocurre en la fase tardía del ciclo viral, cuando la *Adenovirus Death Protein* (ADP) se acumula (Tollefson et al., 1996). Además también es ineficiente, ya que menos del 20% de la progenie viral se libera al medio tras dos días de infección. En este sentido, la liberación del virus es muy importante para la capacidad oncolítica de un adenovirus (Revisado en Gros and Guedán, 2010). Al aumentar la liberación del adenovirus provocamos una mayor y más rápida propagación del virus por el tumor y de esta forma conseguimos una mayor potencia oncolítica o capacidad de destrucción del tumor. Existen modelos matemáticos que incluyen factores de replicación de los adenovirus, crecimiento tumoral y efecto de la respuesta inmune que destacan la

liberación viral como un factor clave para conseguir un buen índice de eficacia (Wein et al., 2003). Múltiples estrategias han sido utilizadas para obtener mayor liberación adenoviral (Sautohoff et al., 2000; Ramachandra et al., 2001; Puig Saus et al., 2012). Por ejemplo delecionando la proteína E1B19K, o con una proteína del i-leader truncaada, o sobreexpresando la proteína ADP, se ha conseguido aumentar la liberación y más importante, la eficacia oncolítica, identificando por tanto la liberación de la progenie viral como un factor clave para aumentar la potencia de los adenovirus.

Han sido descritos varios serotipos de AAV, (Gao et al., 2004; Schmidt et al., 2006), cada uno de ellos con diferencias específicas de tropismo (Grimm et al., 2003; Müller et al., 2006). Las interacciones entre AAV (frecuentemente AAV2) y Ad (frecuentemente Ad2 y Ad5) han sido estudiadas a nivel de expresión génica, expresión de proteínas y producción viral total. La coinfección de Ad con AAV2 provoca una disminución de la expresión de genes y proteínas adenovirales de forma dosis dependiente. Además, no todos los transcritos ni todas las proteínas parecen estar afectadas con la misma intensidad (Timpe et al., 2006). Desde mediados del siglo XX, se ha descrito que la contaminación de stocks adenovirales con AAV se asocia a menores producciones totales de Ad (Hoggan et al., 1966, Carter et al., 1979). Por otra parte, los efectos de los AAV sobre la citotoxicidad inducida por los Ad siguen siendo confusos. Jing y colaboradores (Jing et al., 2001) describieron una disminución de la citotoxicidad inducida por infección de Ad al coinfectar con AAV2 en células HeLa. Al contrario, se ha descrito un aumento de la citotoxicidad, medida por la inducción de apoptosis y necrosis, en células A549 inducida por Ad al coinfectar con AAV (Timpe et al., 2007).

Un aumento de la citotoxicidad *in vitro*, podría conducir a un aumento de la potencia oncolítica de un Ad. En este sentido, quisimos saber cómo estos efectos de aumento de la citotoxicidad y disminución de la producción, podrían afectar a los adenovirus oncolíticos.

En este capítulo del trabajo hemos intentado determinar y clarificar los efectos de los AAV sobre la potencia oncolítica de los Ad, en concreto del ICOVIR15. Además hemos descrito un nuevo fenotipo adenoviral en presencia de un AAV que hasta la fecha nunca había sido

observado. Este fenotipo consiste en una calva de aparición temprana y mayor tamaño, junto con un aumento de la eficiencia de la liberación de la progenie viral, posible causa del anterior fenotipo. Hemos observado un aumento de la citotoxicidad y capacidad de propagación de ICOVIR15 *in vitro* y lo más importante, un aumento de la potencia oncolítica *in vivo*.

9. Introducción Capítulo II

El cáncer es una de las mayores causas de muerte en la población humana, pero también en la canina. En perros, al ser resistentes a los problemas cardiovasculares, el cáncer representa la primera causa de muerte (Patil et al., 2012; Hansen et al., 2004). Se estima que se producirán más de cuatro millones de nuevos diagnósticos de cáncer en perros cada año (Hansen et al., 2004).

La utilización del perro como modelo en viroterapia con adenovirus ha sido descrita como una buena alternativa a los modelos actuales. La generación espontánea de tumores, su evolución clínica similar a la de la clínica humana y la presencia de un sistema inmune totalmente competente fortalecen los argumentos a favor de la utilización de este modelo. Además la disponibilidad de un virus (CAV2) con características de patogenicidad, tropismo natural y capacidad de manipulación similares a los Ad2 y Ad5 humanos facilita su diseño y producción.

Otro aspecto importante es la falta de tratamientos adecuados para los pacientes de cáncer caninos. El desarrollo de adenovirus caninos oncolíticos beneficiará también a los pacientes caninos. La mayoría de tratamientos para el cáncer de perro provienen de la clínica humana y no han sido optimizados, siendo la mayoría s paliativos (Patil et al., 2012) y aproximadamente el 50% de los perros diagnosticados de cáncer con más de 10 años mueren por esta enfermedad (Hansen et al., 2004). Por tanto, el desarrollo de nuevas aproximaciones para el tratamiento del cáncer en perros y el mantenimiento de un nivel de

vida adecuado en términos de salud, es esencial para mantener a la medicina veterinaria a la cabeza de la investigación contra el cáncer.

Previamente, se ha generado en nuestro grupo el ICOVIR17 (Guedán et al., 2010), un adenovirus oncolítico basado en el Ad5, con buenos resultados preclínicos. Además, una versión mejorada de este virus está lista para entrar en fases clínicas en humanos. En este capítulo del trabajo, hemos desarrollado un adenovirus oncolítico canino, ICOCV17, basado en CAV2 y con características similares a ICOVIR17. También hemos generado dos adenovirus caninos parentales, CAV2RGD e ICOCV15, homólogos a sus versiones humanas AdwtRGD e ICOVIR15 (Dmitriev et al., 1998; Rojas et al., 2010). En los ensayos preclínicos *in vitro* los adenovirus caninos han mostrado bioactividad funcional de cada una de las mejoras realizadas en el genoma del CAV2. Los ensayos *in vivo* en ratones implantados con tumores xenógrafos caninos han evidenciado una ventaja en términos de potencia oncolítica para el ICOCV17. Además, cinco pacientes caninos han sido tratados con ICOCV17 mediante administración intratumoral.

Objetivos

El desarrollo de nuevos virus selectivos de célula tumoral y de mayor potencia que el adenovirus salvaje ha situado a la viroterapia como una de las aproximaciones más prometedoras en el campo de la terapia del cáncer. En el caso de los adenovirus, virus como ICOVIR17, además de cumplir estas características, disponen de herramientas adicionales que les permiten diseminarse por el tumor, superando los obstáculos causados por la presencia de matriz extracelular. Sin embargo, los resultados preclínicos en varios modelos muestran que aún hay margen para incrementar la potencia de estos agentes. A la vez, los resultados clínicos de otros candidatos han evidenciado una baja correlación terapéutica entre los modelos actuales y los pacientes humanos.

Este trabajo se ha centrado en el aumento de la potencia de los adenovirus oncolíticos, en concreto el ICOVIR15, mediante la combinación con virus adeno-asociados. Por otra parte, nos propusimos el diseño y generación de un virus oncolítico canino con las mismas características que ICOVIR17, para su uso en la clínica veterinaria y como modelo para la clínica humana con ICOVIR17.

Los objetivos concretos de este trabajo han sido:

- Determinar el papel que juegan los virus adeno-asociados al combinarlos con los adenovirus.
- Determinar el mecanismo por el cual se da un aumento de citotoxicidad al combinar los virus adeno-asociados con los adenovirus.
- Aplicar al campo de la viroterapia estos conocimientos con el fin de aumentar la potencia de los adenovirus oncolíticos.
- El diseño y la generación de un adenovirus oncolítico canino con características similares a ICOVIR17.
- Caracterizar in vitro los virus caninos generados y evaluar la toxicidad y eficacia terapéutica en modelos murinos.
- La aproximación a la clínica veterinaria de nuestro candidato canino. Tratamiento de pacientes caninos con diferentes tipos tumorales, evaluando los índices de seguridad, la toxicidad y la eficacia.

Material y Métodos

1. Técnicas de manipulación de bacterias

Con el fin de obtener cantidades suficientes de DNA en forma de plásmido para poder trabajar con él, es necesaria la amplificación de estos plásmidos en bacterias. Para ello, el plásmido debe contener un origen de replicación que le permita replicarse en la cepa de interés y un gen de resistencia a un antibiótico (Kanamicina o ampicilina normalmente) para poder seleccionar las bacterias e impedir contaminaciones. En este trabajo se ha utilizado la cepa DH5 α de *Escherichia coli*. Con el fin de poder amplificar los plásmidos, estos fueron introducidos en las DH5 α por transformación, una vez inducido el estado de competencia.

1.1. Preparación de bacterias competentes

Se conserva el stock madre de bacterias a -80°C en forma de glicerinado. Para inducir el estado de competencia se deja crecer toda la noche a 37°C en 10 ml de LB (1% Triptona, 0.5% de extracto de levadura, 0.5% NaCl) en un tubo falcon de 50 ml en agitación una pequeña alícuota obtenida por rascado del glicerinado con una punta estéril. Al día siguiente, los 10 ml de precultivo se crecen en 1L de LB a 37°C en agitación hasta obtener un cultivo con densidad óptica de 0.6-0.7 a 600nm de longitud de onda. La solución bacteriana se distribuye en botellas de 250 ml (aptas para el uso en la centrífuga SORVALL) y se conservan durante 40 minutos en un baño de agua y hielo para detener el crecimiento bacteriano. A partir de este momento la manipulación de las bacterias debe realizarse siempre a 4°C. Se centrifugan las bacterias a 4000 *g* durante 15 minutos a 4 °C en una centrífuga SORVALL. Se descarta el sobrenadante y el pellet bacteriano se lava con agua miliQ refrigerada a 4°C. Este proceso de centrifuga y lavado se repite tres veces, siendo la última resuspensión en 45 ml de agua con un 10% de glicerol. Se vuelve a centrifugar las bacterias por cuarta vez y se resuspenden en 3ml de agua con un 10% de glicerol. A continuación se mide la DO de una dilución 1/100 de la suspensión bacteriana a 600nm. La DO ha de ser similar a 1 (equivalente a 2.5×10^8 bacterias/ml). Finalmente, se realizan alícuotas de 50 μ l, congeladas inmediatamente en nieve carbónica y se almacenan a -80°C.

1.2. Transformación de las bacterias competentes por electroporación

Las alícuotas de bacterias competentes almacenadas a -80°C se descongelaban en hielo y se añadía una cantidad de ADN plasmídico de entre 10pg y 25ng en un volumen final de 2 μ l. Se incubaba la mezcla 5 minutos en hielo y se añadía a unas cubetas de electroporación previamente refrigeradas en hielo. Mediante el uso de un electroporador Electro Cell ManipulatorTM ECM 630 con las siguientes condiciones: 50 μ F, 1500 V i 125 Ω se electroporaban las bacterias. Con pulsos inferiores a 5 milisegundos la electroporación se daba por correcta. Acto seguido se resuspendían las bacterias en 300 μ l de LB y se incubaban 1 h en agitación a 37°C. La suspensión se plaquea en placas de LB con el antibiótico de elección.

1.3. Aislamiento de DNA plasmídico

Los protocolos usados en este trabajo para el aislamiento de DNA plasmídico se basan en un método de lisis alcalina con SDS a partir de cultivos de *E. coli* crecidos en LB con antibiótico. Se han realizado preparaciones de DNA a pequeña y gran escala.

1.3.1. Preparaciones a pequeña escala

Las minipreparaciones se han realizado siguiendo el protocolo descrito por Birnboim y Doly (Birnboim and Doly, 1979) que permite obtener preparaciones de entre 20 y 50 µg. El procedimiento a seguir se detalla a continuación.

Brevemente, se inocula una colonia crecida en una placa de LB con antibiótico en 2 ml de LB con antibiótico y se crece toda la noche. Al día siguiente se toma una alícuota de 1,5 ml y se centrifuga a 13000 rpm durante 1 minuto. Se resuspende el pellet con la ayuda de un vórtex en 200 µl de la solución 1 (25 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA, 50 mM glucosa) refrigerada a 4°C. Se añaden 200 µl de solución 2 (SDS 1%, NaOH 0,2 M), acabada de preparar, y se mezcla por inversión. Finalmente, se añaden 200 µl de la solución 3 (3 M acetato de potasio, 11,5% ácido acético) refrigerada y se invierte hasta que aparezca un precipitado blanco. La mezcla se incuba 5 minutos en hielo y se centrifuga a 15000 g durante 15 minutos. A continuación, se recoge el sobrenadante transparente y se mezcla con 2 volúmenes de etanol y se deja reposar 15 minutos a temperatura ambiente. Se precipita el DNA plasmídico por centrifugación a 15000g durante 10 minutos. El sobrenadante se descarta y el pellet se lava con etanol al 70%. Se vuelve a centrifugar 5 minutos a 15000 g, se descarta el sobrenadante y se deja secar el pellet. Finalmente, el DNA plasmídico se resuspende en 50 µl de TE con RNAsa (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 0,1 mg/ml RNAsa).

1.3.2. Preparaciones a gran escala

Con este tipo de preparaciones se obtienen grandes cantidades de DNA (≥ 100 µg) de gran pureza. Las maxipreparaciones se obtuvieron a partir de 200 ml de cultivo bacteriano mediante el *kit* comercial de Invitrogen “PureLink™ HiPure Plasmid Filter Purification Kits”, según las indicaciones del fabricante.

2. Técnicas de manipulación de levaduras

Todas las recombinaciones de este trabajo se han hecho en levaduras debido a su gran eficiencia. Como en el caso de las bacterias, para amplificar plásmidos en levaduras es necesario introducir los elementos necesarios para la replicación y un marcador de selección que esté mutado o delecionado en la cepa de levaduras a utilizar. En este trabajo, la secuencia CAL ha sido clonada en todos los plásmidos utilizados para la construcción de los adenovirus (Ad) recombinantes (Sikorski and Hieter, 1989). La secuencia CAL consta de un centrómero, un origen de replicación de levaduras o secuencia de recombinación autónoma (ARS), y el gen de la leucina. Los plásmidos obtenidos por recombinación homóloga son de bajo número de copias (1-3 copias por célula) y por tanto hay que amplificarlos en bacterias.

Por tanto es necesario que estos plásmidos también contengan los elementos necesarios para la replicación y selección en bacterias.

Las levaduras utilizadas en este trabajo pertenecen a la cepa *Saccharomyces cerevisiae* YPH857. Esta cepa ha sido modificada genéticamente para presentar mutaciones o deleciones en genes implicados en la síntesis de diferentes moléculas (ura3-53, lys2-801, ade2-101, his3-Δ200, trp1-Δ63, leu2-Δ1cyh2R). Estas mutaciones permiten la selección condicionada a la inclusión en el medio o mediante un plásmido de uracilo, lisina, adenina, histidina, triptófano y leucina.

Las recombinaciones homólogas se realizaron mediante la transformación de los dos DNAs de interés linearizados en levaduras a las que previamente se les había inducido el estado de competencia. Las homologías necesarias para la recombinación entre los dos fragmentos de forma eficiente son de 40 pares de bases en cada extremo.

2.1 Preparación de levaduras competentes

El preparado madre de la cepa YPH857 se conserva en forma de glicerinado a -80°C. Se rasca el glicerinado con una punta de pipeta estéril y se dibuja una estría en una placa de agar con medio rico para el crecimiento de levaduras (YPDA⁺⁺). Se dejan crecer durante 3 días a 30°C y la placa se guarda durante un periodo máximo de dos semanas a 4°C.

Para inducir competencia a las levaduras, se pica una colonia de la placa de YPDA⁺⁺ y se crece toda la noche en 5 ml de YPDA⁺⁺ líquido a 30°C, en agitación a 200 rpm. Al día siguiente, se mide la DO de una dilución 1/10 del cultivo (DO₆₀₀=1 equivale a 1.5×10^7 levaduras/ml) y se prepara una suspensión de levaduras de DO=0.15 en un volumen de 50 ml (DO₆₀₀= 0,15 equivale a 2.25×10^6 levaduras/ml). Se deja crecer a 30°C en agitación de 200 rpm hasta obtener una DO₆₀₀= 0.4 a 0.9 (aproximadamente 5 h). A continuación, la suspensión se traspara a un falcon de 50 ml y se centrifuga a 3000g durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se descarta el sobrenadante y se lava con 25 ml de agua MiliQ autoclavada. Se vuelve a centrifugar en las mismas condiciones, descartando el sobrenadante otra vez. El pellet se resuspende en 1 ml de agua y la suspensión se pasa a un eppendorf de 1,5 ml para centrifugar 30 segundos a 6500 g en una microcentrífuga. Se descarta de nuevo el sobrenadante y el pellet se vuelve a resuspender en agua en un volumen final de 1 ml. A partir de esta suspensión se hacen alícuotas de 100 μl (10^8 células) y se centrifugan durante 30 segundos a 6500 g. Se descarta el sobrenadante y el pellet de levaduras ya está disponible para ser transformado con DNA. Las levaduras competentes deben ser frescas y debe realizarse este proceso el mismo día de su utilización.

2.2. Transformación de levaduras por el método LiAc/SS-CARRIER DNA/PEG

Este método se describió en 2002 por Daniel Gietz y Robin A. Woods (Gietz and Woods, 2002). Se basa en la desestabilización de las membranas por el acetato de litio y en la utilización de DNA de cadena simple (SS-carrier DNA) para bloquear posibles zonas repetidas donde se podría unir de forma inespecífica el DNA para transformar. El DNA se introduce mediante un choque térmico.

Inicialmente se hierve el DNA de cadena simple (DNA de espermatozoos de salmón) durante 5 min a 95°C. A continuación para cada transformación se prepara una mezcla de:

- PEG (50% en peso/volumen)	240 µl.
- Acetato de litio (1M)	36 µl.
- ADN de espermatozoos de salmón (10mg/ml)	10 µl.
- Plásmidos de ADN + H ₂ O milliQ	74 µl.

La cantidad de ADN para la recombinación será de unos 100 ng de inserto y unas 10 veces menos de cantidad en moles del vector al que queremos introducirle el inserto. La mezcla se añade al pellet de levaduras preparado anteriormente, se mezcla con la ayuda de un vórtex y se incuba 40 min a 42°C. Se centrifuga la mezcla 30 s a 6500 g y se elimina el sobrenadante. El pellet de levaduras se resuspende en 100 µl de agua y se plasmifica en una placa de agar con medio SC Leu-. Se incuban las placas a 30°C durante dos días hasta que aparezcan colonias que corresponderán teóricamente a los plásmidos recombinados.

2.3. Aislamiento del DNA plasmídico

Mediante cultivos de levaduras crecidos a partir de una colonia durante 20 h a 30°C y 200 rpm en 2 ml del medio de selección líquido SC Leu- se procedió a obtener el plásmido objetivo. Se traspasa 1,5 ml de cultivo a un eppendorf de 1,5 ml y se centrifuga durante 5 segundos a máxima velocidad. Se descarta el sobrenadante y el pellet de levaduras se resuspende en 400 µl de una solución de: 2% Tritón-X100, 1% SDS, 0,1 M NaCl, 10mM Tris-HCl pH 8.0 y 1mM EDTA. A continuación se añaden 400 µl de fenol-cloroformo y 0,3 g de bolas (glass beads unwashed, Sigma). La mezcla se mezcla durante 2 min en un vórtex vertical a 4°C y se centrifuga a 15000 g durante 5 min. Se traspasa el sobrenadante a un nuevo eppendorf y el DNA plasmídico se precipita con 2 volúmenes de acetato sódico al 2% de etanol durante 30 min a -20°C. Se centrifuga a 16500 g por 20 min a temperatura ambiente, se descarta el sobrenadante y el pellet se lava con etanol al 70%. Finalmente el pellet de DNA se resuspende en 40 µl de agua.

Con el fin de amplificar el DNA obtenido de la recombinación en levaduras se transforman 2 µl de la minipreparación en la cepa bacteriana DH5α por el método de electroporación.

3. Cultivos celulares

En este trabajo se han utilizado líneas humanas, de perro, de origen murino y también de hámster. En ambos capítulos se han utilizado células no tumorales inmortalizadas (HEK293 y DKCre) para el trabajo con Ad y AAV y células tumorales de las especies antes citadas junto con células caninas normales (DEK) para los ensayos *in vitro* e *in vivo*. En la Tabla 1 se indican las líneas utilizadas y su origen. A continuación se incluye un breve resumen de las características de las líneas utilizadas.

Tabla 1. Líneas celulares usadas en este trabajo.

Línea celular	Origen
HEK293	Riñón embrionario humano
A549	Carcinoma de pulmón humano
NP9	Adenocarcinoma pancreático humano
HP-1	Carcinoma pancreático de hámster
Amel-3	Melanoma de hámster
HAPT-1	Carcinoma pancreático de hámster
Kln	Carcinoma de pulmón ratón
CMT64	Carcinoma de pulmón ratón
DKCre	Riñón embrionario canino
CML1	Melanoma canino
17CM98	Melanoma canino
Abrams	Osteosarcoma (OS) canino
D17	Metástasis pulmonar OS canino

Líneas humanas

Células HEK293

Las células HEK293 derivan de células embrionarias de riñón humano. Estas células han sido transformadas con el 11% del extremo izquierdo del genoma del adenovirus, incluyendo el gen E1. Las células HEK293 son altamente permisivas a la infección y crecimiento de los Ad al igual que son fácilmente transfectables por el método del fosfato cálcico. Son células empaquetadoras y se utilizan para la generación, amplificación y titulación de los Ad humanos. También son utilizadas para la generación de los AAV.

Líneas tumorales

La línea de carcinoma de pulmón A549, se utilizó para amplificar los Ad humanos debido a su gran eficiencia de producción. Fue obtenida en la ATCC (American Type Cell Culture). La línea NP9 fue establecida en el Servei Digestiu del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona y fueron cedidas por el Laboratori d'Investigació Gastrointestinal del mismo hospital (Villanueva et al., 1998).

Líneas murinas o de hámster

Líneas tumorales

Las líneas de hámster HAPT-1 y Amel-3 fueron cedidas por el doctor R. Hernández-Alcoceba, del CIMA de Pamplona. Las líneas Kln y CMT64 fueron cedidas por el doctor Stephan Kubicka (Hannover Medical School, Hanover, Alemania). La línea kln fue seleccionada durante varios pases en nuestro grupo con el fin de obtener un clon con mayor permisividad a la replicación adenoviral, este clon se denominó pKln. La línea HP1 fue amablemente cedida por el doctor Michael A. Hollingsworth (Universidad de Nebraska, USA).

Líneas caninas

Células DkCre

Las células DKCre (Kremer et al., 2000) fueron cedidas por el doctor Eric Kremer (Instituto de Genética Molecular de Montpellier, CNRS 5535, Montpellier, Francia; Universidad de Montpellier, Montpellier, Francia).

Las células DKCre contienen la región E1 del CAV2 integrada en su genoma, con la región E1A bajo el control del promotor del citomegalovirus (CMV) y la región E1B bajo el control de su propio promotor. Son células empaquetadoras y se utilizaron para la generación, amplificación y titulación de los Ad caninos de este trabajo.

Líneas normales

Las células DEK (Dog Epidermal Keratinocytes) son queratinocitos de origen epidérmico, obtenidas de CELLnTEC (CELLnTEC Advanced Cell Systems AG, Bern, Switzerland). Una vez llegan a confluencia, estas células entran en un proceso de diferenciación hacia queratinocitos maduros, expresando marcadores de diferenciación desde día 11 y quedando arrestadas (kolly et al., 2005).

Líneas tumorales

La línea D17 fue obtenida de la ATCC (*American Type Cell Culture*). Las líneas Abrams, CML1 y 17CM98 fueron amablemente cedidas por el doctor David Vail (School of Veterinary Medicine, University of Wisconsin-Madison, Wisconsin, USA).

3.1. Condiciones de cultivo de las líneas celulares

Todas las líneas celulares utilizadas en este estudio crecen formando una monocapa con morfología epitelial adherida al soporte sólido en el cual se cultivaron. Las líneas celulares, excepto DEK, se mantuvieron con DMEM (*Dulbecco's Modification of Eagle's Medium*, Gibco BRL) suplementadas con suero fetal bovino (FBS, Gibco BRL), previamente inactivado en un baño húmedo durante 30 min a 56°C, al 5%. A los medios de cultivo se les agregaron una mezcla de los antibióticos penicilina y estreptomycin (Gibco BRL), a 100 U/ml y 100 µg/ml, respectivamente, en una proporción 1:100. En el caso de las DEK, el medio utilizado fue el CNT-09 obtenido de CELLnTEC (CELLnTEC Advanced Cell Systems AG, Bern, Switzerland). En todos los casos, el medio se renovó cada 2-3 días por aspiración del medio viejo y adición del medio nuevo. Las células se mantuvieron en un incubador humidificado a 37°C en una atmósfera al 5% de CO₂.

3.2. Recuento celular

Para determinar el número de células de un cultivo y sembrar la cantidad deseada, las células se tripsinizaron (Trypsina-EDTA de Gibco BRL) y se resuspendieron en DMEM al 5% FBS. De la suspensión celular se tomó una alícuota y se realizó una dilución con el colorante Azul de Tripano, de manera que se pudiesen contar entre 10 y 100 células por cada cuadrante de la cámara de Neubauer o hemocitómetro. El Azul de Tripano penetra en el interior de las células sólo cuando la membrana celular se encuentra deteriorada. Para el recuento de las células viables en una solución celular, se contaron las células viables presentes en cada uno de los cuadrantes de la cámara de Neubauer y se hizo una media. El número de células por ml se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{N}^{\circ} \text{ células/ml: Media del n}^{\circ} \text{ de células viables por cuadrante} \times \text{dilución} \times 10^4$$

Este cálculo permitió determinar la concentración y el porcentaje de viabilidad del cultivo celular. Finalmente, las células se resuspendieron con el medio necesario para llevar las células del cultivo a la concentración deseada.

3.3. Congelación y descongelación de las líneas celulares

Para la criopreservación de las células, éstas se tripsinizan y luego se lavan dos veces con PBS y se cuentan como se ha indicado en el apartado anterior.

Las células se llevan a una concentración de entre 5 y 20 millones de células por ml en medio de congelación. El medio de congelación contiene un 90% de FBS inactivado (Gibco BRL) y un 10% del agente crioprotector DMSO (Di-metil-sulfóxido, Sigma).

La suspensión celular se distribuye a razón de 0.5 ml por criotubo y los viales se congelan en un tanque de alcohol isoamílico, que colocado a -80°C disminuye la temperatura

progresivamente. A partir de las 4h, las alícuotas se pasan a los tanques de nitrógeno líquido para ser almacenadas.

Para la descongelación, las células se pasan del tanque de nitrógeno líquido a un baño a 37°C para que la descongelación sea rápida. La suspensión celular se pasa a un falcon de 15 ml y se centrifuga 5 min a 750-1000g. El medio de congelación se retira por aspiración y las células se resuspenden con el medio de cultivo adecuado a cada una de las líneas celulares a 37°C. A las 24h las células están mayoritariamente adheridas y se realiza un cambio de medio para eliminar las células muertas.

3.4. Control de micoplasma en las líneas celulares en cultivo

La contaminación por micoplasma pasa visualmente desapercibida en los cultivos, pero puede afectar los resultados experimentales. La prueba de micoplasma se realizó de forma rutinaria en todas las líneas celulares en cultivo. Esta prueba se basa en la detección del microorganismo por PCR con los cebadores MICO-1 y MICO-2 (Tabla 2).

Tabla 2. Secuencia aminoacídica de los cebadores utilizados para la detección de micoplasma

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

Brevemente: para la realización de la PCR se partió del medio de cultivo de las células cuando pasaron al menos 3 días de cultivo en situación de sobre-confluencia y en ausencia de antibióticos. Si por PCR se detectó la presencia de micoplasma, la prueba se dio por positiva y se procedió a la desmicoplasmatización de las células con PlasmocinTM. Después del tratamiento, se realizó nuevamente la prueba para confirmar la eliminación.

4. Adenovirus recombinantes

4.1. Construcción de los Adenovirus caninos recombinantes

Todos los Ad generados en este trabajo fueron obtenidos por recombinación homóloga en levaduras de la cepa YPH857. El proceso para la construcción de estos Ad se compone de dos pasos: primero generación de un inserto obtenido por PCR o síntesis directa, que contiene las modificaciones que queremos introducir en el genoma. Los cebadores utilizados se resumen en la Tabla 4. Posteriormente se recombina este inserto con el plásmido objetivo linearizado. Una vez obtenemos un plásmido con el genoma viral y las modificaciones deseadas, el paso final consiste en liberar el genoma del soporte de DNA que permite la replicación en bacterias y levaduras mediante una digestión con Not I. El genoma viral liberado se transfecta en las células DKCre para la generación del adenovirus.

A continuación, se describen los pasos seguidos para la construcción de cada uno de los virus y plásmidos que han sido generados en este trabajo (Esquema 1).

Esquema 1. Generación de los adenovirus caninos

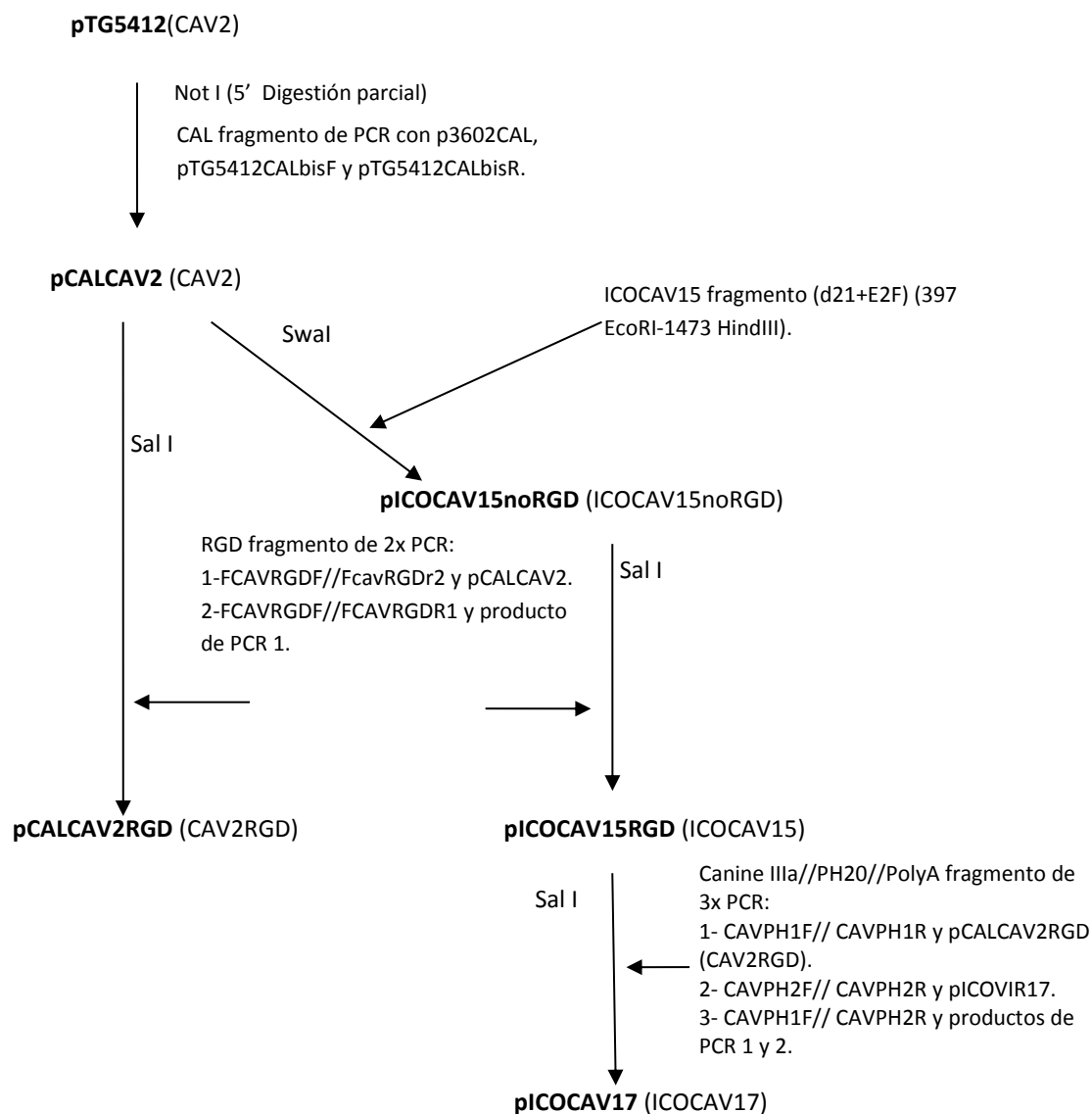


Tabla 3. Descripción de los adenovirus utilizados en este trabajo

Nombre	Promotor E1A	E1A	Fibra	Transgén	Origen	Especie
Adwt	wt	wt	Wt	-	-	Humana
ICOVIR-15	wt +4 E2F +1 Spl	$\Delta 24$	RGD en HI-loop	-	(Rojas et al., 2010)	Humana
CAV2	wt	wt	Wt	-	-	Canina
CAVGFP	-	-	Wt	GFP	(Kremer et al., 2000)	Canina
CAV2RGD	wt	wt	RGD en HI-loop	-	Este trabajo	Canina
ICOCav-15 noRGD	wt +4 E2F +1 Spl	$\Delta 21$	Wt	-	Este trabajo	Canina
ICOCav-15	wt +4 E2F +1 Spl	$\Delta 21$	RGD en HI-loop	-	Este trabajo	Canina
ICOCav-17	wt +4 E2F +1 Spl	$\Delta 21$	RGD en HI-loop	PH20	Este trabajo	Canina

El CAV2 (GenBank U77082) fue obtenido de la ATCC (American Type Culture Collection, VR-800). CAV-GFP (Kremer et al., 2000) fue amablemente cedido por el Dr. Eric Kremer, del Instituto de Genética Molecular de Montpellier, CNRS 5535, Montpellier, Francia; y de la Universidad de Montpellier, Montpellier, Francia. En el CAV-GFP la región E1A fue sustituida por el casete de expresión de la proteína verde fluorescente (GFP) bajo el control del promotor del Citomegavirus (CMV).

4.1.1. Construcción del plásmido pCAL-CAV2

pCAL-CAV2 contiene el genoma del CAV2 y los elementos necesarios para la replicación y selección tanto en bacterias como en levaduras. pCAL-CAV2 se construyó a partir del pTG5412 que fue cedido amablemente por el Dr Eric Kremer (Instituto de Genética Molecular de Montpellier, CNRS 5535, Montpellier, Francia; Universidad de Montpellier, Montpellier, Francia). pTG5412 contiene el genoma del CAV2 y los elementos necesarios para la replicación en bacterias.

Para construir el pCAL-CAV2, se amplificó el CAL (Sikorski et al., 1989) introduciendo en 3' y 5' dos secuencias de homología con pTG5412 de 40 pb cada una. Se utilizaron los cebadores pTG5412CALbisF y pTG5412CALbisR (Tabla 4) y un plásmido que contenía el CAL.

Posteriormente se linearizó el pTG5412 mediante digestión parcial con Not I. Mediante recombinación homóloga entre ambas moléculas de DNA se creó el pCAL-CAV2.

4.1.2. Construcción del Adenovirus canino CAV2RGD

Para construir el virus canino con RGD en el *Hi-loop* (Tabla 3), se realizaron dos reacciones de PCR para generar el inserto con el motivo RGD en la fibra. En la primera reacción se utilizaron los cebadores FCAVRGDF y FCAVRGDr2 para introducir el motivo RGD y la homología en 3' y el plásmido pCAL-CAV2 como molde. En la segunda reacción se utilizaron los cebadores FCAVRGDF y FCAVRGDr1 para introducir la homología en 5' y el producto de la primera reacción como molde. Se linearizó el pCAL-CAV2 utilizando la diana única Sal I y se recombinó con el producto de la segunda PCR para generar el pCAL-CAV2RGD.

4.1.3. Construcción del Adenovirus canino ICOCV15 e ICOCV15noRGD

Para la modificación del promotor endógeno de E1A, se diseñó un fragmento que contenía cuatro lugares de unión para el factor de transcripción E2F (subrayado), un lugar de unión a Sp-I (subrayado y cursiva) y una diana Pme-I (negrita) (5'-TCGGCGGCTCGTGGCTCTTTGGCGGCAAAAAGGATTTGCGCGTAAAAGTGGTTGGAAGTACTCGGCGGCTCGTGGCTCTTTGCGGCAAAAAGGATTTGCGCGTAAAAGTGGACAGTTGTTTAAACCGA CCACAAACCCCGCCCAGCGTCTTGTCATTGGCGTCGA - 3') después del nucleótido 403 del genoma del CAV2, además contenía una delección de 21 pares de bases (nucleótidos 818-838). Este fragmento fue clonado en el pUC57 flanqueado por dos dianas XmaI por GenScript Corp. Para linearizar el pCAL-CAV2RGD o el pCAL-CAV2 (para generar ICOCV15 o ICOCV15noRGD respectivamente) se utilizó la diana única Swa I. Mediante recombinación homóloga se generó el pICOCV15 y el pICOCV15noRGD.

4.1.4. Construcción del Adenovirus canino ICOCV17

Para generar el ICOCV17, se realizaron 3 reacciones de PCR para introducir las regiones de homología en 3' y 5', el aceptor de corte de la proteína IIIa canina (IIIaSA), y el DNAC de la hialuronidasa humana PH20 con una señal polyA. Primero utilizando los cebadores CAVPH1F y CAVPH1R se introdujo la secuencia homóloga 5' y el IIIaSA cuya secuencia es (5'-GGCCGGCCCTATGAGGAAGAGGAGAACCTGATGGCTCCGTCTCATTTCAACAGC - 3') utilizando como molde el pCAL-CAV2RGD. Después utilizando los cebadores CAVPH2F y CAVPH2R y, un plásmido que contenía la PH20 como molde, se amplificó el DNAC de la PH20, la secuencia polyA y la secuencia homóloga en 3'. Finalmente, ambos productos (PCR 1 y 2) se unieron utilizando los cebadores CAVPH1F y CAVPH2R. El fragmento final se recombinó con el pICOCV15 digerido con Sal I.

Tabla 4. Cebadores utilizados para los clonajes

Nombre	nt	Secuencia (5'→3')
pTG5412CALbisF	73	CCCAAATTTAAGCCACACTCTTTGTCCTGTATATTATTGATGATGCGGCCGCACCTGGGTCCTTTTCATCA C
pTG5412CALbisR	60	GAGAGCTCGATATCGCATGCGGTACCTCTAGTCGAGGCCGCATCTGTGCGGTATTTTACACA
FCAVRGDF	40	CAAGTTAGCCTCCAAGTAGGCTCGGGTCTCACCGTGATTA
FCAVRGDr2	43	GCAGAAACAGTCTCCGCGGCAGTCACAGCCTTTTGTTTGTTA
FCAVRGDr1	57	GTAAAGTTTAAAAACCTAAAGGTAAGGGTGTAAGTGGAACGCAGAAACAGTCTCC
CAVPH1F	20	CGCCGCCACCATCTCCCGCT
CAVPH1R	70	GCTGTTGAAATGAGACGGAGCCATCAGGGTTCTCTCTCTCATAGGGCCGGCCCTATTTTTTCTGG
CAVPH2F	39	CCGTCTCATTTCAACAGCATGGGAGTGCTAAAATTCAAG
CAVPH2R	59	GCCTTACCGCTCGCGTGTATGAAAAATAAGCTTTTAAATTTATTAAGATAGTGTGGAG

4.2. Generación de adenovirus recombinantes por transfección con fosfato cálcico

Una vez obtenemos los plásmidos correctos se deben introducir linealizados en células especializadas (HEK293 o DKCre) para iniciar el ciclo viral y que se genere el Ad. Una vez en el interior de la célula empaquetadora, el DNA viral recombinante activa la replicación del DNA y la transcripción de proteínas de la cápside. Este DNA viral se encapsidará dando lugar a nuevos virus (progenie viral), que se liberará al medio extracelular. Una vez generado el Ad recombinante, se amplificará por sucesivas rondas de propagación en las células y condiciones adecuadas. A continuación se describe detalladamente el procedimiento a seguir para la generación de adenovirus recombinantes una vez tenemos los genomas insertados en un plásmido.

El genoma viral recombinante se libera de la construcción plasmídica por digestión con el enzima de restricción PacI (Ad humanos) o NotI (Ad caninos) y se transfecta en células HEK293 (Ad humanos) o DKCre (Ad caninos) por el método del fosfato cálcico.

Lo primero es obtener una monocapa de células al 60% en el momento de la transfección. Para cada pozo de células se prepara una mezcla que contiene:

- 19,5 µl de cloruro cálcico 2 M.
- 3 µg de DNA.
- H₂O bidestilada filtrada, hasta un volumen final de 162 µl.

Se mezcla pipeteando durante 10 seg con suavidad. En otro eppendorf de 1,5 ml se añaden 162 µl de la solución HBS 2X (NaCl 274 mM, HEPES 50 mM, fosfato sódico 1,5 mM en H₂O, pH ajustado a 6,95 - 7 con NaOH). Con la ayuda de una pipeta se airea creando burbujas mientras se añade la mezcla que contiene el DNA gota a gota y durante 5-10 seg más. Se deja reposar 1 min y se añade a las células agitando suavemente para favorecer la

homogeneidad. Los precipitados son visibles 4 horas después de la transfección. A las 16-24 horas se cambia el medio (opcional en las DKCre) por medio nuevo.

Al generarse un Ad recombinante se observará un efecto citopático localizado en forma de cometa a los 6 - 7 días post transfección (en las DKCre no es tan evidente). En ese momento se recogen las células junto al sobrenadante y se somete a tres ciclos de congelación y descongelación para liberar las partículas virales del interior de las células. De esta manera se obtiene un lisado inicial o pase 0. A partir de este pase 0 amplificaremos el virus mediante sucesivas rondas de replicación.

4.3. Selección de clones de adenovirus recombinantes mediante el ensayo de formación de calvas

Con el objetivo de disponer de un stock homogéneo de cada uno de los virus, se obtuvieron clones aislados mediante el ensayo de formación de calvas. Este ensayo se realizó en las células A549 (Ad humano) o DKCre (Ad canino). Una vez aislados los clones se caracterizaron y los clones correctos se amplificaron para usarlos en ensayos *in vitro* e *in vivo*. El ensayo de formación de calvas se basa en la infección de una monocapa celular con un banco de diluciones del lisado inicial de adenovirus. Posteriormente, se cubre la monocapa de células infectadas con una matriz de agarosa, que permite el intercambio de gases y de nutrientes con el medio pero no permite la difusión de la progenie viral, de esta forma los viriones liberados de la primera infección sólo pueden infectar las células vecinas. Las calvas se forman después de sucesivas rondas de replicación de los adenovirus.

Brevemente, se prepara un banco de diluciones seriadas (10^4 a 10^9) a partir del lisado inicial en medio DMEM al 5% de suero fetal bovino inactivado (FBS). Con 1 ml de la dilución se infecta un pocillo de una placa de 6 pocillos (6mm de diámetro) de células A549 ó DkCre al 80-90% de confluencia y se deja durante 4-6 horas. Se retira el medio de infección y se agregan 2 ml de una solución estéril de agarosa y medio (1:1), previamente preparada a partir de una solución de agarosa al 1% a 56°C y el medio DMEM suplementado con un 10% de FBS, antibióticos y atemperada a 37°C. El medio con la agarosa se deja solidificar durante 30 min a temperatura ambiente y a continuación se agregan 2 ml de medio DMEM al 5% de FBS sobre la matriz de agarosa. Las placas se dejan en el incubador hasta que a los 5-7 días se comienzan a ver las primeras calvas virales, cada una correspondiente a un clon diferente. Con el objetivo de obtener las calvas, se retira el medio líquido que hay sobre la agarosa y se perfora la agarosa con una punta de pipeta de 200 µl. Las calvas se aspiran con la pipeta y se resuspenden en 500 µl de DMEM.

Para comprobar la identidad del adenovirus recombinante, se infecta una placa de 100mm para la obtención del DNA viral por el método de Hirt's y se caracteriza, tal y como se detalla a continuación.

4.4. Amplificación y purificación de los adenovirus

La amplificación y purificación de Ad permite la obtención del virus en una cantidad suficientemente grande y en una formulación adecuada como para ser utilizado en los ensayos *in vitro* e *in vivo*.

La amplificación de Ad se basa en la propagación del virus en placas de cultivos cada vez más grandes y en mayor cantidad.

La purificación de Ad se basa en la separación de los virus producidos por el cultivo celular, mediante ultracentrifugación en un gradiente de cloruro de cesio. A continuación se describen ambos métodos:

4.4.1. Amplificación de adenovirus

Para amplificar los Ad humanos se utilizó la línea A549 y para los caninos la línea DKCre. Para la amplificación de Ads recombinantes, se parte de un clon aislado en el ensayo de formación de calvas, amplificado por sucesivas infecciones de placas cada vez más grandes. En condiciones normales de propagación, con el lisado celular se pueden infectar 10 placas de la misma medida de la cual provienen. Una vez obtenidas dos placas de 150 mm de diámetro infectadas con adenovirus recombinante, ya se tuvo un extracto celular con suficiente cantidad de virus para realizar todos los experimentos *in vitro*. Para realizar los experimentos *in vivo*, se continúa la amplificación viral hasta obtener 10-20 placas de 150 mm de diámetro infectadas.

Cuando las células estuvieron a una confluencia del 80% se infectan con 10 m.o.i. (unidades formadoras de calva por célula o multiplicidad de infección). La infección se realiza a partir de un virus purificado o de un lisado celular. Después de una incubación de 48 a 72 horas a 37°C al 5% de CO₂, el efecto citopático es evidente en el 95-100% de las células. Una vez el 80% de las células se desprende de la placa se recoge el pellet y se almacena a -80°C.

En la amplificación final, previa a la purificación del adenovirus, las células se recogen cuando el 90-100% de las células en cultivo presentaron un efecto citopático evidente. En ese momento se recogen las células y el sobrenadante de cada una de las placas y se centrifugan en tubos de 50 ml, tipo falcon, durante 5 min a 750-1000g. Se guardan 40 ml de sobrenadante y el resto se descarta por aspiración. Los pellets celulares de las diferentes placas se juntan en uno solo y se resuspenden en un volumen final de unos 20 ml y se almacenan a -80°C hasta su purificación.

4.4.2. Purificación de adenovirus

Los adenovirus se purifican con la finalidad de obtener un stock de virus en una formulación adecuada para ser administrada a los ratones y concentración máxima.

El método utilizado en este trabajo para la purificación de los adenovirus se basa en la ultracentrifugación de un gradiente de densidades hecho con diferentes concentraciones de cloruro de cesio (CsCl). Este método permite la separación de las partículas virales del resto de los elementos presentes en el lisado celular -como son las cápsides virales vacías o los restos celulares- y concentrar las partículas virales. La eliminación del CsCl se hace posteriormente por diálisis contra el tampón deseado.

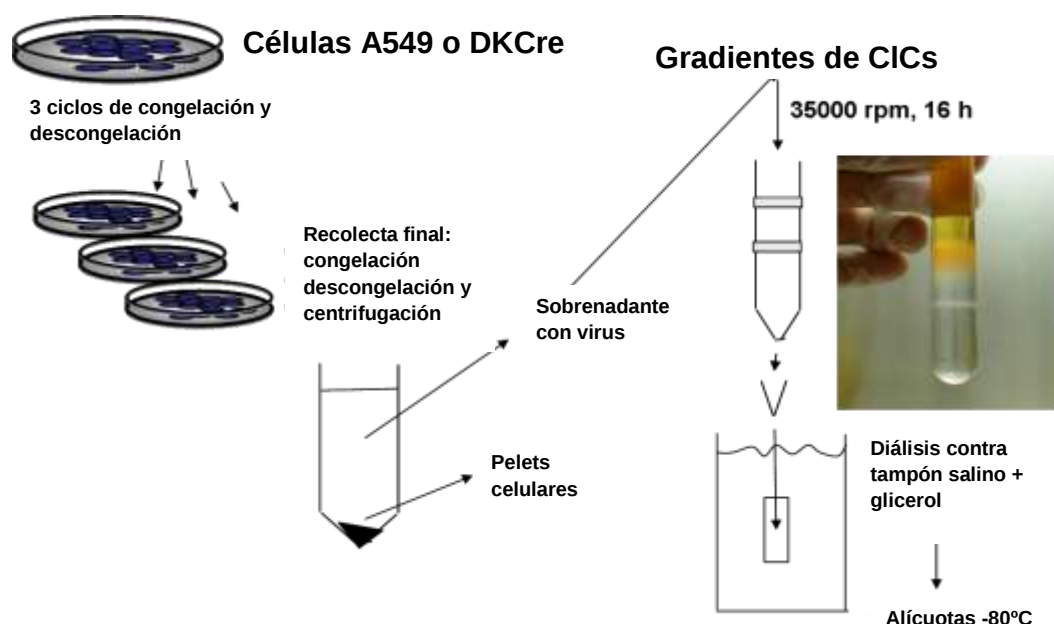


Figura 1. Esquema del proceso de purificación viral. La fotografía muestra un tubo de ultracentrífuga con el gradiente de cloruro de cesio discontinuo y el extracto celular clarificado (CEC) después de la primera ultracentrifugación. La banda blanca corresponde a las cápsides virales.

Brevemente, para liberar las partículas virales del interior de las células, a los pellets celulares provenientes de la amplificación viral, se les somete a tres ciclos de congelación (-80°C) y descongelación (37°C). Posteriormente, el extracto viral lisado se centrifuga en tubos de 50 ml, tipo falcon, durante 5 min a 750-1000g para precipitar los restos celulares. El sobrenadante es lo que llamamos extracto celular clarificado (CEC, *Cell Extract Clarified*), que contiene los adenovirus para purificar posteriormente. El CEC se carga sobre el gradiente de CsCl para la separación de las partículas adenovirales de los restos de cultivo celular.

El gradiente de CsCl se compone de:

- Solución A: 1.5 mg/ml CsCl en PBS.
- Solución B: 1.35 mg/ml CsCl en PBS.
- Solución C: 1.25 mg/ml CsCl en PBS.

El gradiente de densidad de cloruro de cesio se prepara en 4-6 tubos de ultracentrífuga (Beckman). Para formar el gradiente se agregan las siguientes cantidades de soluciones:

- 1^{ero} 0.5 ml solución A.
- 2^{do} 2.5 ml solución B.
- 3^{ero} 2.5 ml solución C.

Después de hacer el gradiente de CsCl, se agregan 7 ml del CEC en cada tubo ajustando el peso con sobrenadante, guardado durante la recolección del virus durante el proceso de amplificación viral, hasta un volumen final de 12.5 ml por tubo.

Los tubos se centrifugan durante una hora a 10°C a 150.000 g [35.000 rpm (rotor SW41, Beckman)]. En estas condiciones, las partículas virales se separan de los restos celulares y se

concentran en un punto del gradiente de densidad correspondiente a la densidad de la partícula viral (1.32g/ml para el hAd y 1.22 g/ml para el CAV2). Es frecuente que aparezcan dos bandas blanquecinas que corresponden al virus. Las cápsides vacías quedan en la banda superior y se descartan por aspiración junto con los restos celulares. En la banda inferior quedan las cápsides virales llenas que se retiran con pipeta y se someten a una segunda ultracentrifugación, esta vez en un gradiente de CsCl continuo.

Para la segunda ultracentrifugación de los hAd los tubos de ultracentrifugación se llenan con las bandas de virus obtenidas y se mezclan con una solución de 1.35 mg/ml de CsCl. Para los virus caninos los tubos de ultracentrifugación se llenan con las bandas de virus obtenidas y se mezclan con una solución de 1.3 mg/ml de CsCl (mezcla 1:1 de la solución de 1.35 mg/ml y de la solución de 1.25 mg/ml). Se centrifuga durante 16 horas a 10°C a 150.000 g (35.000 rpm, rotor SW41, Beckman).

Al final de la segunda centrifugación se obtiene una banda blanquecina que corresponde al adenovirus. La banda se retira con una pipeta y se introduce en una membrana de diálisis previamente equilibrada en 500 mL de agua miliQ autoclavada durante 30 min. Se dializa en un volumen de 500 ml de PBS⁺⁺ a 4°C en agitación durante 2 horas. Se cambia el tampón de diálisis y se deja dos horas más en las mismas condiciones. En el tercer y último cambio del tampón PBS⁺⁺ se complementa con glicerol a una concentración final de entre 2.5 y 5%, para conservar el virus alícuotado a -80°C.

5. Técnicas empleadas para titular adenovirus

5.1. Determinación de las partículas víricas por espectrofotometría (vp/ml)

Este protocolo se basa en la determinación de la absorbancia del DNA viral a una longitud de onda de 260 nm, lo que nos permite determinar el número de partículas virales (vp) totales de un stock viral purificado sin discriminar entre partículas virales infectivas y defectuosas.

Se prepara una dilución del stock viral purificado, 5 µl, en 95 µl del tampón de lisis (Tris 10mM, EDTA 1mM, 0.1% SDS, pH 8.0). La mezcla se incuba durante 5 min a 56°C y se mide la densidad óptica en el espectrofotómetro a las longitudes de onda de 260 nm y 280 nm. La concentración final se calcula teniendo en cuenta que el coeficiente de extinción del virus es de 1.1×10^{12} por cada unidad de DO.

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

La ratio entre la absorbancia de la muestra a 260 nm y 280 nm, da una idea de la pureza de la muestra purificada. Óptimamente debe de estar alrededor de 1.4.

5.2. Determinación de las partículas víricas por PCR a tiempo real (vp/ml)

Este protocolo se basa en la determinación de genomas virales en una muestra por amplificación del DNA por PCR a tiempo real. El número de copias de genomas virales se cuantificó en relación a una curva patrón realizada a partir de diluciones 1/10 de un stock de plásmidos de Ad o AAV en la misma solución que contenía los virus a cuantificar.

5.2.1 Preparación de las muestras

Este procedimiento se utilizó para cuantificar virus purificados, CEC, sobrenadantes, muestras de tejidos o fluidos corporales (ambos se explicarán más adelante). En el caso de los virus purificados o CEC, antes de cuantificar los virus fue necesario un pretratamiento de las muestras ya que éstas pueden contener genomas virales no encapsulados, proteínas virales y celulares o ácidos nucleicos celulares a parte de las partículas virales a cuantificar. Estos tratamientos se basan en la digestión del DNA celular y de los genomas no encapsulados con DNAsa y en la liberación del DNA encapsulado mediante digestión de la cápside con proteinasa K. El protocolo a seguir basado en protocolo descrito por Ma y col. (Ma et al., 2001) se describe a continuación:

Se mezclan 5ul de una muestra con 2ug de DNAsa, en un volumen final de 20ul y la mezcla se incuba 30 min a 37°C. La DNAsa se inactiva añadiendo EGTA (20mM) e incubación durante 10 min a 37°C seguido de un proceso de inactivación por calor durante 10 min a 90°C. A continuación las proteínas de la cápside se digieren con 1ug/ul de proteinasa K y SDS 0.1% durante 45 min a 56°C. La proteinasa se inactiva por calor en las mismas condiciones, 10 min a 90°C. La RT-PCR se lleva a cabo cogiendo una muestra de 2ul diluida 10 ó 100 veces en agua.

5.2.2. RT-PCR

La técnica de la PCR a tiempo real se basa en una cinética de cuantificación que permite determinar y registrar la formación de productos de PCR en tiempo real. Consiste en cuantificar, durante la fase exponencial de la reacción, los productos de PCR amplificados y marcados con un fluorocromo. En este trabajo se realizó una cuantificación absoluta de AAV por SYBRgreen y hAd y CAV2 mediante una sonda taqman específica para la región E1A del CAV2 y para el hexón del hAd.

Para la realización de la RT-PCR se preparó una mezcla que contenía:

- 1-2 µl de muestra (DNA a cuantificar).
- 5 µl de Premier Extaq 2x (Takara) o de Master SYBR Green.
- 0.3 µl de cada uno de los cebadores o 1 µl en el caso del SYBR Green.
- 0.1 µl de sonda taqman (para sonda Taqman).
- 2.3 µl de agua o 2 µl para reacción con SYBRGreen.

La secuencia de los cebadores y las sonda utilizadas se detallan en la tabla 5. Todas las reacciones de RT-PCR se realizaron utilizando el termociclador LightCycler v2.0 (Roche Molecular Biochemicals), junto con un programa de análisis de los resultados LightCycler software v4.05.

Las condiciones de amplificación que se utilizaron fueron:

- Un ciclo de desnaturalización: 10 min a 95°C
- 40 ciclos de amplificación: 15 seg a 95°C, 1 min a 60°C (reacciones Taqman)
- 40 ciclos de amplificación: 10 seg a 95°C, 20 seg a 66°C, 7 seg a 72°C (reacciones SYBRGreen).
- 1 ciclo de fusión: 10 seg a 95°C, 1 min a 65°C (reacciones SYBRGreen).

Tabla 5. Secuencia nucleotídica de los cebadores y las sondas utilizadas para cuantificar genomas virales por RT-PCR

	Secuencia nucleotídica
CAV670F	5'- TGTGGGCCTGTGTGATTCCT -3'
CAV738R	5'- CCAGAATCAGCCTCAGTGCTC -3'
CAV-Sonda taqman	FAM-CTCGAATCAGTGTCAGGCTCCGCA-TAMRA
Ad18852	5'-CTTCGATGATGCCGAGTG -3'
Ad 18918	5'- GGGCTCAGGTAAGTCCGAGG-3'
hAd-Sonda taqman	FAM-TTACATGCACATCTCGGGCCAGGAC -TAMRA
AAV26MF	5'-CACCATCTGTTTGGGC-3'
AAV26MR	5'-CCCTCCTCCACAGATCAC-3'

5.3. Determinación de las partículas virales funcionales (tu/ml) por tinción del hexón

Este protocolo se basa en el recuento del número de células positivas para la inmunotinción de la proteína viral del hexón en una monocapa de células infectadas con diluciones seriadas del virus. Permite determinar el número de partículas funcionales, o unidades de transducción (tu), de stocks virales purificados y de extractos celulares.

Se preparan por triplicado un banco de diluciones 1/10 del stock viral en placas de 96 pocillos -utilizando el medio de cultivo como medio de dilución- en un volumen final de 100 µl. Se agrega una suspensión celular de DkCre (titulación CAV) o HEK293 (titulación hAd) a razón de 80.000 células por pocillo. Después de una incubación a 37°C durante 24h (CAV) o 36h (hAd) se procede a la inmunodetección. El medio de cultivo se retira y las células se dejan secar durante 5 min. Para fijar las células, se agregan 100 µl por pocillo de metanol frío y se dejan 30 min a -20°C. Posteriormente, se realizan tres lavados con una solución de PBS⁺⁺ 1% BSA. La adición de iones bivalentes, como el calcio y el magnesio, ayudan a prevenir el desprendimiento de las células de los pocillos y el BSA actúa como solución de bloqueo. Posteriormente, las células se incuban con un anticuerpo primario anti-hexón (2Hx-2, ATCC) dilución 1:5 durante 1-2 horas a 37°C. Se realizan nuevamente tres lavados con solución de PBS⁺⁺ 1% BSA. Se incuba con el anticuerpo secundario conjugado con el fluorocromo Alexa 488 (Invitrogen) diluido 1:500 en PBS⁺⁺ 1% BSA durante 1-2 horas a 37°C en oscuridad. Después de tres lavados más, se determina el título funcional viral mediante el recuento de las células positivas con la ayuda de un microscopio de fluorescencia. El título viral, número de unidades de transducción por ml, se calcula con la siguiente fórmula:

$$TU/ml = \frac{\text{media del recuento de células positivas}}{100 \mu l} \times \text{factor de dilución} \times 1000 \mu l$$

Para el virus CAVGFP no fue necesario realizar la tinción del hexón, ya que al contener la proteína GFP, se realizó directamente el conteo de las células positivas. El título viral se determinó de la misma manera.

6. Técnicas con Virus Adeno-asociados

Los Virus Adeno-asociados (AAV), son virus defectivos. Para su replicación necesitan del aporte de ciertos genes de otros virus *helper*. El Ad es el virus *helper* más común. Para la producción de AAV es necesario transfectar células HEK293 con al menos dos plásmidos. Por un lado el plásmido que contenga el genoma del AAV. En este caso y a diferencia de lo que

pasaba con los Ad, no es necesario liberar el virus previamente. Por otro lado, se debe transfectar un plásmido que contenga los mínimos genes necesarios para la producción del AAV, en este caso, lo llamaremos plásmido *helper*. Los genes imprescindibles para la generación de los AAV son E1A, E2A, E4orf6 y las unidades de transcripción VA RNA (Janik et al., 1981; Lai et al., 2002; Weindler and Heilbronn, 1991), también se han descrito procedimientos incluyendo únicamente el gen E4orf6 (Allen et al., 2000), además en ciertas condiciones de estrés celular los AAV pueden llegar a generarse solos.

6.1. Generación de extractos celulares de AAV2 y AAV6 a pequeña escala

Tal y como se indica anteriormente, para la generación de los AAV, se transfectan HEK293 con dos plásmidos mediante la técnica del fosfato cálcico, previamente explicada. Ambos plásmidos serán transfectados a la vez: el plásmido que contiene el genoma del AAV2 (psub201) o el que contiene el genoma del AAV6 (pAAV6; cedido amablemente por el Dr Trempe, Departamento de Bioquímica y Biología del Cáncer, Universidad Médica de Ohio, USA) conjuntamente con un plásmido que contiene los genes *helpers* (cedido amablemente por el Dr Chillón, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, universidad Autónoma de Barcelona). En este caso no se observa el efecto citopático característico de los adenovirus ya que los AAV no inducen cambios morfológicos tan evidentes. A las 48-72 horas post transfección se recogen los extractos celulares tal y como se ha descrito anteriormente para los Ad. Estos extractos se cuantifican mediante RT-PCR tal y como se ha descrito anteriormente.

6.2. Generación y purificación del AAV6 a gran escala

Para realizar ensayos *in vivo* fue necesaria la amplificación y purificación del AAV6. La amplificación y purificación del virus AAV6 se realizó en la Unidad de Producción de Vectores en el Centro de Biotecnología Animal y Terapia Génica (CBATEG) de la Universidad Autónoma de Barcelona.

Para ello y de manera similar a la anterior (generación a pequeña escala), se generó el AAV6 por transfección pero utilizando en este caso un gran número de placas de mayor tamaño (150mm). La purificación se llevó a cabo mediante un gradiente de Iodixanol descrito por Zolotukhin et al. (Zolotukhin et al., 1999). La titulación se realizó por RT-PCR tal y como se ha descrito anteriormente.

6.3. Detección de Virus Adeno-asociados en extractos celulares y purificados de Adenovirus

Debido a la naturaleza dependiente de los AAV, estos han sido detectados en más de un 65% de los stocks de Ad de la ATCC. Una vez empezamos a trabajar con ellos debimos hacer controles de contaminación rutinarios en nuestros stocks de Ad. Para la determinación cualitativa de AAV, tanto en extractos celulares de adenovirus como en extractos obtenidos por purificación en gradientes de CsCl, se utiliza la reacción de la polimerasa en cadena (PCR) con unos cebadores específicos previamente descritos (Katano et al., 2004).

La presencia o no de AAV se determina en función o no de la amplificación de un fragmento específico de 1.5Kb.

7. Técnicas utilizadas para la caracterización de adenovirus

7.1. Obtención del DNA viral

El DNA viral se obtuvo a partir de tres muestras de partida diferentes: a partir del sobrenadante de las células infectadas, a partir de las células infectadas y finalmente a partir de los virus purificados. A continuación se describen los tres procedimientos utilizados y las indicaciones de uso para cada uno de ellos.

7.1.1. Obtención del DNA de adenovirus a partir del sobrenadante de células infectadas

Se parte de 340 µl del sobrenadante de células infectadas a los que se agregan para un volumen final de 400 µl:

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

La mezcla se incubó durante 2 horas a 56°C. La proteinasa K con ayuda del SDS degrada la cápside proteica y el EDTA interviene como agente protector del DNA liberado. La mezcla se deja atemperar, el DNA se extrae con fenol:cloroformo y se precipita con etanol 100% al 2% de acetato sódico. Finalmente, el precipitado de DNA se resuspende en 25 µl de agua bidestilada.

7.1.2. Obtención del DNA de adenovirus a partir de células infectadas (Hirt's)

Este procedimiento se utiliza para la criba de clones después del ensayo de calvas. No es necesario disponer del vector purificado y permite la obtención de una cantidad suficiente de DNA para hacer el análisis de restricción y de secuenciación.

Brevemente, se infectan células DkCre ó HEK293 sembradas en placas de 100 mm de diámetro al 80% de confluencia. Cuando el efecto citopático es completo, se recogen las células infectadas y el sobrenadante en un tubo de 15 ml, tipo falcon. La suspensión celular se centrifuga 5 min a 750-1000g, se retira el sobrenadante y el precipitado celular se disuelve en 1.5 ml de PBS, traspasándolo a un tubo tipo eppendorf. Las células se centrifugan 5 min a 750-1000g. El sobrenadante se retira y el precipitado celular se disuelve en 350 µl de agua bidestilada y se le añaden 350 µl la solución Hirt's 2X (10 mM Tris pH 8.0, 20 mM EDTA, 1.2% SDS y 200 µg/ml de proteinasa K). Se incubó a 56°C durante una hora. Se agregan 200 µl de NaCl 5M (final 1M) gota a gota en agitación continua sobre un vórtex. Se deja a 4°C entre 8 a 16 horas hasta que aparece un precipitado blanco, que corresponde al DNA celular. Para eliminar el DNA celular, la suspensión se centrifuga durante 30 min a 16.000-18.000g a 4°C. Se recoge el sobrenadante y se digiere con RNAsa a concentración final de 100 µg/µl. Se deja incubar a 37°C durante una hora. Se extrae el DNA con fenol:cloroformo y se precipita con etanol 100% con acetato sódico al 2%. Finalmente, el DNA se disuelve en 25 µl de agua bidestilada o Tris-EDTA (TE) pH 8.0.

7.1.3. Obtención del DNA de adenovirus a partir de virus purificado

Este procedimiento se realizó para corroborar la correcta identidad de los adenovirus que fueron purificados en el marco de este trabajo. El material de partida fueron virus purificados. A 2×10^{10} partículas virales, que corresponden a 1 µg de DNA, se le agregan:

- EDTA pH 8.0 (16 µl 0.5M).
- SDS (20 µl 10%).
- Proteinasa K (8 µl 10mg/ml).
- TE pH 8.0 hasta un volumen final de 400 µl.

La mezcla se incubó a 56°C durante 2 horas. A continuación, se realiza una extracción con fenol:cloroformo del DNA y se precipita con etanol 100% con acetato sódico al 2%. El precipitado de DNA se disuelve en 25 µl de agua bidestilada o TE pH 8.0.

7.2. Digestión con enzimas de restricción y secuenciación del DNA de adenovirus

Ambas técnicas se utilizaron para comprobar la identidad de los adenovirus recombinantes a partir del DNA viral, tanto si fueron obtenidos a partir de las células infectadas o a partir de los virus purificados.

7.2.1. Digestión con enzimas de restricción

Se parte aproximadamente de 500-800 ng de DNA viral obtenido a partir de las células infectadas o de los virus purificados y se añade: 1 unidad de enzima de restricción, el tampón adecuado a la enzima proporcionado por la misma casa comercial 10x y agua bidestilada hasta un volumen final de 20 µl. Para la mayoría de las enzimas de restricción se dejó que la reacción de digestión tuviese lugar durante 2 horas a 37°C. Los fragmentos de la digestión se resolvieron en conjunto con el DNA del vector no modificado como control y con un marcador de peso molecular comercial en geles de agarosa al 1% en Tris Acetato-EDTA (TAE).

El patrón de digestión del DNA viral nos permitió hacer una valoración de la integridad del genoma viral.

7.2.2. Reacción de secuenciación

Para la secuenciación del DNA viral se parte de 100 ng del DNA viral y se agregan 5 µl de la mezcla de secuenciación 3.1 de la casa comercial Applied Biosystems, 5 µl del tampón de secuenciación 2x (contiene los ddNTPs marcados con un fluorocromo diferente) y 3.2 pmols del cebador (Tabla 6). Se añade agua bidestilada hasta un volumen final de 10 µl.

Las condiciones de la reacción de secuenciación son:

- 24 ciclos de 30 segundos a 96°C.
- 15 segundos a 50°C.
- 4 minutos a 60°C.

Las reacciones de la secuencia se analizaron con un secuenciador automático del Servicio de Secuenciación y Genómica del Servicio Científico de la Universidad de Barcelona.

Tabla 6. Secuencia aminoacídica de los cebadores utilizados para la secuenciación de Adenovirus

	Secuencia aminoacídica
CAV277	5'-TGCCAGTTCCTCCACGCCTAAT-3'
CAV2RGDseq	5'-GGGGAGAAAAGCCCTGGGGC-3'
CAV2E4R	5'-GGTTTGTGAGATTACCG -3'
CAV2PH20	5'-CCTCTGGGCCTGGAATGCC -3'

8. Ensayos *in vitro* con adenovirus recombinantes

8.1. Ensayo de comparación del tamaño de calvas de los adenovirus humanos coinfectando o no con AAV

Para este ensayo se hizo una modificación al protocolo normal de ensayo de calvas (aislamiento de clones). Al necesitar que una misma células estuviera coinfectada por un hAd y por un AAV, fue necesario infectar primero las células y posteriormente sembrarlas encima de una monocapa para que formasen las calvas. Para ello se infectan monocapas de A549 con hAd5 o ICOVIR15 (50m.o.i.) o hAd5 o ICOVIR15 (50m.o.i.) más AAV2 ó 6 a 1000vp/célula. Pasadas 4 horas se lavan las células con PBS y se tripsinizan. Se cuentan las células en una cámara de Neubauer y 50 células de cada una de las condiciones de infección se siembran en una monocapa no infectada de A549 previamente sembrada en placas de 6 pocillos. Pasadas 4 horas se elimina el medio y se cubre la monocapa con una mezcla 1:1 de DMEM 5% FBS y 1% agarosa atemperado. Cuando la agarosa ha solidificado, se cubre con 2 ml de medio fresco al 5% de FBC. Para el estudio del tamaño de calvas, las monocapas se tiñen con MTT (0,5mg/ml de bromuro de 3-(4,5-dimetietiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium; Sigma-Aldrich, St Louis, MO) a 37°C y 5%CO₂ durante 4 horas.

8.2. Ensayos de infectividad de los adenovirus caninos

Para comprobar si el motivo RGD insertado en la fibra del Ad canino serotipo 2 (CAV2) proporcionaba alguna ventaja en términos de infectividad sobre la fibra salvaje del CAV2, se sembraron 80.000 células (Abrams ó D17) ó 30.000 células (17CM98 ó CML1) en pozos de 96. Pasadas 24 horas se infectan por triplicado con diluciones seriadas ½ de CAV2 o CAV2RGD empezando con 1000 partículas virales por célula. Pasadas 24 horas después de la infección se elimina el medio mediante aspiración y se realiza una tinción del hexón tal y como se ha explicado anteriormente. Las células infectadas que expresaban proteína del hexón se cuentan por triplicado en la misma dilución para ambos virus en pozos con un número de células positivas entre 20 y 100.

8.3. Ensayo de producción y liberación viral de los adenovirus

Con el objetivo de realizar los ensayos de producción y liberación viral, se siembran un número conocido de células en placas de 24 pocillos y 1 ml de medio, para que en el momento de la infección las células se encuentren en un 80% de confluencia. Para la infección de las células, se retira el medio por aspiración y se infecta por triplicado con 300 µl de las soluciones virales previamente preparadas. Las soluciones virales se preparan en unidades de transducción por célula (TU/célula o m.o.i.), de manera que se infecten el 100% de las células sin llegar a causar toxicidad. El número de m.o.i. necesarias para alcanzar un 100% de infección dependió de cada línea celular utilizada: HEK293 5 m.o.i., A549 y NP9 20 m.o.i. y las líneas caninas DkCre a 10 m.o.i., D17 y CML1 a 20 m.o.i., Abrams y 17CM98 a 30 m.o.i. y DEK a 8 m.o.i.

Las células se incuban con la solución viral durante 4h a 37°C. Pasado este tiempo, se retira el medio de infección por aspiración, se lavan las células 3 veces con PBS para eliminar el virus sobrante y se añade medio nuevo. El sobrenadante y el extracto celular total (sobrenadante más células) se recogen a diferentes horas post infección. A tiempos cortos, el virus detectado en la muestra corresponde al virus sobrante de la infección. Las muestras recogidas a tiempo final cuantifican la cantidad de virus producido y el porcentaje de virus liberado al sobrenadante.

Una vez recogidas las muestras, se realizan tres ciclos de congelación y descongelación de los extractos celulares con el objetivo de lisar las células y liberar el virus al medio de cultivo. Los extractos celulares se centrifugan a 750-1000g durante 5 min para posteriormente titular los sobrenadantes libres de células a través de la técnica de tinción del hexón. Las muestras de sobrenadante se titulan directamente sin necesidad de realizar ciclos de congelación y descongelación o centrifugación.

8.4. Análisis de la citotoxicidad

El análisis de la citotoxicidad de los virus replicativos se basa en la medida de la viabilidad celular después de la exposición de las células al virus, que en este trabajo fue determinado a través de varias técnicas: el recuento de células viables mediante tinción con el colorante azul de Tripiano, mediante la liberación de Lactato deshidrogenasa (LDH), comparando su morfología y mediante el análisis de la proteína total remanente en el pocillo después de la infección viral y del análisis de la actividad mitocondrial.

8.4.1. Recuento celular y cuantificación de los niveles de LDH

Estas técnicas se utilizaron para comparar la citotoxicidad de ICOVIR15 coinfectando o no con AAV6 en una sola ronda de replicación. Para realizar estos ensayos se infectan monocapas de A549 con ICOVIR15 (50m.o.i) coinfectando o no con AAV6 (1000vp/célula) sembradas previamente en placas de 6 pocillos. Pasadas 4 horas se hacen tres lavados con PBS y se añade medio nuevo libre de virus DMEM 5% FBS a 37°C y 5% CO₂. A los tiempos deseados se recogen muestras de sobrenadante para analizar los niveles de LDH. El análisis se realizó en el Servicio de Bioquímica del Hospital de Bellvitge siguiendo el protocolo establecido por la Federación Internacional de Bioquímica Clínica. La absorbancia se lee de 340 a 700nm mediante un espectrofotómetro Cobas c711 (Roche Diagnostcs), calibrado con

c.f.a.s. (Roche Diagnostics, ref. 759350) usando un reactivo LDH 1 Gen. 2 (Roche Diagnostics, ref. 04964560 022).

Para el conteo de células viable mediante el colorante azul de Tripano, se recupera los sobrenadantes a los tiempos deseados, se tripsinizan las células y se combinan con los sobrenadantes. Se diluye la mezcla 1/10 en el colorante y se cuentan las células en una cámara de Neubauer. Las células se contaron en grupos de 100 (500-600 células para cada tiempo y condición).

8.4.2. Morfología celular

Para comparar la morfología celular de las células infectadas con ICOVIR15 con o sin coinfección con AAV6, monocapas de A549 en placas de 6 pocillos fueron infectadas como en el ensayo anterior. A los tiempos deseados las células sin fijar fueron examinadas microscópicamente y fotografiadas con un microscopio Leica DMIL LED y el programa Leica Application Suite LAS v.2.6 (Leica, Wetzlar, Germany).

8.4.3. Análisis de la proteína total

Para la determinación de la viabilidad celular a través del análisis de la proteína total se utilizó el ensayo del ácido bicinchonínico (BCA) (Pierce Biotechnology, Rockford, IL). Esta técnica combina la reducción de iones de Cu^{2+} a Cu^{1+} por parte de las proteínas que se encuentren en un medio alcalino, conocida como reacción Biuret, junto con la elevada sensibilidad y selectividad que tienen estos iones (Cu^{1+}) de ser detectados utilizando el ácido bicinchonínico. La reacción de dos moléculas de BCA con un Cu^{1+} generó un producto de color violeta, cuya absorbancia se determinó a una longitud de onda de 540nm.

El ensayo de citotoxicidad se realizó preparando diluciones seriadas de los stocks virales, por triplicado, en medio de cultivo en placas de 96 pocillos. Las diluciones virales se prepararon en un volumen final de 50 μl . La concentración viral de Ad en el primer pocillo para el Ad humano ICOVIR15 fue de 200 tu/célula para las A549 y NP9, 500 tu/célula para las CMT64, Amel 3, HAPT1 y pKln, 1000 tu/célula para las HAPT1. En el caso de los Ad caninos fue de 2000 tu/célula para las Abrams, 17CM98 ó CML1 y 500 tu/célula para las D17. Las diluciones seriadas realizadas fueron de 1/3 ó 1/5 según la línea. Posteriormente, se agregó 100 μl de una suspensión celular a razón de 3×10^4 A549 ó NP9, 1.5×10^4 Amel 3, 2×10^4 HP1, 3×10^4 pKln, 5×10^4 CMT64, 5×10^3 CML1 ó 17CM98, 1×10^4 Abrams ó 2×10^4 D17 células por pocillo. Entre 5 y 8 días después de la infección, dependiendo de la línea celular se procedió a la determinación de la viabilidad celular de cada pocillo por tinción del contenido proteico. Brevemente, el medio de infección se retira y las células se lavan con PBS para eliminar el FBS remanente del medio cultivo. A continuación, las células se resuspenden con 200 μl de la solución de BCA e incuban durante 30 min a 37°C. Finalmente, se determina la absorbancia a 540 nm.

Para los ensayos con células infectadas con ICOVIR15 ó ICOVIR15/AAV6 de las líneas A549 ó NP9 las diluciones seriadas se iniciaron con 1000 células infectadas A549 ó 3000 células infectadas NP9 y se procedió de la misma manera.

Para los ensayos donde se coinfectó con AAV6, se coinfectaron las células con ICOVIR15 tal y como se describe anteriormente y además con diferentes dosis iniciales de AAV6 (400, 4000, 40000 ó 400000 vp/célula).

Las curvas dosis-respuesta se presentan como la viabilidad relativa respecto al 100% de células vivas presentes en el pocillo de células no infectadas. La determinación de la IC₅₀, que corresponde a la cantidad de virus necesario, o número de células infectadas necesarias, para disminuir en un 50% la viabilidad del cultivo celular, se estima a partir de unas curvas dosis-respuesta por regresión estándar no lineal (GraFit; Erithacus Software Ltd., Surrey, United Kingdom) usando una adaptación de la ecuación de Hill.

8.4.4. Análisis de la actividad metabólica mitocondrial

Para el análisis de la viabilidad celular mediante la actividad metabólica mitocondrial se utiliza el ensayo con alamar Blue (Invitrogen). Se trata de un ensayo colorimétrico basado en la transformación, por parte de las células viables y su maquinaria metabólica, de un compuesto (Resazurin) de color azul a otro de color rojo y muy fluorescente al reducirse (Resorufin). Midiendo la fluorescencia o la absorbancia según se prefiera.

El protocolo es muy similar, preparando las mismas diluciones virales, sembrando el mismo número de células y una vez transcurridos 5-8 días se añade el alamar Blue en los pocillos al 10% (unos 15-20 μ l por pocillo). Se deja incubar durante un periodo de 1 a 4 horas a 37°C. Transcurrido este tiempo se lee la placa en un espectrofotómetro normal o de fluorescencia.

8.5. Análisis de la expresión de proteínas por Western blot

8.5.1. Obtención del extracto proteico

Para obtener un extracto de proteínas adecuado para su análisis se siembran las células A549 en placas de 6 pocillos, al llegar a un 80% de confluencia se infectan con AAV6 a 1000vp/célula, ICOVIR15 (50m.o.i.) sólo o coinfectando con AAV6 a 1000vp/célula ó 100000 vp/célula. También se dejó un control sin infectar. Pasadas 4 horas se retira el medio y se incuban con medio fresco a 37°C. A los tiempos deseados se recogen las muestras de sobrenadante y las células por tripsinización y se mezclan. Se centrifugan a 6000 *g* durante 5 min. Se lavan con PBS y se vuelven a centrifugar para congelarlas secas a -80°C.

En el momento adecuado se descongelan y se resuspenden las células en el tampón de lisis Shieh's se deja actuar en agitación suave durante 45 min a 4°C y se centrifugan. Se recoge el extracto proteico en un tubo eppendorf y se congela para titularlo. El tampón Shieh's contiene:

- Tris-HCl 10 mM pH 7,4 (50 μ l del 1 M pH 7,5).
- NaCl 400 mM (400 μ l de 5 M).
- NaF 5 mM (50 μ l de 0,5 M).
- Glicerol 10% (500 μ l de 100%).
- EDTA 1 mM (10 μ l de 0,5 M).
- Ortovanadat 1 mM (10 μ l de 0,5 M).
- Nomidet P-40 0,5% (25 μ l de 100%).

- Cóctel de inhibidores de proteasas 1x (100 µl de 50x Complete Mini, Roche, Switzerland).

8.5.2. Titulación del extracto proteico

En una placa de 96 pozos, se hace una recta patrón de concentraciones de proteína utilizando BSA comercial de concentración conocida. Por triplicado se diluye el BSA en los pozos para que queden 0, 1, 2, 3, 4 y 5 µg de proteína en 160 µl. En otros pozos se hacen diluciones por duplicado de nuestros extractos proteicos (normalmente, 5 µl y 10 µl de una dilución 1/10 en 160 µl). Todos estos pasos deben realizarse en hielo a 4°C. A los 160 µl de las diluciones, se les añade 40 µl del reactivo de Bradford y se mezcla sin crear burbujas. Pasados 5 min a temperatura ambiente se hace una lectura de la DO a 595 nm. Con la absorbancia de la recta patrón se dibuja una recta patrón que nos permitirá cuantificar nuestros extractos proteicos.

8.5.3. SDS-PAGE y transferencia a membrana

Se polimeriza un gel de acrilamida-bisacrilamida al 10-15% utilizando cristales de 1,5mm de Bio-Rad (Hércules, California, USA). Una vez polimerizado se cargan entre 2 y 30 µg de proteína de nuestros extractos diluidos en un tampón de carga 6x (300 mM Tris-HCl pH 6,8, 600 mM DTT, 12% SDS, 0,6% azul de bromofenol, 60% glicerol) y hervidos durante 5 min a 100°C. También cargaremos un marcador de peso molecular de proteínas. El gel se sumerge en un tampón de electroforesis (25 mM Tris, 192 mM glicina, 0,1% SDS) y se deja correr durante dos horas a 100 V y 20 mA.

Una vez el marcador alcanza la zona deseada se procede a la transferencia de las proteínas a una membrana de nitrocelulosa durante 1 hora a 400 mA en agitación continua a 4°C.

8.5.4. Bloqueo, hibridación y detección de las proteínas

Para prevenir la unión inespecífica del anticuerpo se bloquea la membrana con un tampón de TBS-0,05% Tween con un 5% en peso de leche en polvo. Se realizan después tres lavados de 10 min con TBS-0,05% Tween y se incuba la membrana con el anticuerpo primario durante toda la noche a 4°C diluido en TBS-0,05% Tween con un 1% en peso de leche en polvo. En la Tabla 7 se indican los anticuerpos primarios utilizados. A la mañana siguiente se realizan tres lavados más de 10 min y se incuba 2 horas a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario diluido en TBS-0,05% Tween con un 1% en peso de leche en polvo. En la Tabla 7 se indican los anticuerpos secundarios utilizados. Finalmente, se lava 4 veces la membrana y se desarrolla con ECL o ECL+ de Amersham (GE Healthcare, Piscataway, Nueva Jersey, USA) durante 1 min y se revela en una película para revelar quimioluminiscencia también de Amersham. Para la cuantificación de las bandas de Western-blot se utiliza el programa Quantity One Software (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

Tabla 7. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados

Anticuerpo	Antígeno	Orígen	Casa Comercial
sc-430	E1A	Policlonal de conejo	SantaCruz
Ab-116D	Fibra	Monoclonal de ratón	Fitzgerald
Anti Ad2 E1B19K (Ab-1; IF8)	E1B19K	Monoclonal de ratón	Calbiochem
Anti Ad ADP #100578	Adenovirus Death Protein	Policlonal de conejo	Dr Wold/Dra Tollefson
HRP antirabbit	Anticuerpo de conejo	Monoclonal de cabra	DakoCytomation
HRP antimouse	Anticuerpo de ratón	Monoclonal de cabra	DakoCytomation

8.6. Ensayo de actividad hialuronidasa del adenovirus canino ICOCV17

Para medir la capacidad de ICOCV17 de expresar hialuronidasa en forma soluble y activa se siguió el protocolo descrito por Gmachl y col. (Gmachl et al., 1993). Brevemente, células DKCre fueron infectadas con 20 tu/célula de ICOCV15 ó ICOCV17 para conseguir un 80-100% de infección. Pasadas 4 horas, se elimina el medio y se añade medio nuevo libre de virus. Pasadas 48 horas un volumen de solución de ácido hialurónico (3mg/ml) se añade al medio celular y se incuba a 37°C. A los tiempos deseados (0, 1, 2, 3 y 4 horas), se recogen alícuotas, se hierven 5 min y se centrifugan para eliminar los restos celulares. Se añaden 5 volúmenes de Acetato Sódico 0.1% BSA para precipitar el ácido hialurónico y pasados 10 min se lee la absorbancia a 600nm. Para tener una referencia se utilizaron 4 muestras con concentraciones conocidas de hialuronidasa purificada (400, 40, 4 y 0.4 UI/ml).

8.7. Biodistribución de los adenovirus caninos en sangre de ratón

Primeramente se extrajo la sangre de varios ratones (ver apartado más abajo). La sangre extraída de cada ratón (1 ml aprox.) se pasa a tubos con citrato (0.05M) para evitar su coagulación. Una vez obtenida suficiente sangre para el ensayo, ésta se divide en tres tubos. Cada muestra se pone en contacto con 1×10^9 partículas virales de CAV2 o CAV2RGD o con PBS a modo de control. Se deja en agitación durante una hora a 37°C y se procede a separar las fases.

Primero se centrifuga a muy bajas rpm (800 rpm - 10 min) para precipitar las células (glóbulos rojos y blancos) y dejar una fracción con el plasma y las plaquetas. Esta fase con el plasma y las plaquetas se centrifuga a 5000rpm 4 min para precipitar las plaquetas. El precipitado celular se resuspende en PBS citrato 0.01M y se diluye 1:2 en HBSS para que el gradiente se forme correctamente. Después se añade el ficol en un tubo de 15 ml, tipo falcon, y con mucho cuidado se añade el mismo volumen de la mezcla de sangre/HBSS evitando su mezcla con el ficol. Se centrifugan los tubos durante 40 min a 300g y se elige la opción de NO BRAKE para que no se deshaga el gradiente de ficol.

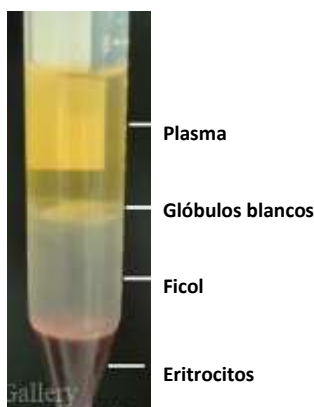


Figura 2. Gradiente de ficol. La fotografía muestra un tubo de 15 ml después de la centrifugación en gradiente con ficol (Obtenido de Dr Tunku Kamarul, University of Malaya).

Una vez formado el gradiente recogeremos los glóbulos blancos y eritrocitos por separado. Las fases que se obtienen por precipitación (plaquetas y eritrocitos) se resuspenden en PBS. De cada una de las fases se extrae el DNA total mediante el Kit QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN). Mediante real-time PCR se cuantifica la cantidad de Ad presente en cada una de las fases con un LightCycler480 de Roche siguiendo el protocolo explicado previamente.

8.8. Biodistribución de los adenovirus caninos en sangre de perro

En este caso se obtuvo la sangre de un paciente canino del Hospital Clínico Veterinario (fundació hospital clínic veterinari, fHCV) de la Universidad Autònoma de Barcelona (UAB). La sangre se recogió en tubos con citrato y se procedió de manera similar a la anterior excepto porque en este caso la sangre no se diluyó 1:2 con HBSS antes de realizar el gradiente de ficol.

9. Técnicas utilizadas en los ensayos *in vivo* en ratones con adenovirus recombinantes

Cepas de ratones utilizadas y condiciones de estabulación

Para la realización de este trabajo se utilizaron ratones inmunocompetentes de la cepa Balb/C para los ensayos de toxicidad y atímicos Balb/C *nu/nu* para los ensayos de eficacia. En todos los casos los animales fueron de 4-8 semanas de edad con un peso de 20-30 gramos. Los ratones se mantuvieron estabulados a una temperatura controlada de entre 22-24°C con ciclo de luz/oscuridad de 12h y una dieta estándar de agua y de comida *ad libitum*.

La manipulación y la estabulación de los animales se realizó en las instalaciones del I'DIBELL (AAALAC, unidad 105) de acuerdo a las recomendaciones de la federación FELASA (Federation of European Laboratory Animal Science Associations) para el correcto tratamiento y uso de los animales de laboratorio y bajo la aprobación del comité ético de experimentación animal del Instituto de Investigación Oncológica-IDIBELL.

9.1. Implantación subcutánea de células tumorales en ratones

Las células tumorales se siembran en placas de cultivos de 150 mm de diámetro y se mantienen en condiciones habituales de cultivos *in vitro*. En el momento de la implantación, las células se tripsinizan, se cuentan, se lavan con PBS y se diluyen en el volumen de PBS necesario para la implantación del número de tumores deseado en un volumen final de 150-

200 μl por tumor. El número de células implantadas por tumor varía entre 2×10^6 y 5×10^6 según la línea implantada.

La implantación de los tumores se realiza mediante la inyección subcutánea de 150-200 μl de la suspensión celular en los flancos posteriores de los ratones, generando así dos tumores por ratón. La inyección subcutánea se realiza con una jeringa hipodérmica con una aguja de 29G. Después de la implantación se hace un seguimiento del crecimiento tumoral por palpación. Las dos dimensiones palpables de los nódulos tumorales se miden con un pie de rey y el volumen de cada tumor se calcula mediante la fórmula:

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

Donde, A corresponde a la dimensión mayor y B a la dimensión menor, ambas en mm.

Cuando los nódulos tumorales alcanzan un volumen de entre 100-150 mm^3 , los ratones se distribuyen al azar en grupos experimentales. Los grupos experimentales se constituyen de 10-12 tumores/grupo.

9.2. Administración de virus

La administración *in vivo* se realizó siempre a partir de stocks de virus purificados en PBS.

9.2.1. Inyección intratumoral

Para la inyección intratumoral de virus (Ad y AAV) en ratones se preparan stocks a concentraciones de 2×10^{10} partículas virales (vp) de AAV6, 2×10^9 vp de ICOVIR15 ó 2×10^{10} vp de AAV6 y 2×10^9 vp de ICOVIR15 en un volumen de 20 μl en PBS o en el caso de los Ad caninos de 1×10^{10} partículas virales en un volumen de 20 μl por tumor. La administración se realiza con una jeringa Hamilton, con una aguja de 25 mm de longitud y 33G.

9.2.2. Inyección sistémica de adenovirus caninos en ratones

Para la administración sistémica de los Ad caninos se prepara una dilución a una concentración de 1×10^{11} vp en un volumen de 200 μl en PBS. La inyección se realiza con agujas hipodérmicas de 29G. La administración endovenosa se realiza por cualquiera de las dos venas laterales de la cola del ratón.

10. Obtención de muestras y procesamiento

10.1. Obtención de muestras de sangre y suero

En ratones la extracción de sangre se realiza por punción intracardiaca después de sacrificar al animal en una cámara de CO_2 , siempre como un procedimiento terminal. La obtención de sangre se realiza con una aguja hipodérmica de 25G.

Las muestras de sangre se obtienen en tubos con EDTA para el análisis del hemograma, con heparina para el análisis de la analítica bioquímica, o bien sin anticoagulante para la obtención del suero. El suero se obtiene realizando una centrifugación a 1000-1500g durante 15 min a temperatura ambiente y se conserva a -80°C .

Los análisis de bioquímica, hemograma y pruebas de coagulación se realizaron en el Servicio de Hematología o Bioquímica Clínica Veterinaria, de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Autónoma de Barcelona.

10.2. Obtención de tumores y órganos

Para la obtención de tumores y órganos en el caso de los ratones, estos se sacrificaron en la cámara de CO₂. Se separa del tejido conectivo con la ayuda de material quirúrgico. A continuación se lavan con solución salina y se dividen por la mitad con una hoja de bisturí o se divide la muestra total en dos. Una mitad se fija en formaldehído al 4% durante 16h, para su posterior inclusión en parafina, y la otra se incluye en OCT.

En perros las muestras se obtuvieron en el momento de la necropsia realizada en las instalaciones del Servicio de Diagnostico de Patología Veterinaria, de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Autónoma de Barcelona. Se fijaron con formaldehído al 4% durante 16h, para su posterior inclusión en parafina y también se congelaron muestras de tumor a -80°C hasta el momento de su procesamiento.

10.3. Inclusión de tejidos en parafina

La fijación e inclusión de los tejidos en parafina permite conservar la morfología de los tejidos y les confiere consistencia para permitir realizar cortes histológicos suficientemente finos como para ser examinados al microscopio. Para permitir que la parafina penetre en el tejido, primero de todo es necesario deshidratarlos mediante una batería de alcoholes etílicos de graduación creciente.

Brevemente, los tejidos se lavan con solución salina para eliminar el fijador y se sumergen durante 1h en etanol 70%, durante 2h en etanol 96% y toda la noche en un etanol 96% nuevo. Al día siguiente se pasan por una batería de 3 etanoles al 100% (1h 30 min en cada etanol) y finalmente se sumergen en xilol durante 1h y 30 min. Una vez deshidratados se sumergen durante toda la noche en parafina líquida en una estufa a 65°C y al día siguiente se incluyen en los bloques. Para realizar los bloques se utilizó un aparato que mantiene la parafina líquida a 60°C y tiene un dosificador que permite rellenar los moldes, junto a una placa que está a una temperatura de 4°C y permite la solidificación homogénea de los bloques.

10.4. Inclusión de tejidos en OCT

La inclusión de tejidos tumorales en OCT se realiza en el mismo momento de la obtención de las muestras. Los tumores se colocan en moldes Criomold (Tissue Tek Sakura) donde previamente se agrega una capa de matriz crioprotectora OCT (Tissue Tek Sakura) y se congelan rápidamente en nieve carbónica. Las muestras se guardan a -80°C hasta el momento de su procesamiento.

11. Técnicas histológicas

11.1. Obtención de cortes histológicos

Los cortes se colocan en portaobjetos previamente tratados con Poly-L-lisina (Sigma), con tal de aumentar la adherencia de las muestras. Este tratamiento consiste en sumergir los portaobjetos 5 min a temperatura ambiente en una solución de Poly-L-lisina al 0,5% en agua destilada. En todos los portaobjetos realizados en el laboratorio, se pusieron al menos dos secciones de la misma muestra para obtener duplicados.

11.2. Cortes histológicos parafinados

A partir de bloques de parafina, previamente enfriados a -20°C , se obtienen cortes de $4\text{ }\mu\text{m}$ de grosor con un micrótopo de rotación. Una vez cortados, las secciones de tejido se colocan en un baño de agua destilada caliente (42°C) para conseguir su máxima extensión. Los cortes se recogen del baño con un portaobjeto poly-L-lisinado y se dejan secar a 37°C 30 min.

11.3. Inmunohistoquímica en cortes parafinados

En este trabajo se realizaron dos tipos de inmunohistoquímicas en cortes de tejidos parafinados de tumor: para detectar adenovirus y para detectar la presencia y distribución de ácido hialurónico (HA). El protocolo utilizado en ambos fue similar, variando el anticuerpo o método utilizado para la detección (Tabla 8), la degradación previa de muestras del HA mediante hialuronidasa para obtener un control negativo y pequeños cambios que se citan en el protocolo. En todos los casos las incubaciones se realizan en cámaras húmedas sin permitir nunca que los tejidos se secan; todas las soluciones se prepararon en el momento de su uso. El protocolo utilizado se detallada a continuación:

Tabla 8. Anticuerpo primario y secundario y proteína de unión al ácido hialurónico utilizados en las inmunohistoquímicas.

Anticuerpo/ Proteína	Antígeno	Origen	Dilución	Casa Comercial
Ab6982	Proteínas cápside viral	Policlonal conejo	de 1/100	Abcam
B-HABP	Ácido hialurónico	-	5ug/ul	Seidagaku, USA
Envision+System-HRP antirabbit	Anticuerpo conejo	de Monoclonal cabra	de Puro	DakoCytomation

- Desparafinación de las muestras. Las muestras se desparafinan por incubación de las secciones durante toda la noche a 37°C o durante 2h en la estufa a 65°C . Para la detección de HA se incuban por inmersión 3 veces 7 min en xilol 100% y 2 veces 2 min en etanol 100%. Para detección de Ad se incuban por inmersión durante 5 min en una batería de cuatro

xiloles, durante 5 min en una batería de tres etanoles 100% y durante 5 min más en una batería de tres etanoles de 96% y un etanol 70%. Posteriormente, las muestras se lavan por inmersión una vez en agua durante 5 min.

- Inhibición de las peroxidasas endógenas y rehidratación de las muestras. Las peroxidasas endógenas se inhiben sumergiendo las muestras en peróxido de hidrógeno al 0.3% en agua desionizada (en metanol para HA) durante 10 min. Posteriormente, las muestras se lavan por inmersión en agua durante 5 min y luego 3 veces en PBS pH 7.4 durante 5 min.

- Digestión de los controles negativos con hialuronidasa (Detección del ácido hialurónico). Una de las secciones de cada portaobjetos se cubre con una solución de hialuronidasa (Sigma H3632), a una concentración de 20U/ml en PBS. La otra sección se cubre con PBS, y las muestras se incuban en una cámara húmeda durante 1 h a 37°C. Posteriormente las muestras se lavan por inmersión 3 veces en PBS pH 7.4 durante 5 min.

- Exposición antigénica (inmunohistoquímica de Ad). Los tejidos se permeabilizan con tampón citrato sódico 1x pH 6 en una olla a presión a máxima temperatura durante 2 min. Posteriormente, las muestras se lavan por inmersión una vez en agua durante 5 min y luego 3 veces en PBS pH 7.4 durante 5 min.

- Bloqueo. Las muestras se cubren con una solución al 10-20% de suero de caballo en PBS y se dejan en incubación en una cámara húmeda durante 1-2h a temperatura ambiente.

- Inmunodetección. Para proceder a la inmunodetección la solución de bloqueo se retira y las secciones se cubren con una solución del anticuerpo primario diluido en PBS o de la proteína de unión al HA B-HABP a 5ug/ml en PBS 0.1% BSA. La incubación se realiza durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente las muestras se temperan durante 30 min y se lavan 3 veces con PBS + 0.2% Triton 100 o PBS para el HA durante 5 min. A continuación, los tejidos se cubren con Envision System-HRP durante 30 min para la detección de Ad o con el complejo ABC (Avidina-Biotina-Peroxidasa; ABC KIT PK-4000, Vectastin) siguiendo las instrucciones del fabricante para la detección del HA.

- Revelado. Las muestras se lavan 3 veces más con PBS + 0.2% Triton 100 durante 5 min. Para el HA PBS y 5 min más en TBS. A continuación, las secciones se cubren con el sustrato cromogénico D.A.B. (Dako Cytomation K3468; tiempo variable según tinción 15s-2min), hasta la aparición de un precipitado marrón. La reacción se detiene sumergiendo las muestras en agua del grifo durante 10 min o TBS para el HA más agua del grifo. Posteriormente, las muestras se contratiñen con el colorante de núcleo hematoxilina durante 1-2 min. Las muestras se lavan durante 10 min con agua del grifo y se rehidratan en una batería de etanoles de graduación creciente: 2 min en etanol 70%, tres veces durante 2 min en etanol 96%, tres veces durante 2 min en etanol 100% y cuatro veces durante 5 min en xilol. Finalmente, las muestras se montan con un medio de montaje DPX (VWR International td. Prod 360294H).

12. Tratamiento de pacientes caninos con ICOCV17

12.1. Pacientes

Los pacientes escogidos para este estudio presentaban tumores sólidos, refractarios a las terapias convencionales o con mal pronóstico bajo el tratamiento con los protocolos de rutina. Los criterios de inclusión fueron: tumores sólidos accesibles, refractarios o con mal pronóstico y ausencia de disfunciones graves de órganos. Los criterios específicos de exclusión fueron: animales inmunosuprimidos, con enfermedad hepática (Hiperbilirrubinemia, elevación de enzimas hepáticas de tres o más veces), trombocitopenia ($<1 \times 10^5$ Plt/ul), hematocrito $<25\%$, o problemas cardio-respiratorios.

Las biopsias diagnósticas fueron realizadas en el Servicio de Diagnostico de Patología Veterinaria, el análisis del hemograma en el **Servicio de Hematología Clínica Veterinaria** y la analítica bioquímica en el Servicio de Bioquímica Clínica Veterinaria de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Autónoma de Barcelona.

12.2. Protocolo con ICOCV17

La terapia con ICOCV17 fue aprobada por el Departamento de Medicina Interna de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Autónoma de Barcelona. Se obtuvo un consentimiento informado de los propietarios de los pacientes.

En el momento de administrar el virus los pacientes fueron aislados en una sala de aislamiento aprobada para la administración de vectores del Hospital Veterinario. Los animales se mantuvieron en aislamiento durante cuatro días como mínimo. Para la administración del virus los tumores fueron divididos en cuadrantes y la dosis se distribuyó equitativamente. Todos los pacientes recibieron una sola dosis intratumoral de 1×10^{12} vp de ICOCV17 diluido en 1 mililitro de PBS estéril. La administración se realizó con una aguja hipodérmica de 21G, en varios puntos del tumor.

Cuando fue necesario, bajo criterio veterinario, se anestesió a los pacientes mediante anestesia general o sedación y anestesia local. En el Caso I y II, no se aplicó ningún tratamiento concomitante, solamente se administraron antibióticos y tratamientos paliativos no relacionados con el caso. En los Casos III y IV, se administró el virus de manera concomitante con el inhibidor de Tirosinasa, Toceranib. El paciente V no se trató con quimioterapia concomitante pero la cirugía para eliminar el tumor fue incluida en el protocolo, y el virus fue administrado a modo de terapia neoadyuvante.

12.3. Monitorización clínica de los perros

Los pacientes se monitorizaron diariamente durante los tres días postadministración. Actitud, apetito, temperatura, frecuencia cardíaca y respiratoria y estado del tumor fueron revisados cada 8 horas. Los análisis bioquímicos, hematológicos, las pruebas de coagulación y la recogida de muestras (orina, saliva, sangre y heces) se realizaron una vez al día. Después de la hospitalización de los primeros días, los pacientes acudieron a revisiones según la disponibilidad de sus propietarios. En el Caso III, el paciente se mantuvo en observación y aislamiento durante todo el proceso debido al estado delicado de salud que presentaba

(desordenes hematológicos) y a la evidente lisis tumoral desde día 3. La medición del volumen tumoral se realizó por pie de rey y la profundidad mediante ecografía. Los diámetros mayores del tumor fueron medidos acorde con los protocolos RECIST (Eisenhauer et al., 2009): respuesta completa (CR; no detección de tumor después del tratamiento), respuesta parcial (PR $\geq$ 30% de reducción en la suma de los diámetros del tumor), enfermedad estable (SD sin reducción o aumento) y enfermedad progresiva (PD $\geq$ 20% en aumento del tumor).

12.4. Obtención de muestras

12.4.1. Obtención de orina

Las muestras de orina se obtuvieron mediante sondaje vesical a los tiempos determinados y recogidas en tubos previamente complementados con un cóctel de inhibidores de las proteasas (Amersham Pharmacia). Posteriormente, se realizó una centrifugación a 1000-1500g durante 10 min a 4°C y se descartó el pellet de células y sedimentos. El sobrenadante se conservó a -80°C hasta el momento de su procesamiento.

12.4.2. Obtención de saliva

Las muestras de saliva se obtuvieron utilizando el sistema Salivette® (Sarstedt, Numbrecht, Alemania). Posteriormente los tubos fueron centrifugados a 1000-1500g durante 15 min y conservados a -80°C hasta el momento de su procesamiento.

12.4.3. Obtención de heces

Las muestras de heces se recogieron por extracción de muestras de la región anal en botes de orina estériles y se congelaron a -80°C hasta su procesamiento. Una vez descongeladas, se diluyó 1/100 peso/volumen en PBS con altas concentraciones de penicilina y estreptomicina para su análisis.

12.4.4. Obtención de sangre

En perros la extracción de sangre se realizó por punción de la vena yugular con una aguja hipodérmica de 21G. Las muestras de sangre fueron coleccionadas en tubos con EDTA para el análisis del hemograma, con heparina para el análisis de la analítica bioquímica, o bien sin anticoagulante para la obtención del suero. El suero se obtuvo realizando una centrifugación a 1000-1500g durante 15 min a temperatura ambiente y se conservó a -80°C.

Los análisis de bioquímica, hemograma y pruebas de coagulación se realizaron en el Servicio de Hematología o Bioquímica Clínica Veterinaria, de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Autónoma de Barcelona.

12.5. Determinación de las partículas virales por tinción del hexón en orina, saliva y heces

La determinación de las partículas funcionales en las muestras biológicas secretadas/excretadas nos permitió valorar el potencial riesgo de transmisión del virus en el material biológico liberado. Se realizó mediante la técnica del hexón previamente explicada.

12.6. Determinación de las partículas virales por PCR a tiempo real en sangre

El ensayo se basó en la determinación del número de genomas virales en una muestra por amplificación del DNA por PCR a tiempo real (RT-PCR) explicada previamente. La extracción del ADN genómico de las muestras de sangre se obtuvo utilizando el kit *Blood DNA Cell Culture* (Quiagen).

12.7. Ensayo de neutralización de anticuerpos antiadenovirus

El ensayo de la determinación de los anticuerpos neutralizantes en suero de perros, se basa en la inhibición del 50% de la transducción celular después de la exposición a un virus en presencia de anticuerpos neutralizantes.

Para este ensayo las muestras de suero se incuban a 56°C durante 30 min para inactivar las proteínas del complemento. Se preparan diluciones virales, por triplicado, en placas de 96 pocillos. Las diluciones virales se preparan en medio de cultivo hasta obtener un stock final de concentración 1×10^5 tu/ml. Posteriormente se realizan las diluciones seriadas del suero utilizando la dilución de virus, donde el primer pocillo corresponde a una 1/10, seguida de 9 diluciones seriadas $\frac{1}{2}$. A un pocillo se le agrega sólo el virus sin suero (control positivo), mientras que a otro pocillo no se le agrega virus (control negativo). Las muestras de suero se incuban con el virus durante una hora a temperatura ambiente. Luego, se agregan 100 μ l de una suspensión celular a razón de 5×10^4 células de DkCre por pocillo. Finalmente, se incuban durante 24 horas a 37°C. La determinación del título de anticuerpos neutralizantes se realiza en el microscopio de fluorescencia, donde el título corresponde a la dilución donde existe un 50% de la inhibición de la infección comparado con el pocillo control positivo.

13. Análisis estadístico

Las diferencias estadísticas entre grupos fueron evaluadas mediante una prueba *t*-Student no apareada de dos colas. Para comparar las curvas de supervivencia entre grupos se utilizó un test log-rank. La significancia estadística fue determinada en $p \leq 0.05$.

Resultados

Capítulo I

1. Aumento de la potencia oncolítica de los adenovirus mediante el uso de virus adeno-asociados

1.1. Cambio de fenotipo del tamaño de calva del adenovirus salvaje (Adwt) y del Adenovirus (Ad) oncolítico ICOVIR15 por coinfección con Virus Adenoasociados (AAV) serotipo 2 y 6

Una vez se generaron los AAV 2 y 6 por transfección en células HEK293, se recogieron los extractos celulares (CE), se sometieron a tres ciclos de congelación y descongelación y se cuantificaron por la reacción de la polimerasa en cadena cuantitativa (qPCR) mediante Syber Green.

El aumento de la citotoxicidad de los Ad por parte de los AAV se ha descrito previamente (Timpe et al., 2007). El tamaño de calva está correlacionado con un aumento de la citotoxicidad. Teniendo en cuenta ambos conceptos, quisimos ver si la coinfección con ambos virus aumentaba el tamaño de calva tanto del Adwt como de ICOVIR15 en células de carcinoma de pulmón A549. Para ello, y puesto que es necesario que la misma célula sea infectada por ambos virus al mismo tiempo, se realizó un ensayo de calvas con células infectadas con Adwt, ICOVIR15, ó estos Ad más AAV2 ó AAV6. Una vez infectadas las A549, estas células se tripsinizaron, se contaron y 50 células de cada una de las condiciones de infección se añadieron sobre monocapas de A549 previamente sembradas en placas de seis pozos. A los tiempos indicados y en función del momento de aparición de las calvas, éstas fueron fotografiadas.

Como puede verse en la figura 1, la coinfección de las células con Ad y AAV provoca una aparición temprana de las calvas y un mayor tamaño a cualquier tiempo comparado con la infección de Ad solamente. Además, la coinfección con AAV6 produjo una aparición aún más temprana (día 3), comparado con la coinfección con AAV2 (día 4) en ambos Ad (Adwt y ICOVIR15), siendo también las calvas producidas por coinfección con el AAV6 de mayor tamaño que las producidas por coinfección con el AAV2 a cualquier tiempo.

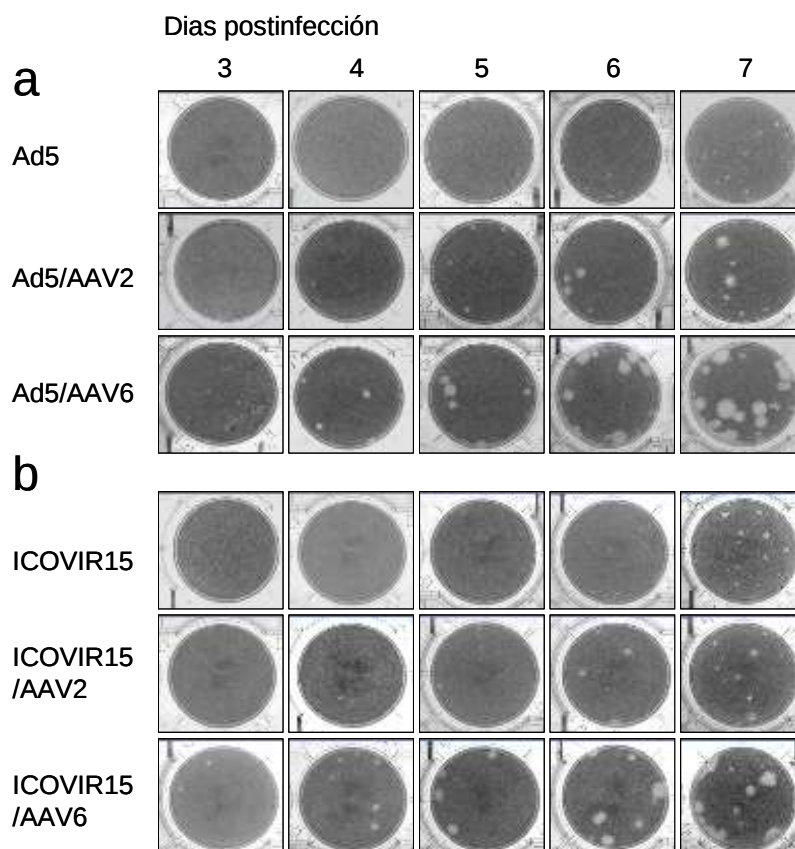


Figura 1. La coinfección de Ad-AAV aumenta el tamaño de calva de los Ad. Ensayo de calvas en A549 infectadas con (a) Ad5 ó (b) ICOVIR15 coinfectando o no con AAV2 ó AAV6. Cincuenta células infectadas de cada una de las condiciones de infección se añadieron sobre monocapas de A549 previamente sembradas en placas de 6 pozos. Las calvas se tiñeron con MTT y fueron fotografiadas a los tiempos indicados.

1.2. Caracterización de la liberación viral al coinfectar con AAV en tres líneas celulares

Un aumento del tamaño de calva se relaciona frecuentemente con un aumento de la liberación viral (Gros et al., 2008; Puig-Saus et al., 2010; Tollefson et al., 1996). Por este motivo, y teniendo en cuenta la cinética de calvas vista al coinfectar con los AAVs, hipotetizamos que un aumento de la liberación viral podría ser la causa de este fenotipo de calva grande y de aparición temprana. Comparamos la cinética de producción viral total (extracto celular, CE) y la liberación de virus al medio (sobrenadante; SN), del Adwt y de

ICOVIR15 en varias líneas celulares bajo diferentes condiciones de infección con Adwt ó ICOVIR15 y coinfectando con diferentes AAVs.

Línea HEK293: Se analizó la producción total y la liberación viral al medio de ICOVIR15 en ausencia o en presencia de 100 partículas virales (vp) ó 10000 vp por célula de AAV6. Como se observa en la figura 2a, la coinfección con AAV6 aumentó significativamente ($p<0.05$) la liberación al medio de Ad, independientemente de la dosis, en todos los tiempos analizados. También se observa que produjo una disminución ($p<0.05$) de la producción total de Ad, esta vez sí de forma dosis dependiente, a 48 y 72 horas post infección. La dosis de 10000 vp de AAV6 también disminuyó la producción de forma significativa ($p<0.05$) a 24 horas post infección comparado con ICOVIR15 en ausencia de AAV6.

Líneas A549 y NP9: En ambas líneas se comparó la producción de ICOVIR15 en ausencia o en presencia de una dosis de 1000 vp de AAV6 por célula. La figura 2b y c muestra que la coinfección con AAV6 aumentó la liberación de ICOVIR15 de manera estadísticamente significativa ($p<0.05$) a 24, 48 y 72 horas post infección en A549 y a 48 y 72 horas post infección en NP9. Además, la producción total de ICOVIR15 se redujo también significativamente ($p<0.05$) en todos los tiempos analizados en A549 mientras que en la línea NP9 no se vio afectada.

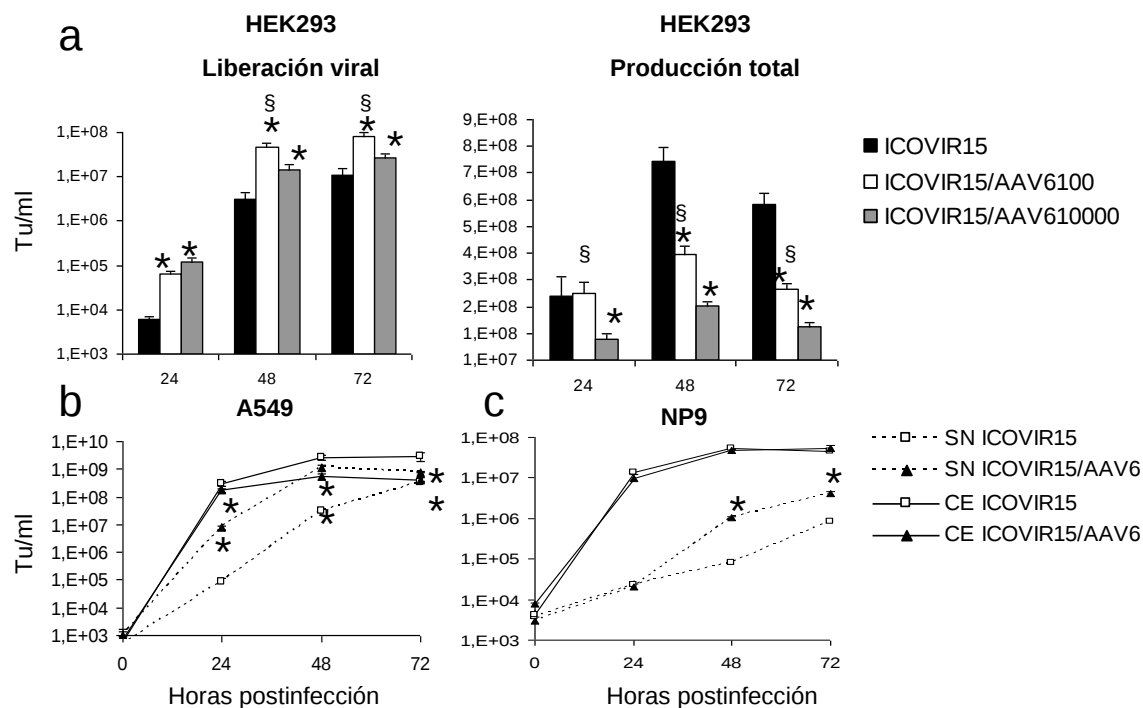


Figura 2. La coinfección de Ad-AAV produce una liberación adenoviral acelerada y aumentada.

Producción y liberación viral de ICOVIR15 sólo y combinado con AAV6 en (a) HEK293, (b) A549 y (c) NP9. Se analizó el contenido extracelular (SN, sobrenadante) y total (CE, extracto celular) a los tiempos indicados. Se muestran los valores medios ($n=3$) $\pm$ SD. * $p \leq 0.05$ comparado con ICOVIR15. § $p \leq 0.05$ comparado con ICOVIR15/AAV6(10000).

En la línea A549 también se comparó la producción del Adwt en presencia o no de AAV6 y de AAV2 a una dosis de 50 vp por célula (Figura 3). La coinfección aumentó la liberación viral del Adwt significativamente ($p < 0.05$) a 24 horas post infección coinfectando con AAV2 y a 24 y 48 horas post infección coinfectando con AAV6. Por otro lado la producción total se vio afectada negativamente a las 24 horas post infección coinfectando con AAV2 ($p \leq 0.01$) y a las 48 horas post infección coinfectando con ambos AAVs ($p < 0.01$).

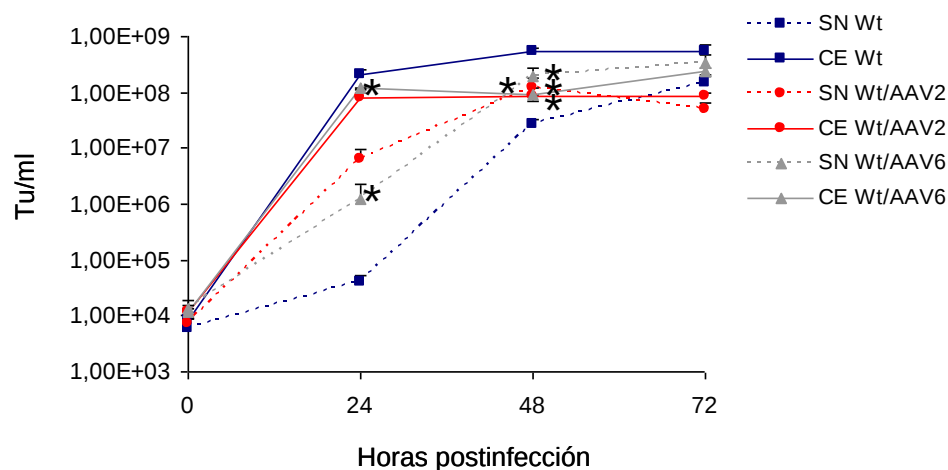


Figura 3. La coinfección de Ad-AAV produce una liberación adenoviral acelerada y aumentada. Producción y liberación viral de Adwt sólo y combinado con AAV2 o AAV6 en A549. Se analizó el contenido celular extracelular (SN, sobrenadante) y total (CE, extracto celular) a los tiempos indicados. Se muestran los valores medios (n=3) $\pm$ SD.* $p \leq 0.05$ comparado con Adwt.

1.3. Caracterización del efecto de diferentes dosis de AAV6 en la eficiencia de liberación de virus en A549

Nuestro objetivo en este trabajo es la potenciación de los adenovirus oncolíticos. Como la coinfección con AAV6 demostró aumentar el tamaño de calva de una manera más marcada, indicando una mayor potenciación que el AAV2, decidimos trabajar con el AAV6 y dejar a un lado el AAV2.

Los efectos de los AAV sobre los Ad, se han descrito como dosis dependientes (Timpe et al., 2006). Por tanto una coinfección con mayor cantidad de AAV6 debería producir una mayor liberación viral al medio. Para caracterizar este fenotipo de liberación aumentada, comparamos los CE y los SN de células A549 infectadas con ICOVIR15 ó ICOVIR15 más AAV6 a diferentes dosis (100, 1000, 10000 ó 100000 vp por célula). En la figura 4a se representa el porcentaje de virus liberado al medio sobre la cantidad total producida. Como se observa, el efecto del AAV6 sobre la liberación viral no es dosis dependiente. Una dosis de 1000 vp de AAV6 provocó que tanto a las 48 como a las 72 horas post infección el 100% del virus

estuviese liberado. Dosis menores o mayores a ésta produjeron menores porcentajes de liberación viral. También observamos que la liberación del Adenovirus ICOVIR15, es bastante ineficiente. Este hecho está ampliamente estudiado en el campo de la viroterapia con adenovirus (Gros and Guedan, 2010).

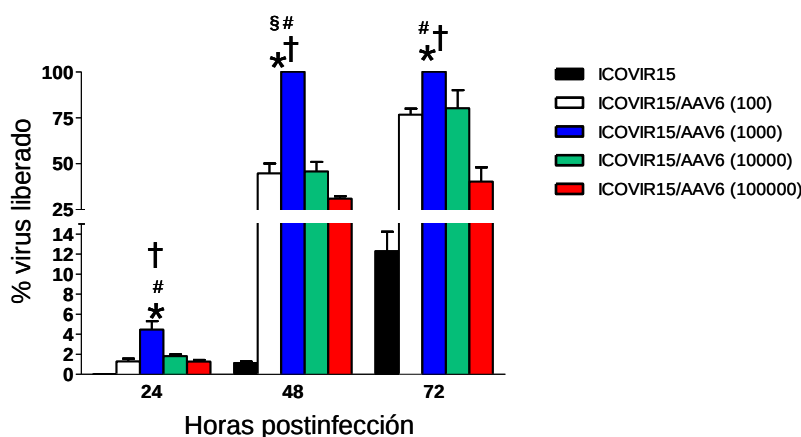


Figura 4. La coinfección de Ad-AAV aumenta la liberación viral de adenovirus. Producción y liberación viral de ICOVIR15 sólo y combinado con AAV6. Porcentaje de virus liberado ((virus liberado/virus producido) x100) en A549 infectadas con ICOVIR15 (50MOI) solo o combinado con AAV6 (100, 1000, 10000, 100000vp/célula) a los tiempos indicados. Cada barra muestra la media de tres muestras (n=3) $\pm$ SD. * $p \leq 0.05$ comparado con ICOVIR15, # $p \leq 0.05$ comparado con ICOVIR15/AAV6(100), § $p \leq 0.05$ comparado con ICOVIR15/AAV6(10000), † $p \leq 0.05$ comparado con ICOVIR15/AAV6(100000).

Además, es importante recalcar que la coinfección con 1000 vp de AAV6 produjo la mayor liberación de ICOVIR15 al medio en términos absolutos (Figura 5b). También, que la producción total de ICOVIR15 se redujo siguiendo una tendencia dosis dependiente (Figure 5a).

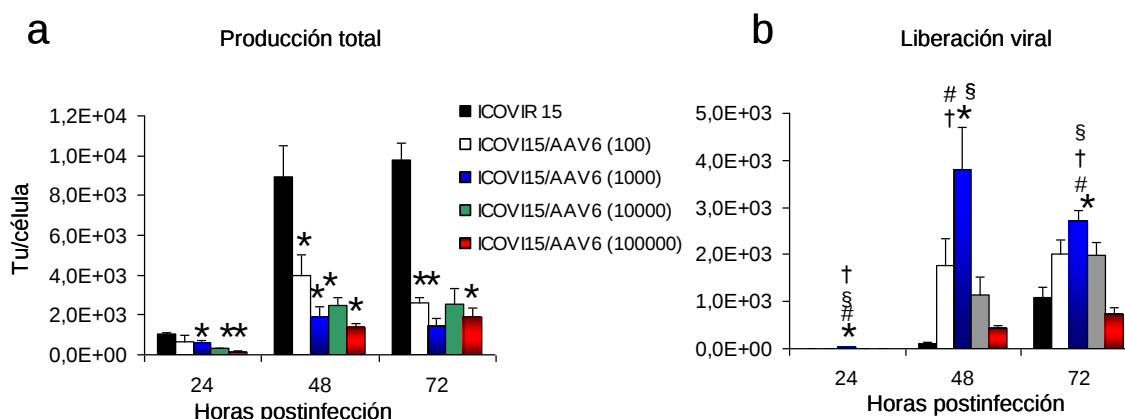


Figura 5. AAV6 aumenta la cantidad absoluta de ICovIR15 liberado al medio y disminuye la producción total. (a). Cantidad absoluta de virus producido por célula. (b). Cantidad absoluta de virus liberado al medio por célula en A549 infectadas con ICovIR15 (50MOI) solo o combinado con AAV6 (100, 1000, 10000, 100000vp/célula) a los tiempos indicados. Cada barra muestra la media de tres muestras ($n=3$) $\pm$ SD. * $p \leq 0.05$ comparado con ICovIR15, # $p \leq 0.05$ comparado con ICovIR15/AAV6 (100), § $p \leq 0.05$ comparado con ICovIR15/AAV6(10000), † $p \leq 0.05$ comparado con ICovIR15/AAV6(100000).

1.4. Caracterización del efecto de la coinfección con 1000 partículas virales de AAV6 sobre la expresión de proteínas de ICovIR15

Como hemos visto, los efectos del AAV6 sobre ICovIR15 parecen ser dosis dependientes en algunos casos (disminución de la producción total) pero no en otros (% de liberación viral al medio, figura 4). Por este motivo hipotetizamos que diferencias en la expresión de proteínas del Ad, podrían explicar el mecanismo por el cual esta liberación de virus estaba maximizada a una dosis específica (1000vp). Para ello analizamos por Western Blot las proteínas que creímos tenían más influencia en este proceso: E1a, E1B19K y la proteína ADP (Adenovirus Death Protein (Tollefson et al., 1992)). También incluimos proteínas de expresión tardía como la fibra, o las proteínas de la cápside pentón, hexón, pV, pVI y pVII. Se incluyó también una dosis de coinfección con AAV6, 100 veces mayor (100000vp) a modo de control. Como vemos en la figura 6 la expresión de E1A y de las proteínas de la cápside se redujo de una manera dosis dependiente en todos los tiempos analizados, coincidiendo con lo previamente publicado (Timpe et al., 2006). A 24 y 36 horas post infección la expresión de E1B19K también sufrió una disminución dosis dependiente, no así a las 48 horas donde se observó

un aumento en la expresión de esta proteína de forma dosis dependiente La proteína ADP pareció verse afectada sólo con la dosis alta de AAV6 (100000vp), pero no con la dosis baja.

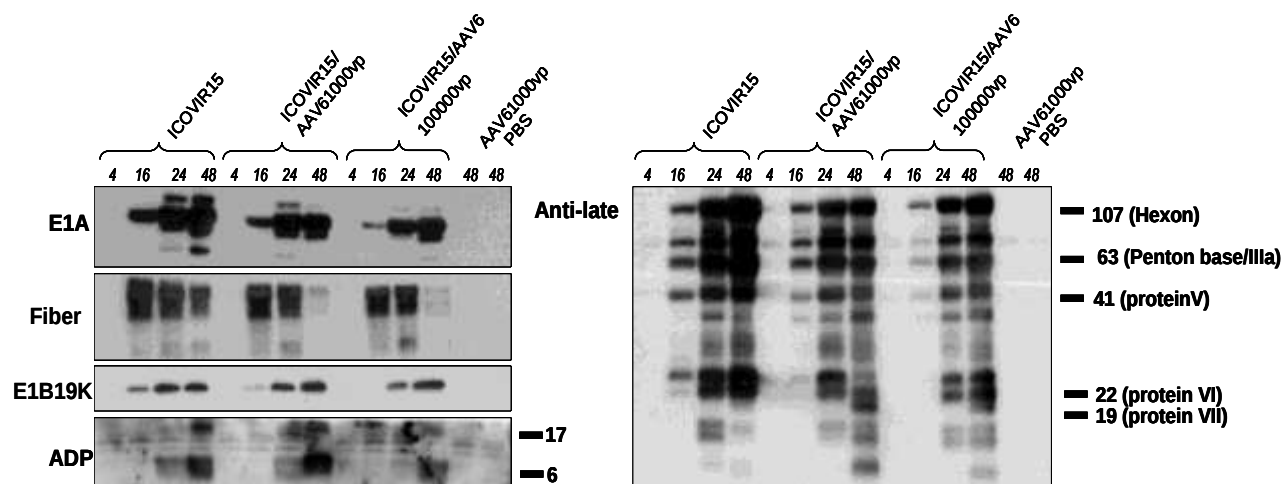


Figura 6. La expresión de proteínas de ICOVIR15 se ve modificada durante la coinfección con AAV6. Análisis de la expresión de proteínas de ICOVIR15 sólo o durante la coinfección con AAV6 (1000 ó 100000 vp/célula). Los cultivos celulares se recogieron a los tiempos indicados y cantidades iguales de proteína se analizaron por Western-Blot. A la izquierda de las imágenes se indica la proteína analizada. Se comprobó la carga similar de proteínas por tinción con Ponceau. En el Western de ADP la banda superior está glicosilada y la banda inferior más acentuada es un producto de la proteólisis (Tollefson et al., 1992). Se observan intensidades similares de la doble banda inespecífica entre las dos bandas de ADP (Doronin et al., 2003).

1.5. Efecto de la coinfección con AAV6 sobre la citotoxicidad de ICOVIR15 en A549 en ensayos de una sola ronda de replicación

Una vez definido el fenotipo de calva grande, el aumento de la liberación del virus como causa de este fenotipo y el efecto independiente de la dosis de AAV6 sobre esta liberación, quisimos ver como podía beneficiarnos, desde un punto de vista viroterapéutico, este efecto maximizado al coinfectar con 1000vp de AAV6. Para ello comparamos la citotoxicidad (definiendo citotoxicidad como la capacidad del virus de disminuir la viabilidad celular) de ICOVIR15, coinfectando o no con 1000vp de AAV6 (dosis en la que se observó el máximo efecto en la liberación viral, figura 4). Se midió la viabilidad celular e integridad de su

membrana por exclusión de azul de Tripano y por liberación de Lactato Deshidrogenasa (LDH) al medio. También se caracterizó la morfología celular de ambas condiciones de infección.

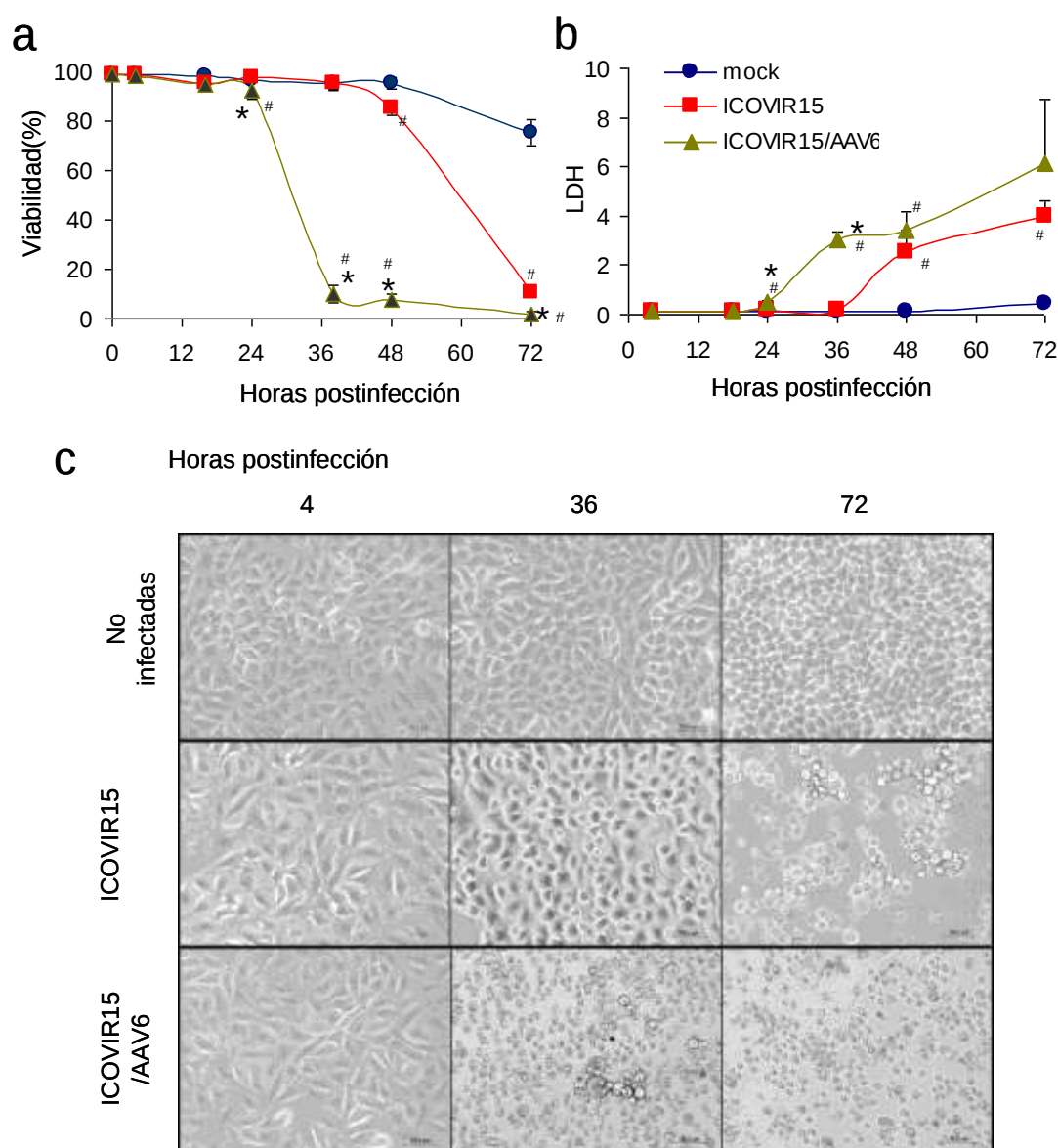


Figura 7. La coinfección con AAV6 induce una morfología similar a la apoptótica y acelera la muerte celular inducida por ICovIR15. Células A549 sin infectar o infectadas con ICovIR15 (50MOI) sólo o combinado con AAV6 (1000vp/cell). **(a)** Porcentaje de células viables determinadas por capacidad de exclusión del azul de Tripano de la célula. **(b)** Lisis celular medida por liberación de LDH al medio de cultivo. Las unidades de LDH están expresadas en uKat/L. **(a y b)** Se muestra la media (n=3) $\pm$ SD. # $p \leq 0.05$ comparado con las células no infectadas. * $p \leq 0.05$ comparado con células infectadas con ICovIR15. **(c)** Morfología celular a los tiempos indicados.

Como se observa en la Figura 7a la viabilidad de las células coinfectadas, medida por la capacidad de exclusión del azul de Tripano, se vio comprometida desde las 24 horas, reduciéndose progresivamente, siendo los valores de viabilidad 92.3%, 9.8 %, 7.7% y 1.7% a las 24, 36, 48 y 72 horas post coinfección, siendo significativamente diferentes ($p \leq 0.01$) a los de las células infectadas con ICOVIR15 con valores de 97.7%, 95.3%, 85.3% y 10.8% a las 24, 36, 48 y 72 horas post coinfección. La viabilidad de las células no infectadas permaneció en niveles cercanos al 100% hasta las 48 horas post infección, reduciéndose posteriormente por un efecto de sobreconfluencia.

La liberación de LDH (Figura 7b) de las células coinfectadas fue significativamente diferente desde las 24 horas post infección hasta las 36 ($p \leq 0.01$), permaneciendo en todos los tiempos analizados por encima del nivel de las infectadas con ICOVIR15 solamente. Los niveles de LDH de las células no infectadas permanecieron cercanos al nivel basal durante todo el experimento.

Ambas medidas son utilizadas para medir la viabilidad celular, la diferencia entre las significancias puede deberse a diferencias de sensibilidad de las técnicas o procesos diferentes de pérdida de viabilidad inducidos por los virus.

En el panel de fotos (Figura 7c) puede verse como la coinfección con un Ad (ICOVIR15) y el AAV6 indujo un cambio morfológico temprano (36h), similar al de apoptosis, con células muy redondeadas y pequeñas, previamente descrito en casos de coinfección con AAV (Timpe et al., 2007). A ese tiempo las células infectadas con ICOVIR15, aún mantenían una morfología similar a las no infectadas, con mínimos signos de efecto citopático, el cual manifestaron completamente a las 72 horas post infección. La observación de células coinfectadas con ICOVIR15 y AAV6 a 100000vp/cel en otros ensayos, no mostró este cambio de morfología temprano, pudiendo ser debido a un fenómeno de autoinhibición por exceso de partículas virales de AAV (Carter et al., 1979).

1.6. Efectos de la coinfección con AAV6 sobre la propagación de ICOVIR15

Una vez vimos que el AAV6 era capaz de aumentar no sólo la liberación del Ad si no también la citotoxicidad de éste, el siguiente paso fue comparar la capacidad de inducir citotoxicidad en un cultivo de células mediante la propagación del ICOVIR15 solo, o coinfectando con AAV6.

1.6.1. Efectos de la coinfección con AAV6 sobre la propagación de ICOVIR15 en dos líneas celulares de tumor humanas infectando con virus desnudo

Con esta finalidad se determinaron los valores de IC_{50} (unidades de transducción por célula necesarias para disminuir un 50% la viabilidad del cultivo celular) bajo varias condiciones. Para ello se infectaron células A549 ó NP9 con diluciones seriadas 1/5 de ICOVIR15 empezando con 200 unidades de transducción (tu) por célula y con 4 dosis iniciales de AAV6 (400, 4000, 40000 y 400000 vp por célula). A los 5 días en el caso de las A549 y a los 6 días en el caso de las NP9, se cuantificaron los valores de IC_{50} . Como puede verse en la Tabla 1 de la figura 8, la coinfección con AAV6 disminuyó dramáticamente los valores de IC_{50} de manera dosis dependiente en ambas líneas celulares. Esto indica que, a parte de aumentar la citotoxicidad del Ad en una ronda de replicación, el AAV6 es capaz de aumentar la capacidad de propagación de ICOVIR15 medida mediante la citotoxicidad en un cultivo celular inducida por múltiples rondas de replicación. Las curvas de dosis-respuesta se muestran en la figura 8, alcanzando la combinación de ICOVIR15 y AAV6 (a cualquier dosis) diferencias significativas comparado con el ICOVIR15 solo en varios puntos.

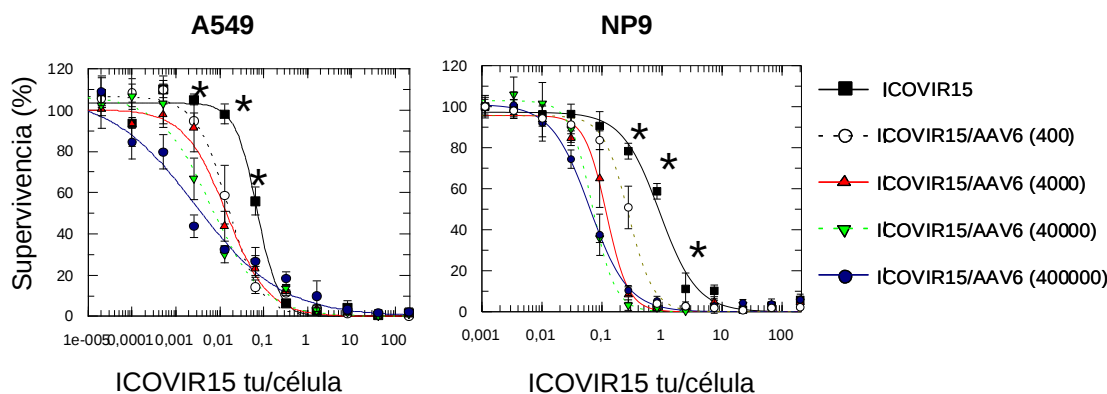


Tabla 1

IC ₅₀	ICovIR15	ICovIR15/AAV6 400	ICovIR15/AAV6 4000	ICovIR15/AAV6 40000	ICovIR15/AAV6 400000
A549	0.07±0.007	0.015±0.002*	0.014±0.002*	0.006±0.001*	0.002±0.001*
NP9	0.908±0.111	0.275±0.017*	0.118±0.009*	0.069±0.003*	0.062±0.005*

Figura 8. La coinfección con AAV6 aumenta la citotoxicidad de ICovIR15 mediada por la propagación del virus en un cultivo celular. Comparación de las curvas dosis-respuesta de ICovIR15 sólo o combinado con AAV6 (400, 4000, 40000 y 400000 vp/célula) en A549 y NP9. A los días 5, para A549 y 6, para NP9, post infección, se lavaron las placas con PBS y se cuantificó la cantidad total de proteína. Para cada punto se hicieron tres replicas. Se muestra la media ±SD. * $p \leq 0.05$ comparado con ICovIR15 más cualquiera de las dosis de AAV6 usadas. (Tabla1). Se muestran los valores de IC₅₀ (Tu/célula de ICovIR15 necesarias para inducir una reducción del 50% de la viabilidad del cultivo celular) obtenidos de las curvas de dosis-respuesta.

1.6.2. Efecto de la coinfección con AAV6 sobre la propagación de ICovIR15 en líneas celulares de tumor murino y de hámster infectando con virus desnudo

Con el fin de comprobar si el aumento de la citotoxicidad y la capacidad de propagación de ICovIR15 al coinfectar con AAV6 se mantenía en líneas más restrictivas a la replicación de Ad humanos, se comparó de nuevo los valores de IC₅₀ entre ICovIR15 y ICovIR15-AAV6 mediante ensayos de citotoxicidad. En este caso se utilizaron las líneas de origen tumoral murino CMT64, y pKln y las líneas Amel 3, HP1 y HAPT1 de hámster. Se infectaron las células con diluciones seriadas empezando con 500 tu (CMT64, Amel 3, HAPT1, pKln) o 1000 tu por célula (HAPT1) de ICovIR15 y 1000 vp por célula de AAV6. Como se observa en la Figura 9, la coinfección con AAV6 sólo fue capaz de disminuir los valores de IC₅₀ de ICovIR15

ligeramente ($p=0.14$) en la línea HAPT1 mientras que en el caso de las líneas Amel 3, CMT64, pKln y HP1 no hubo diferencias en el valor de IC_{50} .

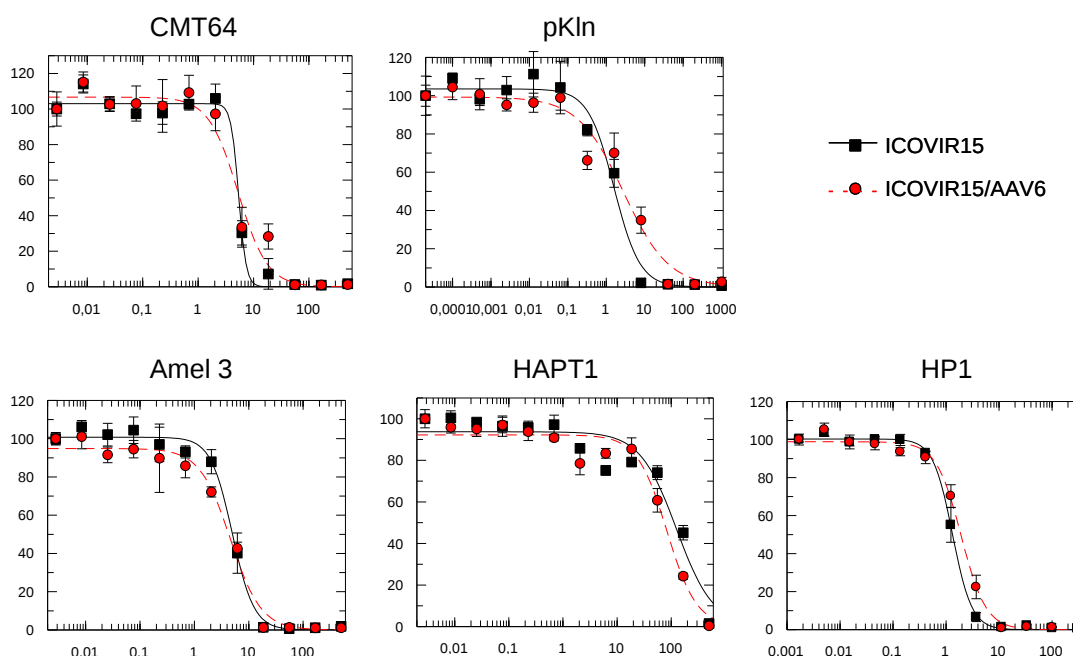


Tabla 2

IC_{50}	CMT64	pKln	Amel3	HAPT1	HP1
ICOVIR15	5.38±0.49	1.59±0.28	4.99±0.33	125.6±29.17	1.32±0.03
ICOVIR15/AAV6	5.25±0.98	2.79±0.96	4.6±0.54	83.11±12.46	1.92±0.12

Figura 9. Citotoxicidad de ICOVIR15 mediada por la propagación del virus en cultivos celulares de ratón y hámster. Comparación de las curvas dosis-respuesta de ICOVIR15 sólo o combinado con AAV6 en líneas de ratón y hámster. Siete días post infección, se lavaron las placas con PBS y se cuantificó la cantidad total de proteína. Para cada punto se hicieron tres replicas. Se muestra la media $\pm$ SD. (**Tabla 2**). Se muestran los valores de IC_{50} (Tu/célula de ICOVIR15 necesarias para inducir una reducción del 50% de la viabilidad del cultivo celular) obtenidos de las curvas de dosis-respuesta.

1.6.3. Efecto de la coinfección con AAV6 sobre la propagación de ICOVIR15 en dos líneas celulares mediante el uso de células transportadoras

Debido a que la coinfección de las células por parte de ambos virus (Ad y AAV) es esencial para observar el fenotipo de calva grande y las características de aumento de liberación viral, de citotoxicidad y de propagación mostradas previamente, pensamos que una estrategia basada en células transportadoras coinfectadas podría ser útil. Para ello y, como en el caso

anterior, se realizaron ensayos de determinación del valor de IC_{50} en cultivos celulares pero en este caso con células infectadas con uno o ambos virus. Células A549 ó NP9 previamente infectadas con ICOVIR15 ó con ICOVIR15 más AAV6, se tripsinizaron, resuspendieron en DMEM y se contaron. Diluciones seriadas $\frac{1}{2}$ empezando con 1000 células de A549 ó 3000 células de NP9 se sembraron por triplicado. Posteriormente se añadieron células de la misma línea (A549 ó NP9) sin infectar y se incubaron durante 7 días, en el caso de las A549, y 9 días en el caso de las NP9. De nuevo la coinfección con AAV6 disminuyó significativamente el valor de IC_{50} en ambas líneas, demostrando así el aumento de la capacidad de propagación del Ad mediante esta estrategia (Figura 10, Tabla 3). En las curvas dosis-respuesta (Figura 10) se observa como la coinfección con ambos virus alcanzó diferencias significativas en varios puntos comparado con ICOVIR15.

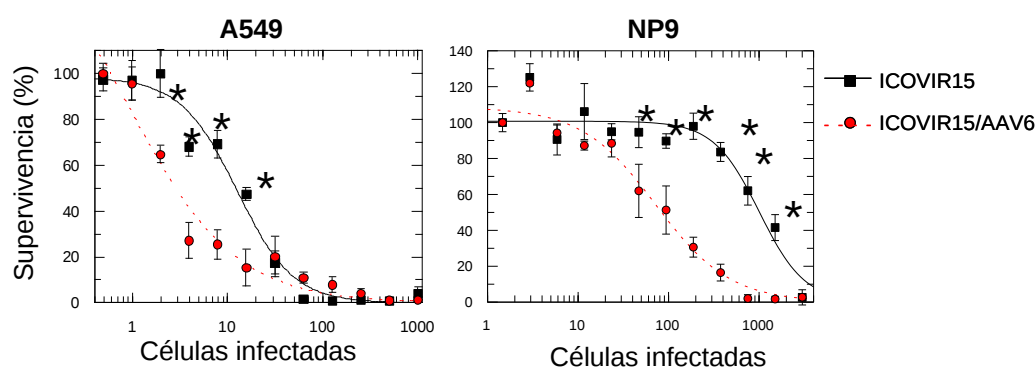


Tabla 3

	IC_{50}	Células infectadas con ICOVIR15	Células infectadas con ICOVIR15/AAV6
A549		12.425±1.959	0.961±1.121 *
NP9		1002.677±188.291	72.12±15.664 *

Figura 10. La coinfección con AAV6 de células transportadoras aumenta la citotoxicidad de ICOVIR15 mediada por la propagación del virus en un cultivo celular. Comparación de las curvas dosis-respuesta, de células A549 o NP9 infectadas con ICOVIR15 sólo o en combinación con AAV6 y añadidas posteriormente sobre monocapas de A549 y NP9 respectivamente, a los días 7-8 post infección. Para cada punto se hicieron tres replicas. Se muestra la media $\pm$ SD. * $p \leq 0.05$ comparado con las células infectadas con ICOVIR15 más AAV6. (Tabla 3). Se muestran los valores de IC_{50} (número de células infectadas necesarias para inducir una reducción del 50% de la viabilidad del cultivo celular) obtenidos de las curvas de dosis-respuesta.

1.7. Ensayos *in vivo*

Con el fin de comprobar si el aumento de citotoxicidad y propagación visto *in vitro* se mantenía al pasar a modelos *in vivo* se realizaron ensayos de eficacia en los dos modelos analizados *in vitro*.

1.7.1. Análisis de la eficacia antitumoral del ICOVIR15 solo o coinyectado con AAV6 en dos modelos de cáncer humanos en ratones inmunodeficientes Balb/c *nu/nu*

Se implantaron subcutáneamente tumores humanos de la línea A549 y NP9 en el dorso de ratones BalBc *nu/nu*. Cuando estos alcanzaron el volumen deseado ($100\text{-}150\text{mm}^3$), se inyectaron intratumoralmente con PBS, AAV6 (2×10^{10} vp/tumor), ICOVIR15 (2×10^9 vp/tumor) o ambos virus en una sola administración a las mismas dosis. En el modelo de A549 (Figura 11a), la coinyección de ambos virus disminuyó el crecimiento tumoral comparado con los grupos control, PBS y AAV6, desde el día 14 post administración ($p < 0.05$). La administración de ICOVIR15 no fue capaz de reducir significativamente el crecimiento tumoral comparado con los grupos control, aunque se aprecia un efecto antitumoral de ICOVIR15 con un inferior crecimiento a lo largo de todo el experimento. Las diferencias entre los grupos inyectados con ICOVIR15, ó con ambos virus, sólo fueron significativas ($p < 0.05$) a día 14, existiendo también una clara tendencia a favor del grupo coinyectado. La diferencia del volumen tumoral medio entre ambos grupos fue de 2.6 veces al finalizar el experimento (día 66).

En el modelo de NP9 (Figura 11a), la coinyección disminuyó significativamente ($p < 0.05$) el crecimiento tumoral comparado con el grupo PBS y AAV6 desde el día 20 post administración y comparado con el grupo tratado con ICOVIR15 desde el día 29 post administración. En este modelo la diferencia en el volumen tumoral medio de los grupos tratados con ICOVIR15 o con ambos virus fue de 1.9 veces a día 48.

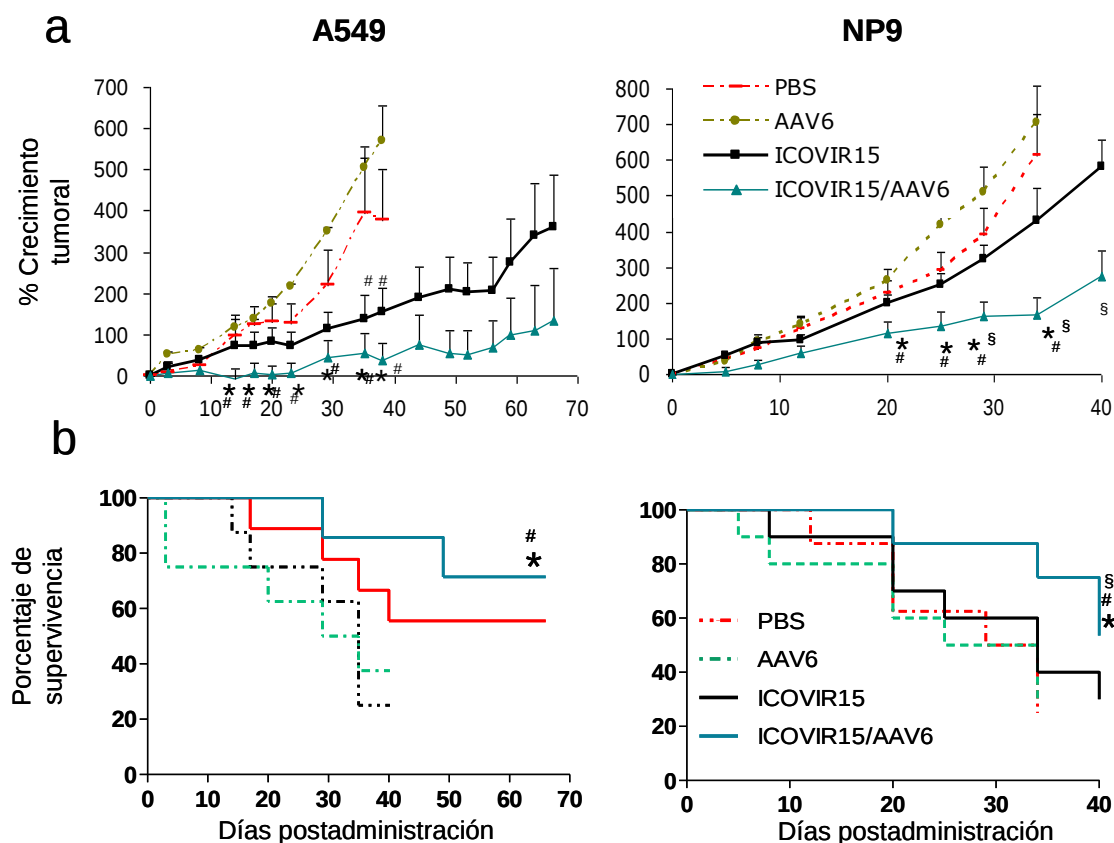


Figura 11. AAV6 aumenta la eficacia oncolítica de ICOVIR15 y prolonga la supervivencia de los ratones en dos modelos xenógrafos de carcinoma humano. Modelos xenógrafos de A549 y NP9 se trataron con una única dosis intratumoral de fosfato tamponado salino (PBS), virus adeno-asociado 6 (AAV6) (2×10^{10} vp/tumor), ICOVIR15 (2×10^9 vp/tumor) o una mezcla de ICOVIR15 y AAV6 a las mismas dosis. **(a)** Crecimiento relativo tumoral (porcentaje del volumen tumoral respecto al inicio del tratamiento, media $\pm$ SE) de 8-10 tumores/grupo. * $p \leq 0.05$ comparado con el grupo PBS. # $p \leq 0.05$ comparado con el grupo AAV6. § $p \leq 0.05$ comparado con el grupo ICOVIR15. **(b)** Curvas de supervivencia Kaplan-Meier. El criterio de punto final se situó en un volumen $\geq 500 \text{ mm}^3$. * $p \leq 0.05$ comparado con el grupo PBS. # $p \leq 0.05$ comparado con el grupo AAV6. § $p \leq 0.05$ comparado con el grupo ICOVIR15.

1.7.2. Supervivencia de ratones con tumores subcutáneos de A549 ó NP9

Después de inyectar intratumoralmente los ratones con tumores de A549 ó NP9, se analizó la supervivencia de estos mediante curvas de Kaplan-Meier (Figura 11 b). El criterio de punto final se estableció en $\geq 500 \text{ mm}^3$ en ambos modelos. La coinyección de ambos virus aumento significativamente ($p < 0.05$) la supervivencia de los ratones comparado con los grupos control, PBS y AAV6, en ambos modelos y comparado con el grupo tratado con

ICOVIR15 en el modelo de NP9. La administración de ICOVIR15 aumento el tiempo de supervivencia medio de los ratones aunque las diferencias no alcanzaron significancia estadística.

Capítulo II

2. Desarrollo de un adenovirus oncolítico canino como tratamiento para la clínica veterinaria y modelo para la clínica humana con adenovirus

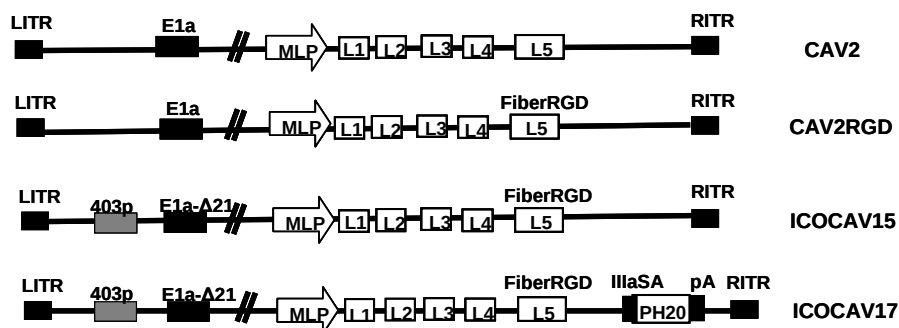
2.1. Construcción de los adenovirus caninos oncolíticos

Con el fin de facilitar la modificación del genoma del Ad canino serotipo 2 (CAV2), se diseñó y generó un plásmido que contenía el genoma de CAV2 y los elementos necesarios para la selección, replicación y amplificación en levaduras (Gimenez-Alejandre et al., 2012), al que denominamos pCAL-CAV2. Una vez tuvimos el genoma del CAV2 clonado en un plásmido que permitiese realizar estrategias de corte y reparación por recombinaciones homólogas se utilizó esta estrategia para generar los diferentes Ad oncolíticos. Los Ad caninos generados se muestran en el esquema 1 y las modificaciones necesarias para construirlos se explican a continuación:

Primero se introdujo un motivo RGD (secuencia RGD) en el *HI-loop* de la fibra del CAV2 (fiber RGD), generando el virus CAV2RGD, homologo al Ad humano AdwtRGD (Dmitriev et al., 1998).

Seguidamente se generó el virus ICOCV15 homólogo a ICOVIR15 (Rojas et al., 2010). ICOCV15 contiene 4 palíndromos imperfectos con 4 lugares de unión a E2F, y un lugar de unión a Sp-I en la posición 403 del genoma del CAV2 (403p). Además contiene una delección de 21 pares de bases en el lugar de unión a pRB de E1a (E1a Δ 21), similar a la Δ 24 humana. También incluye el motivo RGD en la fibra.

En paralelo también se generó una versión de ICOCAV15 sin el motivo RGD en la fibra llamada ICOCAV15noRGD. Este virus no llegó a caracterizarse y por eso no se incluye en el esquema.



Esquema 1. Representación esquemática de los adenovirus caninos empleados en este trabajo. CAV2 es el Ad canino salvaje. CAV2RGD contiene el motivo RGD en el *HI-loop* de la fibra (Fiber RGD). ICOCAV15 fue generado a partir del CAV2RGD insertando 4 lugares de unión a E2F y uno a Sp-I en el promotor endógeno de E1A (403p) y delecionando 21 pares de bases del lugar de unión a pRB (E1a-Δ21). ICOCAV17 fue generado a partir de ICOCAV15 insertando el gen de la PH20 humana detrás de la fibra y controlado mediante el aceptor de corte de la proteína IIIa canina (IIIaSAPH20). MLP: *Major Late Promoter*; pA: señal de poliadenilación.

Para generar el Ad canino con expresión de hialuronidasa, ICOCAV17, el cDNA de la hialuronidasa humana (PH20) se clonó tras el gen de la fibra del ICOCAV15. Este gen se colocó bajo el control del aceptor de corte de la proteína canina IIIa (SAIIIa), y se incluyó una cadena de finalización de traducción o poliA. ICOCAV17 es homólogo al Ad oncolítico humano ICOVIR17 (Guedan et al., 2010).

Todos estos virus fueron generados, amplificados y purificados en células DKCre. Se purificaron por gradientes de Cloruro de Cesio y alcanzaron títulos muy similares de entre 9000 y 10000 partículas virales por célula.

2.2. Caracterización *in vitro* de los Ad oncolíticos caninos

2.2.1 Comparación de la infectividad entre CAV2 y CAV2RGD en 4 líneas tumorales caninas

Para comprobar la bioactividad del CAV2 con el motivo RGD en el *Hi-loop* de la fibra, se comparó la infectividad entre el virus salvaje CAV2 y el virus con el motivo RGD, CAV2RGD. Para esto se infectaron células de las líneas CML1, 17CM98, Abrams y D17 con diluciones seriadas $\frac{1}{2}$ de ambos virus empezando por 1000 partículas virales. Pasadas 24 horas se realizó una inmunotinción de la proteína del hexón y se contaron las células infectadas. En la figura 12a se observa como la inserción del RGD mejoró significativamente ($p < 0.05$) la infectividad en la línea Abrams 1.4 veces y en la línea D17 1.7 veces. En la línea 17CM98 la diferencia fue de 1.15 veces aunque no alcanzó significancia ($p = 0.2$). En las células CML1 no se vieron diferencias de infectividad en ningún sentido.

2.2.2. Actividad del promotor canino de E1A modificado mediante cajas E2F y Sp-I y la delección $\Delta 21$

En los Ad oncolíticos humanos la inserción de cajas E2F y Sp-I en el promotor de E1A, junto a la delección de la zona de unión a pRB ($\Delta 24$) confieren al virus una doble función (Neuman et al 1994; Rojas et al 2010). Por un lado aumentan la potencia oncolítica de estos en células con la vía del Retinoblastoma alterada, y por tanto con grandes cantidades de E2F libre. Las células tumorales son un claro ejemplo. Por otro lado, en células con un crecimiento arrestado o con bajas tasas de replicación, como ocurre en la mayoría de células no tumorales, el complejo pRB-E2F inhibe la transcripción de E1A uniéndose a las cajas E2F y disminuyendo la replicación viral.

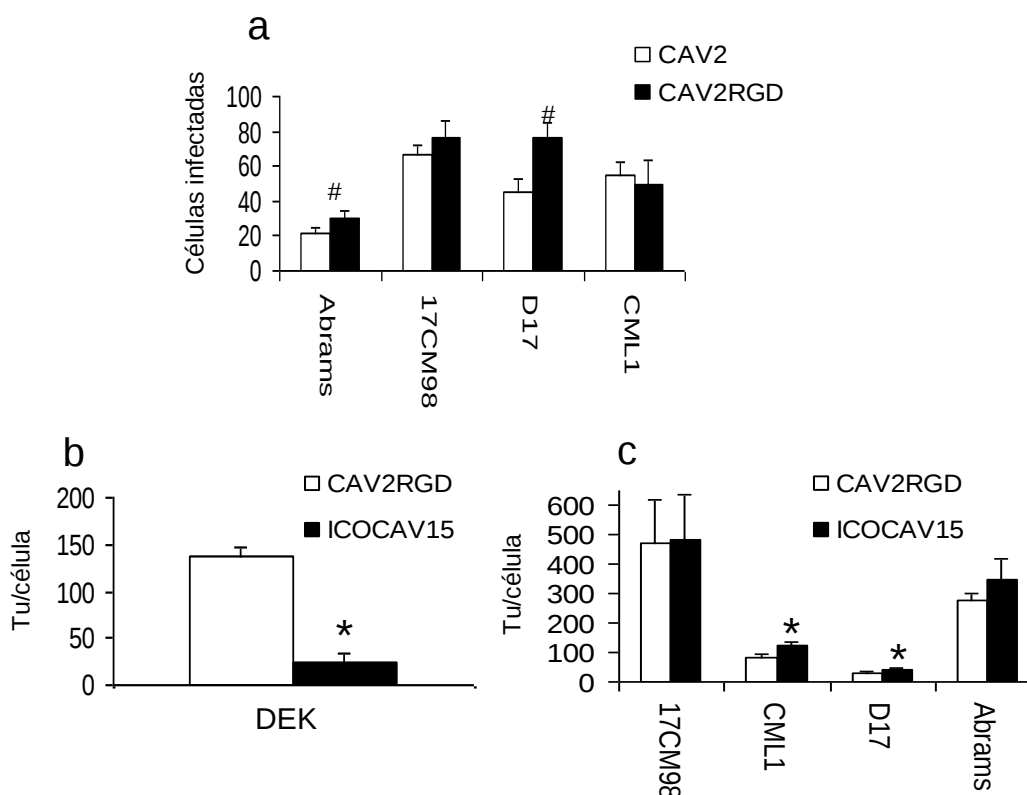


Figura 12. Caracterización *in vitro* de los adenovirus caninos oncolíticos. (a). Comparación de la infectividad de 4 líneas tumorales caninas entre CAV2 y CAV2RGD. Células de las líneas Abrams, 17CM98, D17 y CML1 se infectaron con el mismo número de partículas virales de cada virus. Pasadas 24 horas se realizó una tinción del hexón y se contó el número de células positivas (infectadas). Se realizaron 3 ensayos independientes para cada muestra. Se muestra la media $\pm$ SD. (b) Producción total de ICOCaV15 en una línea celular no tumoral con el crecimiento celular arrestado. Queratinocitos epidérmicos de perro (DEK) se sembraron en una placa de 24 pocillos. Pasados 20 días en confluencia, se infectaron con CAV2RGD e ICOCaV15. Dos días post infección se midió la cantidad total de virus producido. Se realizaron 3 ensayos independientes. Se muestra la media $\pm$ SD. (c) Producción de ICOCaV15 en células tumorales caninas. Células de 4 líneas tumorales fueron infectadas con una dosis que permitió la infección de más del 80% de las células (20 tu/células para D17 y CML1 y 30 tu/célula para Abrams y 17CM98). Dos días post infección se midió la cantidad total de virus producido. Se realizaron 3 ensayos independientes. Se muestra la media $\pm$ SD. # ($p < 0.05$) comparado con CAV2; * ($p < 0.05$) comparado con CAV2RGD.

El promotor modificado de E1A (E2F+ Δ 21), disminuyó la producción total de ICOCaV15 en una línea diferenciada de queratinocitos de perro en un 84% ($p < 0.05$) comparado con la del CAV2RGD (Figura 12b). Por otro lado, aumentó la producción viral en dos (D17 y CML1; $p < 0.05$) de las cuatro líneas tumorales analizadas comparado con su virus parental CAV2RGD, mostrando una tendencia en las otras dos líneas Abrams y 17CM98 (Figura 12c).

2.2.3. Determinación de la expresión de Hialuronidasa de ICOCV17

Con el fin de determinar si la estrategia de construcción empleada para obtener el Ad canino con expresión de hialuronidasa era funcional se realizó un ensayo de degradación (Gmachl et al. 1993) de su sustrato principal, el ácido hialurónico (HA). Para ello se comparó la capacidad de degradación de HA de los sobrenadantes (SN) obtenidos de células infectadas con ICOCV15 ó ICOCV17. Como valores de referencia se incluyeron cuatro muestras con concentraciones conocidas de hialuronidasa purificada (0.4, 4, 40, 400 UI). Como se observa en la figura 13, ICOCV17 fue capaz de inducir expresión de hialuronidasa degradando el HA a un nivel similar a la muestra con 4UI, mientras que los valores de ICOCV15 permanecieron inalterados a todos los tiempos analizados.

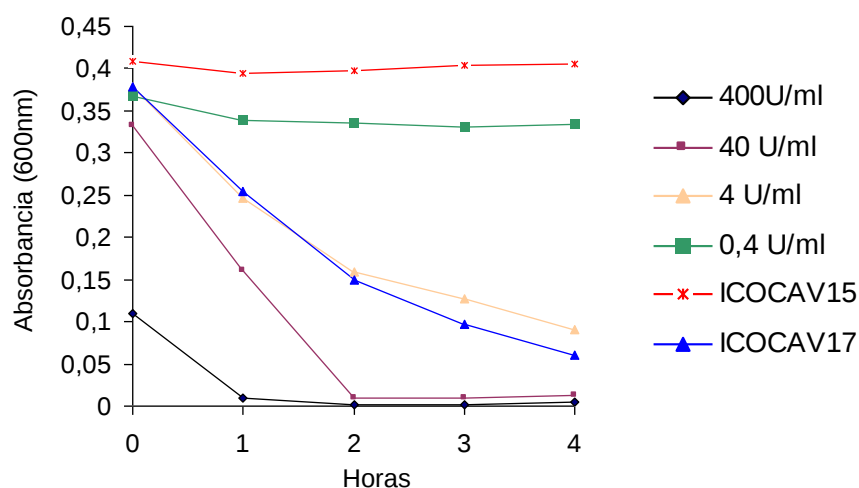


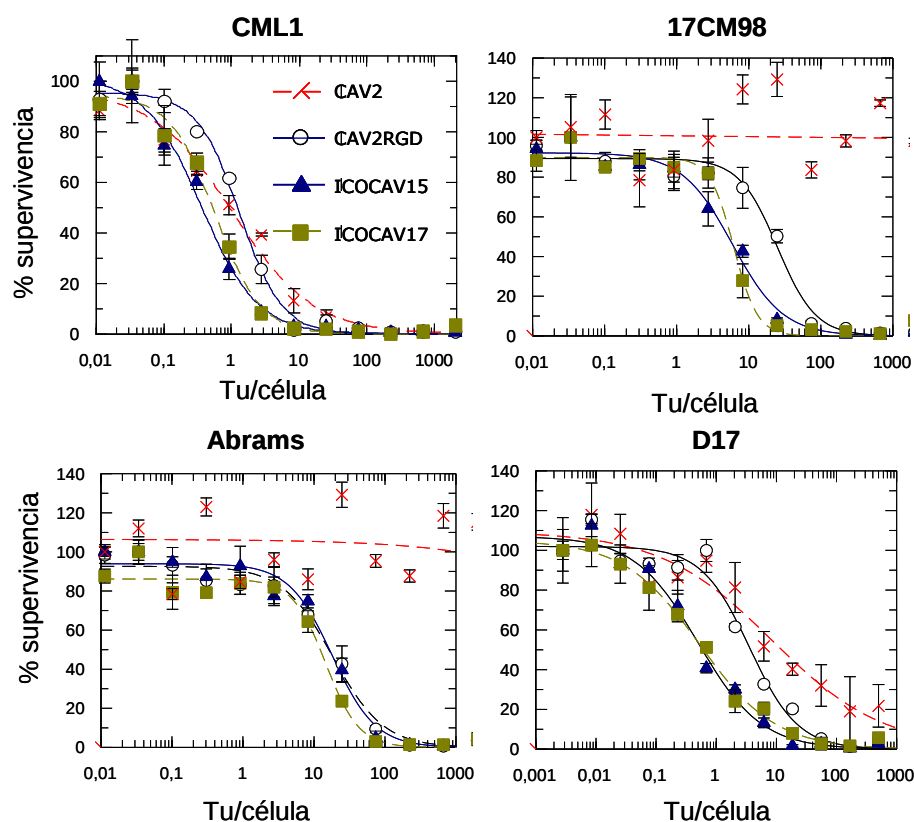
Figura 13. Caracterización de la expresión de hialuronidasa de células infectadas con ICOCV17. Células de la línea DKCre fueron infectadas con ICOCV15 ó ICOCV17 a 20 tu/célula. Pasadas 48 horas, se recogieron los sobrenadantes y se incubaron con una solución de ácido hialurónico durante 0, 1, 2, 3 ó 4 horas para analizarlos posteriormente. Se utilizaron 4 muestras con una concentración conocida de hialuronidasa purificada como referencia. La degradación de HA se midió por absorbancia a (600nm).

2.3. Análisis de la capacidad citotóxica de los adenovirus caninos

Una vez caracterizamos las propiedades de los virus mediante ensayos específicos de infectividad, producción y análisis de la expresión de hialuronidasa quisimos comparar la

capacidad de inducir toxicidad en varias líneas tumorales de perro. Para ello se comparó la citotoxicidad de todos los virus en ensayos con múltiples rondas de replicación permitiendo maximizar las diferencias observadas. Las curvas dosis respuesta se muestran en la figura 14, y en la tabla 4 se muestran los valores de IC_{50} (cantidad de virus necesaria para reducir un 50% la viabilidad del cultivo celular) y sus significancias estadísticas. Bajo las condiciones de infectividad y tiempo utilizadas en estos ensayos, el CAV2 no fue capaz de inducir citotoxicidad ni de propagarse ($IC_{50} \rightarrow \infty$) en dos líneas (Abrams y 17CM98), mientras que los virus con el motivo RGD en la fibra sí. Por otro lado, en la línea D17 el CAV2RGD disminuyó significativamente ($p < 0.05$) 1.9 veces la IC_{50} comparado con el CAV2. El promotor modificado de E1A aumentó la citotoxicidad de ICOCV15 comparado con el CAV2RGD disminuyendo ($p \leq 0.01$) la IC_{50} 3.7 veces, 7.2 veces y 4 veces en las líneas CML1, D17 y 17CM98, respectivamente. Los valores de IC_{50} de ICOCV17 fueron similares a los de su virus parental ICOCV15. En la línea Abrams los valores de IC_{50} de CAV2RGD, ICOCV15 e ICOCV17 fueron similares.

Estos resultados indican que tanto el motivo RGD como la modificación del promotor de E1A aumentan la citotoxicidad de CAV2 en varias líneas tumorales de perro. A la vez la inserción de la PH20 no parece afectar negativamente la citotoxicidad de ICOCV15.



	IC50	CAV2	CAV2RGD	ICOCaV15	ICOCaV17
CML1		1.03±0.31	1.30±0.11	0.35±0.04 * #	0.57±0.07 * #
17CM98		→∞	25.01±3.70*	5.9±0.79 * #	6.1±0.62 * #
Abrams		→∞	18.48±2.74*	18.09±2.69 *	14.61±2.07 *
D17		7.02±1.24	3.59±0.79 *	0.49±0.09 * #	0.53±0.08 * #

Figura 14. Análisis de la citotoxicidad de los adenovirus caninos oncolíticos. Comparación de las curvas dosis-respuesta de los adenovirus caninos en 4 líneas tumorales de perro. Células de diferentes líneas fueron infectadas a diferentes dosis de virus entre 2000 y 0.01 tu/célula para Abrams, CML1 y 17CM98 y desde 500 a 0.01 para D17. Entre 6 y 8 días post infección se calcularon los valores de IC50. Para cada punto se hicieron tres replicas. Se muestra la media ±SD. * $p \leq 0.05$ comparado con CAV2. # * $p \leq 0.05$ comparado con CAV2RGD.

2.4. Ensayos en modelos murinos

Una vez comprobado *in vitro* que las modificaciones hechas en los Ad caninos mostraban mejoras en términos de infectividad (Figura 12a), selectividad (Figura 12b) y citotoxicidad (Figura 14) y demostrada la capacidad de ICOCaV17 de expresar hialuronidasa, pasamos a

estudiar el comportamiento de los Ads caninos en un modelo de ratón y a comprobar si estos beneficios obtenidos *in vitro* eran observables *in vivo*. Para ello realizamos ensayos de biodistribución, de toxicidad por administración intravenosa y ensayos de eficacia por ambas vías de administración, intravenosa e intratumoral.

2.4.1. Biodistribución del Adenovirus canino salvaje CAV2 y el Adenovirus canino CAV2RGD

El tropismo de los Ads humanos administrados sistémicamente ha sido ampliamente estudiado. En el caso de los Ads caninos, el único estudio de biodistribución hasta la fecha, se realizó con OCCAV (Hemminki et al., 2003), un Ad oncolítico canino con cápside salvaje. El estudio se llevó a cabo en perros por Smith y colaboradores (Smith et al., 2006) y demostró que el tropismo de este virus una vez inyectado sistémicamente en su huésped natural se asemejaba al del Ad humano en ratones con un tropismo marcado por el hígado y el bazo. En el caso del ratón este estudio con Ad canino no se ha realizado todavía. Por este motivo quisimos comparar la distribución del Ad canino con una cápside salvaje (CAV2) con nuestro Ad con la cápside modificada (CAV2RGD).

2.4.1.1. Biodistribución en ratón

Para el estudio de la biodistribución en ratón, 1×10^{11} partículas virales de CAV2 ó CAV2RGD se inyectaron sistémicamente en ratones Balb/C. Transcurridas 72 horas, los animales fueron sacrificados y los órganos procesados y congelados. Se extrajo el DNA de las muestras y se analizó la carga viral (vp) por nanogramo de DNA. La figura 15 muestra el resultado obtenido. En este caso parece que el corazón, pulmón, hígado, bazo y riñón son los órganos donde más presencia de Ad hay en ambos casos. El virus con cápside modificada (CAV2RGD) mostró más presencia en riñón, pulmón, testículos y sistema nervioso central comparado con el Ad salvaje CAV2 aunque se observa un aumento generalizado en todos los órganos y estas diferencias .

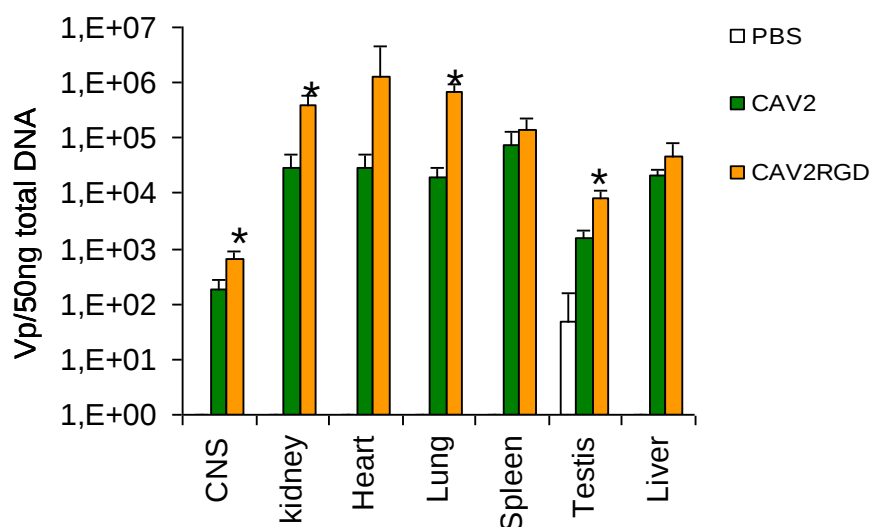


Figura 15. Análisis de la biodistribución de CAV2 y CAV2RGD tras la administración sistémica en ratones Balb/C. Comparación de la distribución del Ad canino salvaje y del Ad canino con el motivo RGD en el *HI-loop* de la fibra tras la administración endovenosa de 1×10^{11} vp de cada uno de los virus. Tres días post inyección se sacrificaron los animales, se extrajeron los órganos y se congelaron. Para cuantificar las partículas virales, las muestras se trituraron y se extrajo el DNA total. El análisis se realizó por RT-PCR. * $p \leq 0.05$ comparado con CAV2.

La interpretación de este resultado debe tener en cuenta que los animales no fueron exsanguinados antes de recolectar los órganos, casualmente los órganos con una cantidad de sangre elevada son los que contienen mayor carga viral.

2.4.1.2. Biodistribución en sangre de perro

Para el estudio de la biodistribución en sangre de perro se obtuvieron muestras de pacientes del Hospital Clínico Veterinario (fundació hospital clínic veterinari, fHCV) de la Universidad Autònoma de Barcelona (UAB). Para ello se extrajo la sangre en tubos con anticoagulante y se puso en contacto con 1×10^9 vp de CAV2 o CAV2RGD. Se dejó en agitación durante una hora a 37°C y se procedió a separar las fases mediante un gradiente de ficol. Se extrajo el DNA de cada una de las fases y se analizó la presencia de partículas virales. Como se observa en la Figura 16a (los resultados se muestran como porcentaje de virus recuperado sobre el total), ambos virus se encontraban mayormente en la fracción que contenía las plaquetas

(>50%), seguido de la fase donde se encontraban los glóbulos blancos (20-30%). Las fracciones del plasma y los eritrocitos contenían menos de un 10% del virus recuperado.

No se pudo hacer un análisis estadístico puesto que las muestras no eran suficientes para realizar los ensayos por triplicado y obtener desviaciones fiables.

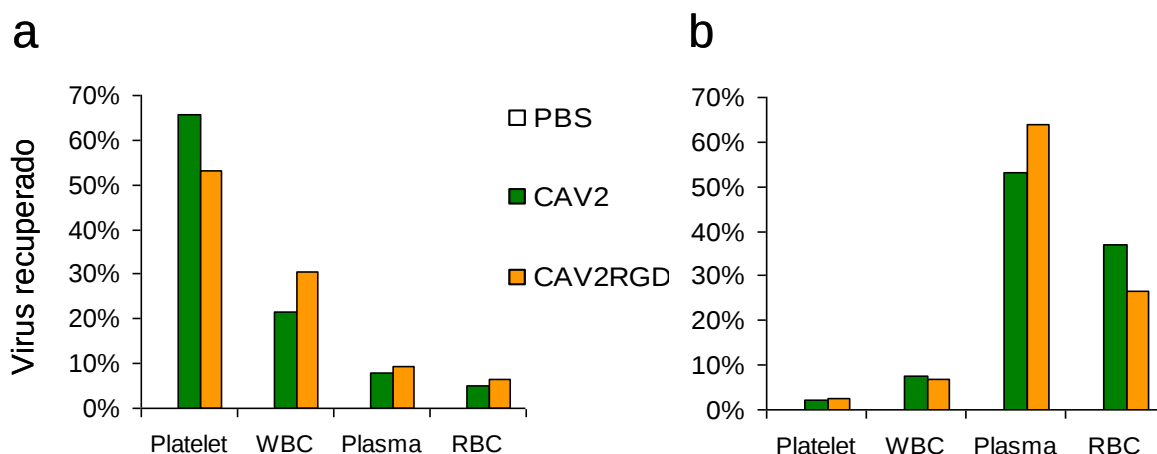


Figura 16. Análisis de la distribución *in vitro* de CAV2 y CAV2RGD en sangre de perro y de ratones Balb/C *nu/nu*. Comparación de la distribución *in vitro* del Ad canino salvaje y del Ad canino con el motivo RGD en el *HI-loop* de la fibra en sangre de perro y de ratón tras su incubación con 1×10^9 vp de cada uno de los virus. Una vez extraída la sangre con anticoagulante se incubó con 1×10^9 vp de CAV2 o CAV2RGD durante 1h a 37°C. Posteriormente se separaron las fases y se extrajo el DNA total. La cantidad de virus se analizó por RT-PCR. El resultado se muestra como % de virus sobre el total recuperado. (a). Distribución en sangre de perro. (b). Distribución en sangre de ratón.

2.4.1.3. Biodistribución en sangre de ratón

Teniendo en cuenta que el resultado de la biodistribución podía indicar que estos virus permanecían en la sangre de ratón, quisimos estudiar específicamente la biodistribución de los virus CAV2 y CAV2RGD, en este componente del organismo. Para ello se extrajo la sangre de ratones en tubos con anticoagulante y se puso en contacto con 1×10^9 partículas virales de CAV2 ó CAV2RGD. Se dejó en agitación durante una hora a 37°C y se procedió a separar las fases mediante un gradiente de ficol. Se extrajo el DNA de cada una de las fases y se analizó

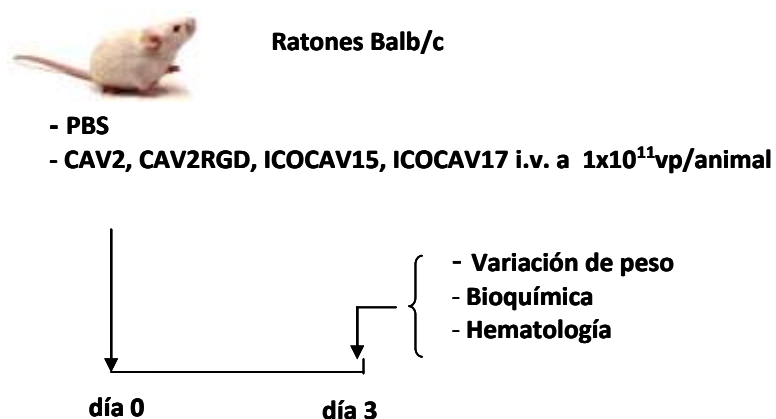
la presencia de partículas virales. Como se observa en la Figura 16b (los resultados se muestran como porcentaje de virus recuperado sobre el total), ambos virus se encontraban mayormente en la fracción que contenía el plasma o los glóbulos rojos, seguido de la fase de los glóbulos blancos y finalmente las plaquetas.

No se pudo hacer un análisis estadístico puesto que las muestras no eran suficientes para realizar los ensayos por triplicado y obtener desviaciones fiables.

2.4.2. Perfil de toxicidad de los adenovirus caninos en ratones

La toxicidad de los adenovirus oncolíticos humanos en ratón está muy bien caracterizada. Múltiples modificaciones han conseguido disminuir la toxicidad asociada a la administración intravenosa de Ad disminuyendo la pérdida de peso, la toxicidad hepática y la trombocitopenia (Cascalló et al., 2007; Rojas et al., 2009 y 2010). En el caso de los adenovirus caninos, esta toxicidad no ha sido estudiada.

Con el fin de determinar por un lado el perfil de toxicidad de los Ad caninos y por otro la capacidad de las modificaciones hechas en el genoma del CAV2 para disminuir esta toxicidad, se inyectaron sistémicamente 1×10^{11} partículas virales de cada uno de los virus en ratones Balb/c (Esquema 2). Los animales se pesaron diariamente y se sacrificaron a día 3 post administración para determinar los niveles de enzimas hepáticas en sangre (ALT y AST) y los parámetros hematológicos.



Esquema 2. Representación de la metodología usada para evaluar la toxicidad de los adenovirus caninos en ratones Balb/C.

Aunque la elevación de enzimas hepáticas ha sido descrita como una de las consecuencias más graves al administrar Ads sistémicamente (Aghi and Martuza, 2005; Nemunaitis et al., 2001), al inyectar Ad caninos, no se vio ninguna elevación de estas enzimas (Figura 17a). En cambio si se observó una marcada trombocitopenia ($p < 0.01$) de alrededor del 90% en todos los grupos comparado con los animales del grupo PBS (Figura 17b). Por otra parte, la pérdida de peso también mostró una toxicidad importante de todos los animales inyectados con virus comparado con el grupo control PBS (Figura 17c). Desde las 24 horas post administración, la administración de virus provocó una pérdida significativa ($p < 0.05$) de peso comparado con el grupo PBS, que alcanzó su punto máximo a las 48 horas post administración. A partir de ese punto los animales de todos los grupos inyectados empezaron a recuperar peso. Esta toxicidad se agudizó en los animales inyectados con virus con RGD en su fibra (CAV2RGD y ICOCaV15) comparado con los grupos inyectados con sus virus homólogos sin RGD (CAV2 y ICOCaV15noRGD, respectivamente) aunque sólo fue significativamente ($p < 0.05$) diferente a las 72 horas cuando los animales habían empezado a recuperar peso. ICOCaV17 provocó una pérdida de peso similar a ICOCaV15, ambos produjeron una toxicidad mayor ($p < 0.05$) a 48 y a 72 horas post administración comparado con el virus CAV2 y comparado con el virus CAV2RGD a las 72 horas post administración.

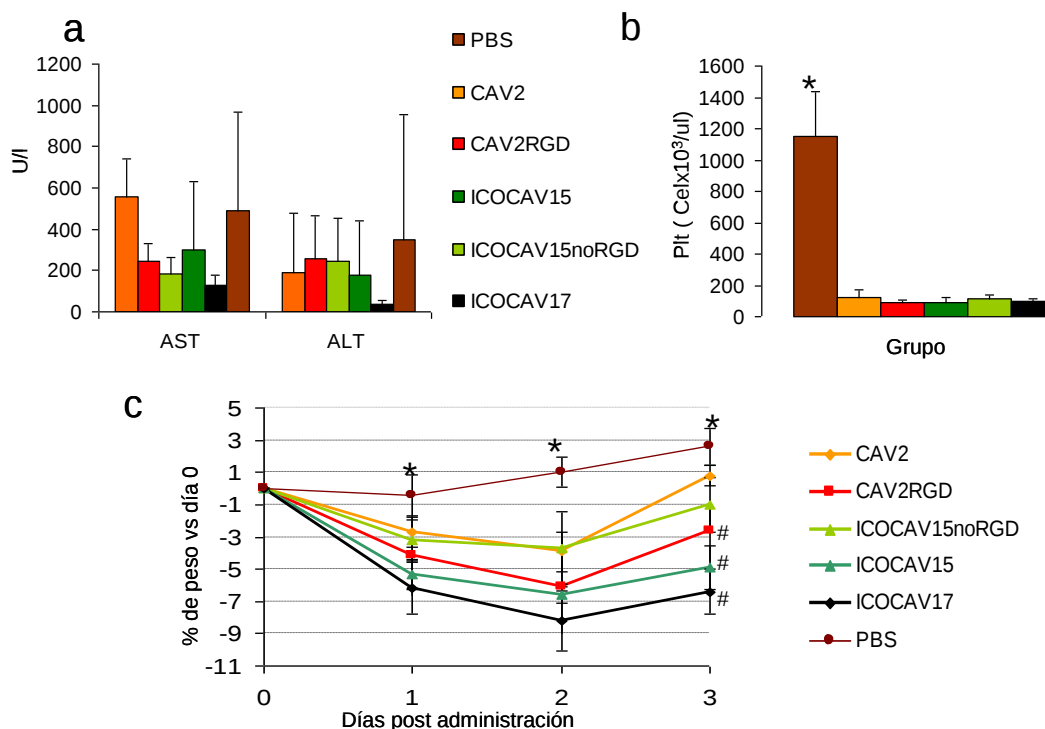


Figura 17. Perfil de toxicidad *in vivo* de los adenovirus caninos en ratones Balb/C. Tres días post administración intravenosa de 5×10^{11} vp de cada uno de los Ad caninos se analizó la concentración de transaminasas en suero, los parámetros hematológicos y la variación del peso. (a). Presencia de transaminasas en suero. (b). Nivel de plaquetas en sangre. (c). Variación del peso corporal. Se muestra la media $\pm$ SD de cada grupo ($n=5$). * $p \leq 0.05$ comparado con todos los grupos administrados con virus. # $p \leq 0.05$ comparado con el grupo administrado con CAV2.

2.4.3. Eficacia antitumoral *in vivo* de los adenovirus caninos

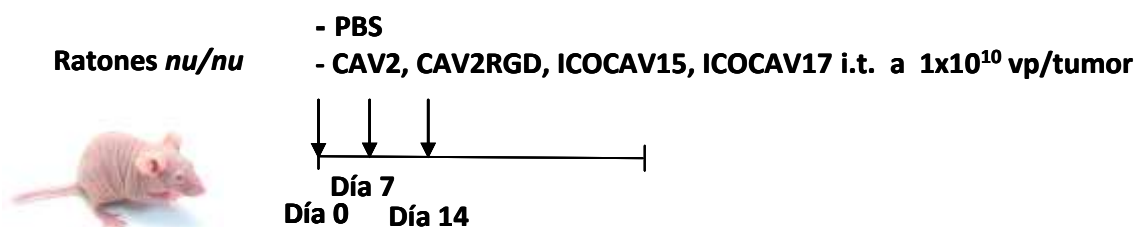
2.4.3.1. Eficacia antitumoral de los adenovirus caninos en un modelo de melanoma canino por administración intravenosa

Tumores de la línea canina de melanoma CML1 fueron implantados en ratones Balb/C *nu/nu*. Cuando el volumen tumoral medio alcanzó los 100 mm^3 , los animales fueron inyectados con PBS o una dosis de 1×10^{11} partículas virales de CAV2, CAV2RGD, ICOCaV15 ó ICOCaV17. Se controló el peso de los animales durante los cuatro días posteriores y el volumen tumoral dos veces por semana. Como se observa en la figura 18a, el crecimiento tumoral de los grupos tratados con virus fue menor que el del grupo PBS, aunque la

significancia se perdió progresivamente. El grupo tratado con ICOCV17 fue el que mantuvo una diferencia significativa durante más tiempo (día 18) comparado con el grupo control PBS. No hubo diferencias entre grupos tratados con virus.

2.4.3.2. Eficacia antitumoral de los adenovirus caninos en dos modelos tumorales caninos por administración intratumoral

Para comprobar la eficacia intratumoral de los adenovirus caninos en modelos *in vivo*, tumores de las líneas caninas de Osteosarcoma (Abrams) y de Melanoma (CML1) fueron implantados en el dorso de animales Balb/C *nu/nu*. Cuando estos alcanzaron volúmenes medios de entre 100 y 150 mm³ los animales fueron inyectados con 25 ul de PBS o una dosis de 1×10^{10} vp de CAV2, CAV2RGD, ICOCV15 ó ICOCV17 diluidos en 25 ul de PBS por tumor. Esta dosis se administró tres veces (Esquema 3), una vez por semana (día 0, 7 y 14). Se monitorizó el peso de los animales durante los tres días post administración sin que estos perdieran peso. El volumen tumoral se monitorizó dos veces por semana hasta el sacrificio. En el modelo Abrams, ICOCV17 redujo ($p < 0.05$) el volumen tumoral al final



Esquema 3. Representación de la metodología usada para evaluar la eficacia intratumoral de los adenovirus caninos en ratones *nu/nu*.

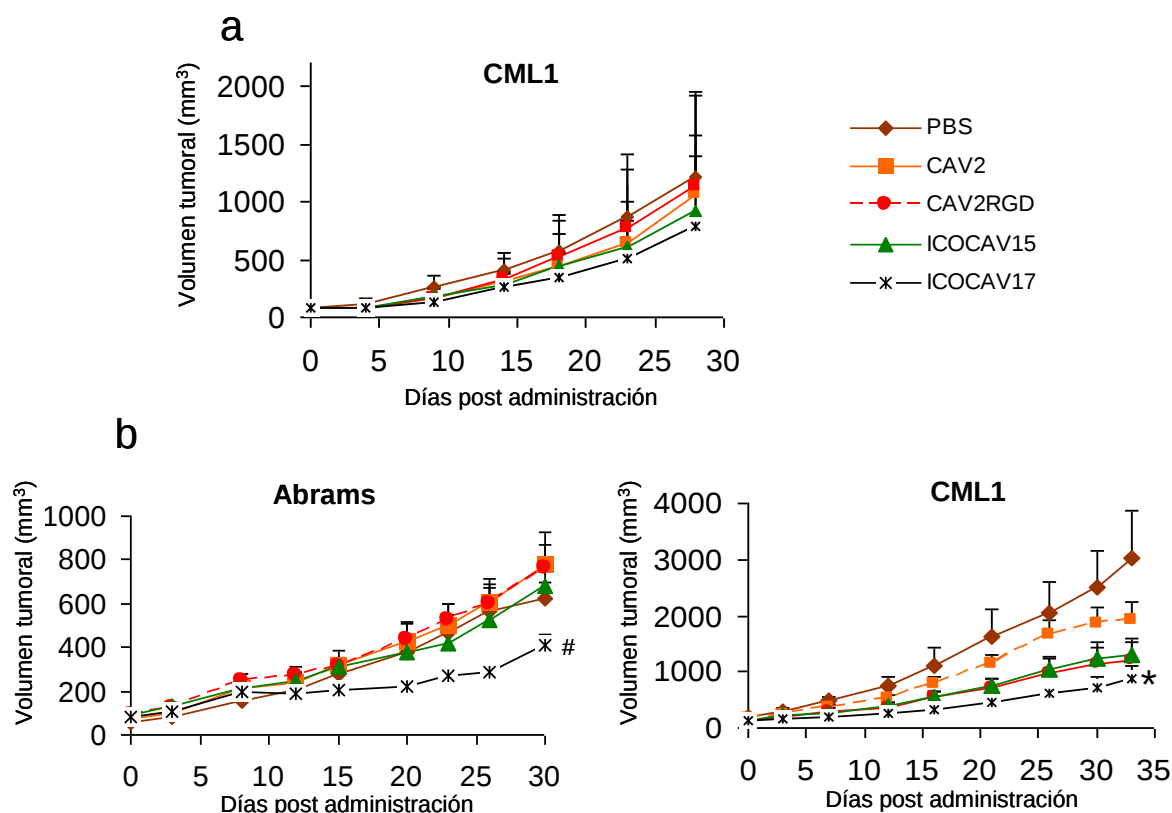


Figura 18. Eficacia terapéutica in vivo de los adenovirus caninos en dos modelos tumorales caninos xenógrafos de ratón. Modelos xenógrafos de osteosarcoma (Abrams) y melanoma (CML1) se trataron con: (a) una única dosis endovenosa de fosfato tamponado salino (PBS) ó 1×10^{11} vp/tumor de CAV2, CAV2RGD, ICOCAV15 ó ICOCAV17; (b) tres dosis intratumorales (día 0, 7 y 14) de PBS ó 1×10^{10} vp por tumor de CAV2, CAV2RGD, ICOCAV15 ó ICOCAV17 (esquema 3). Se representa la media de los valores de volumen tumoral $\pm$ SE (n=10-12). # $p \leq 0.05$ comparado con todos los grupos. * $p \leq 0.05$ comparado con los grupos PBS y CAV2.

del experimento (día 30) 1.52 veces comparado con el grupo PBS, 1.91 veces comparado con el grupo tratado con CAV2, 1.87 veces comparado con el grupo tratado con CAV2RGD y 1.67 veces comparado con el grupo tratado con ICOCAV15. En el modelo CML1 el grupo tratado con ICOCAV17 redujo ($p < 0.05$) el volumen tumoral 5 veces respecto el grupo PBS y 2.7 veces respecto el grupo tratado con CAV2 en el momento de sacrificio de los animales. Aunque las diferencias entre el volumen tumoral de los grupos ICOCAV15 y PBS no alcanzó diferencias significativas, las diferencias en porcentaje de crecimiento tumoral sí lo lograron a día 7 y 12 ($p < 0.05$).

2.4.3.3. Supervivencia de ratones inyectados intratumoralmente

Después de inyectar intratumoralmente los ratones con tumores Abrams o CML1, se analizó la supervivencia de estos mediante curvas de Kaplan-Meyer (Figura 19). El criterio de punto final se estableció en $\geq 500\text{mm}^3$ en ambos modelos. En el modelo de Abrams la administración de ICOCAV17 aumento la supervivencia de los ratones comparado con todos los grupos ($p<0.05$). En el modelo de CML1, ICOCAV17 aumento la supervivencia comparado con el grupo control PBS y el tratado con el Ad canino salvaje CAV2 ($p<0.05$). En este modelo, ICOCAV15 prolongó la supervivencia media de los ratones de 13 y 15 días a 20.5 días comparado con el grupo PBS y el grupo CAV2 respectivamente ($p=0.058$).

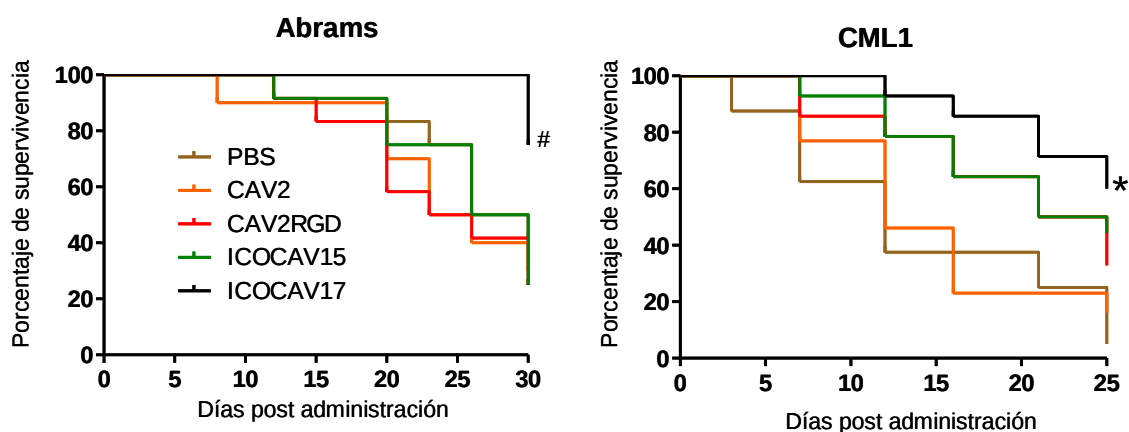


Figura 19. Supervivencia de los ratones después de la administración intratumoral de los adenovirus caninos. Curvas de supervivencia Kaplan-Meyer de modelos xenógrafos de Abrams y CML1 tratados intratumoralmente (esquema 3). El criterio de punto final se estableció en $\geq 500\text{mm}^3$. * $p\leq 0.05$ comparado con todos los grupos. # $p\leq 0.05$ comparado con los grupos PBS y CAV2.

2.5. Determinación de la presencia de ácido hialurónico (HA) en tres modelos xenógrafos de tumor canino

Con el fin de determinar la presencia o ausencia de HA en varios modelos tumorales caninos, se realizó una inmunotinción del HA en cortes parafinados de estos tumores. En la figura 20 se observa como los tumores de las líneas CML1 y Abrams muestran mayor cantidad

(precipitado marrón) de HA que los tumores de 17CM98, donde la detección de HA fue mínima.

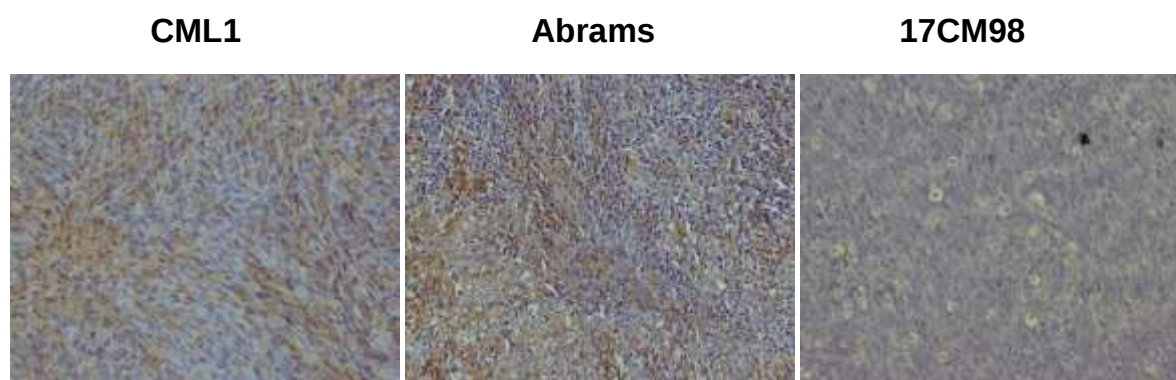


Figura 20. Detección de ácido hialurónico en tres modelos xenógrafos de perro. Detección de ácido hialurónico en tumores xenógrafos de CML1, Abrams y 17CM98. La detección se realizó por tinción inmunohistoquímica mediante la proteína biotinilada de unión a ácido hialurónico (HABP-b). Amplificación x200.

2.6. Casos clínicos

Una vez comprobada la eficacia de ICOCAV17 y presentando un perfil de seguridad por vía intratumoral muy bueno (ningún animal presentó efectos adversos), procedimos a tratar pacientes caninos. El cáncer tiene una incidencia elevada en humanos pero también en perros. Además en el caso de los perros, los tratamientos no están tan desarrollados, suelen ser de carácter paliativo (Patil et al., 2012) ya que suelen ser trasladados desde la clínica humana y no obtenidos específicamente para la clínica canina, lo que provoca altas tasas de mortalidad (>50% en perros mayores de 10 años; Hansen et al., 2004). Por tanto, un elevado número de pacientes no dispone de alternativas o posibilidades para luchar contra la enfermedad.

A continuación se detallan los cinco casos y en la tabla 4 se presenta un resumen esquemático de todos ellos.

2.6.1. Caso I

Historia clínica: Husky macho no castrado de 14 años de edad, se presentó en el Hospital Clínico Veterinario (Fundació Hospital Clínic Veterinari) de la Universidad Autònoma de Barcelona (UAB) con una masa subcutánea localizada en la zona del prepucio. Dos años antes se había extirpado quirúrgicamente un adenoma de glándulas sebáceas en la misma región. Debido a la masa, el perro presentaba disuria. La biopsia por aspiración fina confirmó un adenoma infiltrativo. Debido a las condiciones de edad, estado físico general y los resultados esperados mediante el uso de tratamientos convencionales, se rehusó el uso de cirugía y quimioterapia. Se propuso el tratamiento intratumoral con ICOCV17 siendo aceptado por los propietarios.

Evolución clínica y respuesta al tratamiento: En el examen físico el paciente presentaba una condición general pobre con debilidad del tercio posterior marcada. Los análisis bioquímicos y hematológicos no mostraron ninguna alteración. El perro fue inyectado intratumoralmente con una dosis de ICOCV17 de 1×10^{12} vp diluidas en un mililitro de PBS estéril. Pasadas 24 horas apareció un sangrado leve en uno de los puntos de administración que reverteió en pocas horas. A los 21 días post administración se observó pirexia leve (39.6°C) por una causa ajena al tratamiento experimental. Al tratar la causa de la fiebre con antibióticos ésta reverteió. Ni los exámenes físicos ni las bioquímicas o hematologías realizadas mostraron signos de toxicidad durante todo el tratamiento. Los ensayos de coagulación incluyendo el PT (tiempo de protrombina), PTT (tiempo de tromboplastina activada) o los niveles de fibrinógeno tampoco mostraron alteraciones.

Los problemas de micción desaparecieron a las 72 horas post administración por una reducción del volumen tumoral. Durante al menos 6 meses el tumor fue decreciendo llegando a perder un 51% de su volumen (RECIST, *Response Evaluation Criteria in Solid Tumors*). En la figura 21 se muestran tanto las medidas hechas mediante pie de rey, largo y ancho, como las realizadas por ecografía, midiendo la profundidad del tumor, a día 0 (día de administración) y a día 180 post administración. En las sucesivas revisiones el volumen tumoral permaneció sin cambios hasta once meses después cuando se detectó un crecimiento de la masa con unas medidas similares a las del inicio del tratamiento.

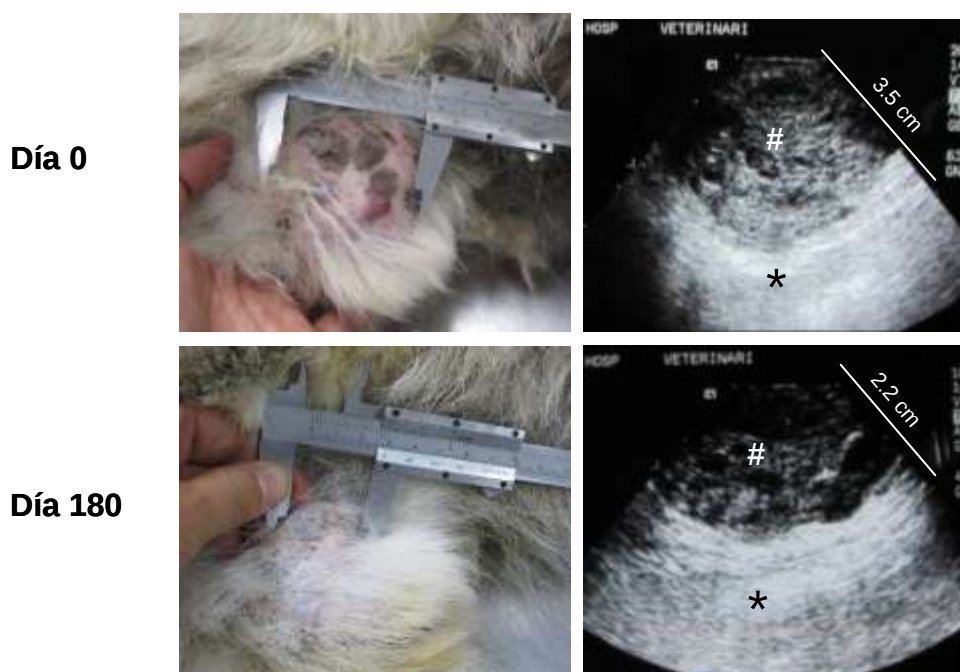


Figura 21. Respuesta terapéutica después de una única dosis intratumoral de ICOCV17 en un paciente de adenoma infiltrativo. El paciente I se presentó en el Hospital Veterinario con problemas de micción debido a una masa en la zona prepucial. Se diagnosticó una recidiva de un adenoma previamente resecado mediante cirugía. Se administró 1×10^{12} vp de ICOCV17 intratumoralmente (día 0). En ese momento el volumen tumoral era de 5.6cmx5cmx3.5cm. Seis meses después el tumor se había reducido un 51% (RECIST) con un volumen de 2.9cmx2.8cmx2.2cm (día 180). El volumen se midió mediante pie de rey (panel izquierdo) y mediante ecografía (panel derecho). # tejido tumoral; * tejido normal.

2.6.2. Caso II

Historia clínica: Un macho no castrado de Podenco Ibicenco de 7 años de edad con lesiones compatibles con osteosarcoma agresivo en la región proximal del húmero derecho, se presentó en el Hospital Veterinario de la UAB. El paciente presentaba una masa en la zona humeral y una cojera marcada que no le permitía apoyar la extremidad. La masa se había detectado un mes antes, aunque la actividad del perro no se vio comprometida hasta pasadas tres semanas. Mediante rayos X se detectó una fractura del húmero y múltiples nódulos pulmonares compatibles con lesiones metastásicas (Figura 22). En el momento de la exploración el paciente mostraba un estado general bueno, con un nivel de alerta y apetito correcto y sin alteraciones hematológicas o bioquímicas excepto un leve aumento de la

fosfatasa alcalina (ALPK). El propietario declinó la eutanasia y los protocolos convencionales, seleccionando al paciente para el tratamiento experimental con ICOCV17.

Evolución clínica y respuesta al tratamiento: Se administró ICOCV17 guiado por ecografía en cuatro puntos del tumor primario. La inflamación de la zona impidió diferenciar exactamente las zonas tumorales de las de tejido sano. Durante las 48 horas post administración se detectó inflamación con aumento de temperatura en las zonas administradas, revertiendo poco después.

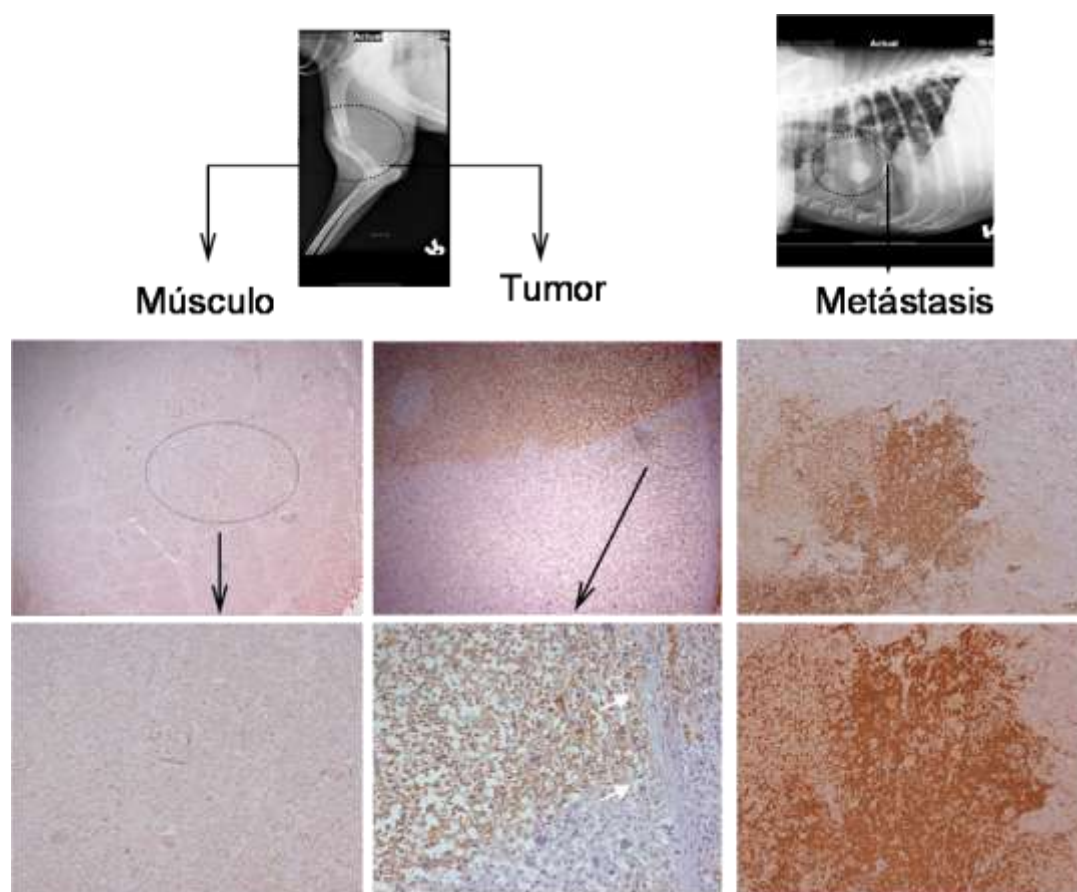


Figura 22. Inmunohistoquímica de tejido sano, tumor primario y metástasis pulmonar de un paciente de osteosarcoma (Caso II). El paciente II padecía un osteosarcoma en la extremidad anterior derecha. Se inyectó ICOCV17 en cuatro puntos del tumor usando un ecógrafo como guía. El paciente fue eutanasiado a los 11 días debido a una herida abierta. En el estudio anatomopatológico se encontraron amplias zonas de necrosis en la lesión primaria y también en uno de los nódulos metastásicos pulmonares. Se realizó una detección de Ad mediante inmunohistoquímica de cortes parafinados de todos los tejidos (muscular, tumor primario, metástasis pulmonar). Se detectó replicación viral en la lesión primaria y también en la región necrotizada del nódulo pulmonar. En el tejido sano (músculo) circundante a los puntos de administración no se detectó replicación. En el panel central se observa una barrera fibrótica (área amplificada, flechas blancas). Panel superior: 100x. Panel inferior: 200x.

No se observaron síntomas de toxicidad en el análisis hematológico ni bioquímico y los exámenes físicos no mostraron un empeoramiento de la calidad de vida del paciente. El volumen tumoral no se redujo de forma detectable por ecografía ni radiografía. Diez días post administración se detectó en el examen físico una herida abierta, con sangrado y pérdida de tejido. Esta herida se localizó distalmente al punto más distal de administración. La causa más probable fue una amputación del tejido que cubría la zona tumoral inyectada. Debido al mal pronóstico del paciente y la herida se decidió eutanasiar al perro. En el examen histopatológico se detectaron amplias zonas de necrosis en los puntos del tumor administrados con virus, mientras que las zonas de tejido sano, que fueron administradas por error, solamente mostraron ligeras hemorragias. En una de las lesiones metastásicas también se observaron focos de necrosis. Posteriormente, se detectó replicación viral mediante la inmunotinción de estas muestras contra proteínas de la cápside viral. En la figura 22 se pueden observar ambas muestras (Tumor y Metástasis). A modo de control, también se tiñó una muestra de tejido muscular adyacente, donde no se pudo detectar replicación viral (Figura 22, Músculo).

2.6.3. Caso III

Historia clínica: Un macho Labrador Retriever, no castrado, de 7 años de edad, se presentó en el Hospital Veterinario de la UAB con un mastocitoma (MCT) en la zona torácica. El tumor había sido eliminado quirúrgicamente. Un mes después el propietario detectó un nódulo en la misma zona, que mediante biopsia por aspiración fina fue diagnosticado como una reaparición del MCT. Se aplicaron los protocolos convencionales de quimioterapia con Vinblastina, Prednisona y Lomustina sin respuesta o beneficio. Se aplicó también un tratamiento con Toceranib, un inhibidor de la tirosinasa, sin efecto alguno. El tumor empezó a sangrar y se ulceró. Desde el momento del inicio del tratamiento con quimioterapia el volumen aumentó un 200% (RECIST). Debido a la pobre respuesta terapéutica el paciente fue seleccionado para el tratamiento con ICOCAV17. Las sinergias descritas mediante el uso combinado de quimioterapia con hialuronidasa (Baumgartner et al., 1998; Desoize et al.,

2000) y la rápida evolución del tumor nos condujo a mantener el tratamiento con Toceranib. También se administraron analgésicos y antibióticos de amplio espectro.

Evolución clínica y respuesta al tratamiento: el paciente fue diagnosticado de MCT de grado II (Patnaick et al., 1984). Los análisis hematológicos y bioquímicos realizados antes de la administración del virus mostraron una elevación leve de enzimas hepáticas (ALT y ALKP), una ligera anemia (Hematocrito 26%) y trombocitopenia. Debido al volumen tumoral se administró el virus en diez puntos diferentes. Durante las 48 horas posteriores a la administración del virus se observó una marcada inflamación del tumor con protrusión hacia el exterior. A las 72 horas el tumor empezó a retraerse y se detectaron áreas de necrosis. El volumen tumoral se redujo progresivamente hasta 10 días post administración. Los valores hematológicos y bioquímicos no cambiaron durante la primera semana, después se empezaron a observar signos de fallo renal y hepático con elevación de los valores de creatinina y enzimas hepáticas. Debido a la naturaleza inflamatoria intrínseca de los mastocitos que componen el MCT, la lisis masiva de estas células tumorales durante varios días indujo un proceso inflamatorio generalizado. Esta respuesta inflamatoria junto con el estado inestable del paciente causado por el sangrado del tumor provocó un fallo sistémico. El paciente se eutanasió 10 días después de la administración. En ese momento el volumen tumoral se había reducido en un 70% (RECIST) (Tabla 4). En la necropsia se observaron infartos en diversos órganos como riñón, hígado, bazo y corazón, con petequias e ictericia. En conjunto, estos síntomas, condujeron a un diagnóstico de coagulación intravascular diseminada (CID). El CID es una patología compleja de origen multifactorial común en perros causada por un estado de coagulación y sangrado coexistentes. Estados de viremia, liberación de agentes inflamatorios o daños directos sobre el endotelio pueden inducir un CID.

2.6.4. Caso IV

Historia clínica: Un macho no castrado de Golden Retriever de 7 años de edad con un osteosarcoma humeral diagnosticado previamente se presentó en el Hospital Veterinario de la UAB. La amputación de la extremidad fue rechazada por el propietario. Se trató al

paciente con quimioterapia convencional, antiinflamatorios no esteroideos e inhibidores de tirosinasa. Pasados dos meses y medio desde el inicio del tratamiento no se observó ningún beneficio terapéutico y un estado de enfermedad progresiva era evidente. Además se observaron lesiones compatibles con metástasis en la escápula y la apófisis espinosa de una vértebra torácica. El paciente fue seleccionado para el tratamiento con ICOCAV17. Debido a la rápida progresión de la enfermedad y la eficacia vista en el caso anterior también se mantuvo la concomitancia entre el tratamiento con Toceranib y el nuevo tratamiento con virus.

Evolución clínica y respuesta al tratamiento: en los análisis hematológicos y bioquímicos previos a la administración del virus sólo se observó una ligera elevación de ALKP. Una vez administrado el virus en la lesión tumoral principal (húmero), se observó inflamación de las zonas inyectadas. No se observaron signos de toxicidad en la bioquímica, la hematología o los ensayos de coagulación, en ningún momento. La inflamación de las zonas inyectadas dio paso a una estabilización del crecimiento localizada específicamente en esas zonas, aunque la periferia del tumor progresó. En este caso no se observaron signos de actividad del virus ni ningún beneficio en términos de calidad de vida. Dos meses después el paciente fue eutanasiado.

2.6.5. Caso V

Historia clínica: Pastor Catalán de 15 años de edad, hembra castrada. Se presentó en el Hospital Veterinario de la UAB con historial de fibrosarcoma en la extremidad anterior derecha en la zona distal del cubito, tratado previamente con radioterapia y extirpación quirúrgica. Se rehusó la amputación. La bioquímica, la hematología y el examen físico no mostraron desorden alguno. Debido a la recidiva del tumor el perro fue seleccionado para el tratamiento con ICOCAV17 previo a una nueva extirpación quirúrgica.

Evolución clínica y respuesta al tratamiento: ICOCAV17 se administró en seis puntos diferentes diluido en un mililitro de PBS. Se observó inflamación del tumor después de la

administración del virus. A esta inflamación, le siguió un crecimiento progresivo del tumor 10 días después de la administración. No se observó ningún signo de toxicidad durante todo el proceso. Pasados 15 días el tumor fue extirpado quirúrgicamente. El estudio anatomopatológico reveló zonas de replicación viral, aunque no se observaron zonas de necrosis. También se detectaron zonas del tumor sin presencia viral (Figura 23). El perro se recuperó normalmente de la intervención y no se ha detectado recidiva del tumor después de 6 meses.

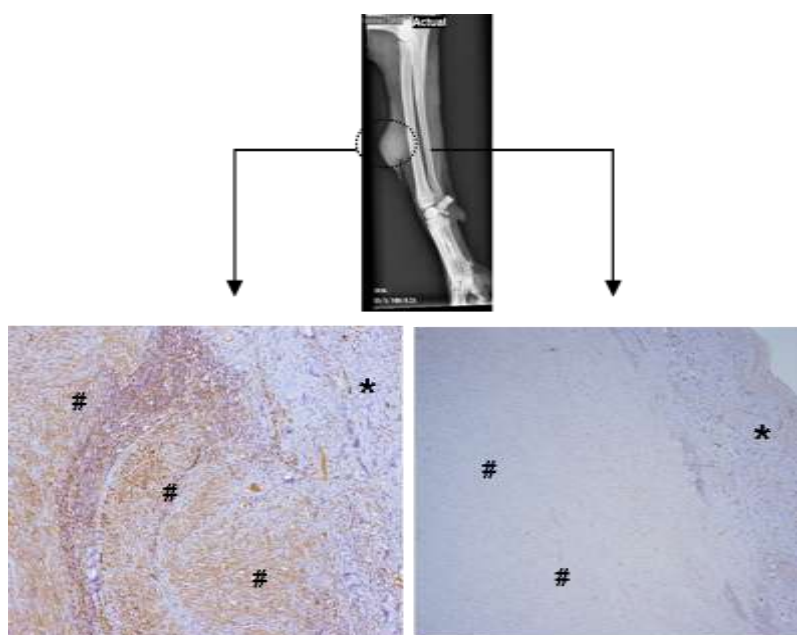


Figura 23. Presencia de virus en un tumor de fibro-sarcoma detectado mediante inmunohistoquímica.

Se presentó al Hospital Veterinario un Pastor Catalán con una recidiva de fibrosarcoma en la región distal de cubito. En este caso se realizó una nueva aproximación de tratamiento con ICOCAV17 previa a la extirpación quirúrgica del tumor. El tumor se reseccionó 15 días después de la administración y se incluyó en parafina. Secciones desparafinadas fueron teñidas con un anticuerpo contra proteínas tardías del adenovirus para detectar replicación viral. Panel izquierdo: detección de Ad (precipitado marrón) en una zona tumoral subcutánea. Panel derecho: Corte tumoral sin detección de Ad. (*) piel; (#) tumor. Amplificación x100.

2.6.6. Ensayos de control de los pacientes tratados

Con el fin de controlar diferentes variables de la cinética de los virus una vez administrados en pacientes y la respuesta de los pacientes a esta administración se realizaron diversos ensayos.

2.6.6.1. Cuantificación de los títulos de anticuerpos

Todos los pacientes presentaban anticuerpos contra CAV2 antes del tratamiento. La vacunación rutinaria de los perros con CAV2 hace que la mayoría de perros presenten inmunidad. Como se observa en la tabla 4 todos los pacientes desarrollaron una respuesta inmune aumentando los títulos de anticuerpos después de la administración de ICOCV17. Los títulos aumentaron progresivamente excepto en el caso V donde la última lectura fue inferior a la anterior.

2.6.6.2. Cuantificación de la carga viral en sangre

Los niveles de virus en sangre se cuantificaron por qPCR. Los datos del Caso III no están disponibles ya que no se dispuso de muestras. Los niveles de virus a diferentes tiempos se muestran en la tabla 4. Sólo se pudo cuantificar el virus en sangre a tiempos cortos (días 1-4). Los niveles fueron disminuyendo progresivamente. La última detección de virus fue a día 7 post administración en el caso IV. Posteriormente no se detectó virus en ninguna muestra.

2.6.6.3. Detección de partículas virales infectivas en secreciones

Con el fin de asegurar que no se eliminaban partículas infectivas al medio, pudiendo transmitirse el virus a otros animales, se analizaron las secreciones de los pacientes (saliva, orina y heces) mediante una técnica de tinción de la cápside viral o anti-hexón. En ningún caso se detectaron partículas infectivas que pudieran dar pie a transmisiones de virus.

Nuestros datos indican que la administración de ICOCV17 por vía intratumoral parece segura. La CID desarrollada por un paciente ha sido debida probablemente a la naturaleza inflamatoria del tumor y a la actividad lítica viral en la lesión tumoral. No se han observado

otros signos de toxicidad. Hemos observado eficacia y diferentes muestras de actividad viral en 4 de 5 pacientes con reducciones importante del volumen tumoral en dos pacientes. Estos resultados sugieren que el uso de nuestro candidato en pacientes oncológicos caninos puede ser de gran utilidad frente a la enfermedad oncológica, pudiendo crear sinergias con diferentes terapias convencionales.

Tabla 4. Resumen de los pacientes tratados.

ID	Tumor	Quimioterapia concomitante	Anticuerpos neutralizantes (días post tratamiento)					Carga viral en sangre (vp/ml) (días post tratamiento)					RECIST (%)	Respuesta Otros criterios ^a (bioactividad viral)	Supervivencia (días)
			0	3-5	7-10	11-15	>15	0	1-2	3-4	5-10	>15			
Caso I	Adenoma infiltrativo	No	80	640			32000	0	1.1x10 ⁵	3.5x10 ⁴		0	PR (-51%)	Mejora QoL	>300 ^c
Caso II	Osteosarcoma	No	2560	5120	128000	256000		0	1830	<500	<500		SD	QoL estable (necrosis en tumor primario y metástasis)	11
Caso III	Mastocitoma	Si ^b	640	1280	1280								PR (-70%)	Empeoramiento de QoL	10
Caso IV	Ostosarcoma	Si ^b	160		16000	256000	512000	0	1.2x10 ⁵	9.8x10 ⁵		0	PD	QoL estable (estabilización del tumor en zonas de	70
Caso V	Fibrosarcoma	No	80	160	32000		16000	0	6.4x10 ⁵	2.6x10 ⁵	1860	0	SD	QoL estable (estabilización temporal del tumor→ resección quirúrgica)	>200 ^c

Abreviaturas: PR, Respuesta parcial. SD, enfermedad estable. PD, enfermedad progresiva

Resumen del tipo de tumor, tratamiento concomitante, anticuerpos neutralizantes, carga viral en sangre, respuesta al tratamiento evaluada por RECIST 1.1, cuestionario de calidad de vida, bioactividad viral y supervivencia de los pacientes.

(a) Cuestionario de calidad de vida (QoL). (b) Toceranib 2,75 mg/kg/PO/48h. (c) Pacientes aún con vida.

Discusión

1. Aumento de la potencia oncolítica de los adenovirus mediante el uso de virus adeno-asociados

Los virus Adeno-asociados (AAV), son virus defectivos, que necesitan del aporte de ciertas proteínas de otros virus para finalizar su ciclo viral. Entre los virus que ayudan a los AAV a finalizar su ciclo encontramos los Adenovirus (Ad), el virus del papiloma humano (HPV) o el Herpes Virus. La contaminación de stocks de Ad por AAV se ha asociado a un fenotipo de pérdida de producción total adenoviral (Hoggan et al., 1966; Carter et al., 1979; Timpe et al., 2006). En el caso de las contaminaciones de stocks de HPV, también se produce esta pérdida de producción total, aunque además se ha descrito una aceleración del ciclo viral del HPV (Agrawal et al., 2002).

1.1. Fenotipo de calva

En este trabajo hemos descrito un fenotipo de calva de aparición temprana y de aumento del tamaño de ésta al combinar el Ad salvaje, Ad5, o el virus oncolítico, ICOVIR15, con el AAV2 ó el AAV6. Este fenotipo ha sido observado a lo largo de dos semanas. La conservación del fenotipo durante este tiempo demuestra un aumento sostenido de la capacidad de propagación de ambos virus a lo largo de múltiples rondas de replicación. Como el fenotipo de calva grande se asocia al aumento de potencia oncolítica de los Ad, pensamos que la combinación de ambos virus podría sernos útil en el campo de la viroterapia.

El AAV2 ha sido utilizado como modelo de AAV en el estudio de sus interacciones con otros virus. En este trabajo decidimos incluir también el AAV6 para disponer de un abanico más amplio y poder extender nuestro estudio más allá del estándar AAV2. Curiosamente el AAV6 mostró un fenotipo más marcado que el AAV2 en combinación con ambos Ad, el salvaje y el oncolítico. Sin embargo, la infectividad de estos serotipos ha sido comparada previamente (Grimm et al., 2008), siendo esta mayor para el AAV2 en A549. Además, como se observó posteriormente en los ensayos de producción, AAV2 incrementó más la liberación viral del Ad5 que AAV6, aunque sin llegar a establecer

significancia estadística. Como se comenta posteriormente los ensayos de producción están sujetos a una gran variabilidad. Las interacciones entre ambos virus (Ad y AAV) en fases de su replicación, por ejemplo una sinergia a la hora del transporte intracelular, la encapsidación o la liberación de ambos virus podrían justificar este fenotipo más marcado. De todas formas, los múltiples ciclos de replicación que deben darse para la formación de calvas refuerzan la elección de AAV6 como un mayor potenciador del Ad. Por tanto decidimos proseguir nuestros estudios con este AAV.

1.2. Aumento de la liberación

Un fenotipo de calva grande se ha asociado también a un aumento de la liberación de la progenie viral (Doronin et al., 2003; Sauthoff et al., 2000; Gros et al., 2008). En consonancia con este concepto, la coinfección de diferentes líneas celulares con Ad5 ó ICOVIR15 y AAV2 ó AAV6 provocó un aumento de la liberación viral de los Ad. En el caso del ICOVIR15 en combinación con el AAV6, este aumento de la liberación viral se produjo a diferentes tiempos dependiendo de la línea celular utilizada. En el caso de la línea NP9, este aumento se produjo a las 48 horas post infección, mientras que para las líneas HEK293 y A549 la mayor diferencia se detectó a las 24 horas post infección. Hipotetizamos que una menor permisividad a la replicación viral del Ad de la línea NP9, comparado con las otras dos líneas, en términos de menor producción total, podría ser la causa de esta diferencia. De todas formas, el AAV6 aumentó la liberación viral de ICOVIR15 en todas las líneas celulares (HEK293, A549 y NP9). Por otro lado, la coinfección con AAV6 redujo la producción viral total de ICOVIR15, tal y como esperábamos (Carter et al., 1979; Timpe et al., 2006), en las líneas HEK293 y A549 pero no en las NP9. Además este fenotipo de aumento de liberación fue observado también al combinar el Ad5 con AAV2 ó AAV6 en A549, demostrando que no está restringido al Ad oncolítico ni a un serotipo de AAV. Las diferencias observadas entre el AAV6 y el AAV2 sobre la liberación del Ad5 pueden ser debidas a desviaciones de la técnica y son fruto de una sola ronda de replicación viral, siendo por tanto más fiable el resultado de los ensayos de calvas.

La producción total del Ad se reduce al combinarlo con AAV de manera dosis dependiente (Timpe et al., 2006). Teniendo en cuenta los resultados de liberación viral y producción total obtenidos, quisimos estudiar el efecto dosis dependiente del AAV6 sobre estos dos parámetros de ICOVIR15. Para ello coinfectamos células A549 con ICOVIR15 y varias dosis de AAV6. Una dosis de 1000vp de AAV6 provocó el mayor ratio de liberación de virus sobre virus total producido, con una liberación del 100% a partir de las 48 horas post infección. Además esta condición fue la que presentó mayor cantidad de virus total liberado en términos absolutos a todos los tiempos independientemente de la cantidad total producida. Por tanto, teniendo en cuenta sólo la cantidad de Ad en el sobrenadante, el efecto del aumento de la liberación viral sería mayor que el de la pérdida de producción total provocada por el AAV. El resto de dosis utilizadas de AAV6 también aumentaron la ratio de virus liberado, aunque de manera menos marcada.

1.3. Incremento de citotoxicidad

Se han descrito varias estrategias para aumentar la liberación viral de los Ad: sobreexpresión de ADP (Doronin et al., 2003), inducción de apoptosis mediante la delección de genes como E1B19K (Sauthoff et al., 2000) o la inserción de genes proapoptóticos (Sauthoff et al., 2003) o la bioselección de Ad mutagenizados (Subramanian et al., 2006; Gros et al., 2008). La sobreexpresión de ADP y la inducción de apoptosis aceleran la muerte celular (Doronin et al., 2003; Sauthoff et al., 2003; Subramanian et al., 2006). También se ha observado que la coinfección de Ad con AAV induce en las células infectadas una morfología característica similar a la de apoptosis, con un encogimiento de las células y la formación de burbujas en las membranas (Timpe et al., 2007). En este trabajo observamos esta morfología similar a la apoptótica tan pronto como 36 horas post infección coinfectando con 1000vp de AAV6. Una dosis mucho mayor de AAV6 (100000vp) no provocó tal fenotipo, siendo la morfología celular parecida a la de las células infectada solamente con Ad e indicando que posiblemente existe un rango de dosis de AAV que provoque los mayores efectos sobre el Ad. Este fenotipo de morfología

celular se correlacionó con un aumento de la pérdida de viabilidad celular medida por la liberación de LDH y la capacidad de exclusión del azul de Tripano. Este aumento de la citotoxicidad observado está en consonancia con lo previamente descrito por Timpe y colaboradores, describiendo un aumento de la citolisis y apoptosis durante los tres primeros días post infección en células A549 coinfectadas con Ad5 y AAV2. Por otro lado, Jing y colaboradores (Jing et al., 2001) describieron una disminución de la citotoxicidad del Ad provocada por el AAV2 en células HeLa. Esta divergencia puede ser debida al tipo celular. Nuestros resultados en A549 y NP9 dan soporte a los de Timpe y colaboradores a favor de un aumento de la citotoxicidad inducida por la coinfección con AAV.

1.4. Mecanismo del fenotipo

El mecanismo por el que el AAV aumenta la citotoxicidad del Ad no está claro. En este trabajo se ha descrito un aumento de la liberación viral con un aumento de la citotoxicidad y una morfología característica. En artículos anteriores se describe el aumento de la apoptosis inducido por las proteínas Rep de los AAV (Timpe et al., 2006; Zhou and Trempe, 1999; Zhou et al., 1999; Schmidt et al., 2000). La expresión de proteínas Rep se autoinhibe en presencia de grandes cantidades de AAV (Carter et al., 1979; Timpe et al., 2006), disminuyendo teóricamente los efectos proapoptóticos. Las proteínas ADP y E1B19K están relacionadas con la liberación viral, la apoptosis y el efecto citopático (Subramanian et al., 2006; Toleffson et al., 1996). Dejando a un lado la inducción de apoptosis por las proteínas Rep, quisimos estudiar si diferencias en la expresión de proteínas del Ad, tales como E1A, ADP ó E1B19K, podían explicar la inducción de la citotoxicidad inducida por el AAV. E1A y las proteínas de la cápside disminuyeron de forma dosis dependiente, manteniendo un patrón de expresión temprano o tardío respectivamente. En el caso de E1B19K, se mantuvo el patrón y la disminución dosis dependiente solamente hasta las 48 horas post infección, momento en el que se dio un aumento de la expresión de esta proteína de forma dosis dependiente. Una explicación posible, es la activación del promotor de E1B por Rep78 en ausencia de E1A descrita

previamente (Jing et al., 2001). A tiempos tardíos unos niveles bajos de E1A pueden provocar el aumento de la expresión de E1B por Rep78. Coinfectando con 1000vp de AAV6, dosis a la que vimos mayor ratio de liberación viral, la expresión de ADP no pareció verse afectada. Por otro lado, a 100000vp de AAV6, éste inhibió la expresión de ADP a todos los tiempos, tal y como se ha descrito (Timpe et al., 2006). Un rango de dosis determinado de AAV6 parece ser crucial para observar el mayor aumento de liberación viral y citotoxicidad del Ad. Este rango debe, por un lado preservar la inducción de apoptosis por expresión de proteínas Rep y disminución de la expresión de E1B19K y por otro, mantener la expresión de ADP y sus efectos de pérdida de viabilidad celular.

1.5. Incremento de la propagación adenoviral

Desde el punto de vista viroterapéutico, nuestro objetivo es aumentar la lisis celular, la propagación y la potencia oncolítica de los adenovirus. Teniendo en cuenta el aumento de la liberación viral y la citotoxicidad por una parte y la pérdida de producción total del Ad por otra, estudiamos el efecto del AAV6 en la capacidad de propagación del ICOVIR15. Con este objetivo, se realizaron ensayos de toxicidad mediados por la propagación del Ad utilizando diluciones seriadas de los virus (ensayos de IC_{50}) en las líneas humanas A549 y NP9, y en las líneas de hámster o ratón HP-1, Amel-3, HAPT-1, pKln y CMT64. En las líneas humanas el ICOVIR15 se propagó de forma más rápida en presencia de AAV6 de manera dosis dependiente. La explicación más plausible es el aumento de la liberación viral al medio, que aumenta la velocidad de infección de las células vecinas. Utilizando una estrategia de células transportadoras también observamos una disminución de los valores de IC_{50} . Esta estrategia es interesante puesto que la administración de células infectadas con Ad ha sido previamente utilizada en el campo de la viroterapia (Willmon et al., 2009). Estos resultados indican que la pérdida de producción viral total asociada al AAV es compensada por una liberación más rápida y en mayor cantidad absoluta, lo que se traduce en una mayor capacidad de propagación y mayor citotoxicidad. En el caso de las células murinas y de hámster, no se vieron diferencias significativas, posiblemente por una

replicación muy limitada del ICOVIR15, y se puede hipotetizar que también del AAV6. Bajo nuestro conocimiento, sólo existe un estudio en el que se analice la replicación de un AAV humano en células de otra especie (Bhargava et al., 2009), mostrando un bloqueo a nivel post internalización y una disminución de entre 30 y 40 veces de la producción total de AAV al combinarlo con un Ad murino. Debido a este resultado, no consideramos oportuno evaluar la eficacia de la combinación de Ad y AAV en modelos inmunocompetentes, lo que hubiera permitido determinar si el aumento de la liberación del virus al medio extracelular era o no beneficioso en presencia de un sistema inmune competente.

1.6. Aumento de la eficacia terapéutica

Para aplicar todos estos resultados al campo de la viroterapia tratamos carcinomas de pulmón (A549) y de páncreas (NP9) en modelos de ratón inmunodeficiente mediante la administración intratumoral de ambos virus. Debido a la existencia de publicaciones donde se indica que el AAV puede actuar como un supresor de crecimiento tumoral (Khleif et al., 1991), incluimos un grupo tratado sólo con AAV6. La coadministración de ICOVIR15 con AAV6 aumentó la eficacia del ICOVIR15, disminuyendo el crecimiento tumoral 2.6 veces y 1.9 veces en el modelo de A549 y NP9, respectivamente, y aumentando el tiempo medio de supervivencia. Cuando comparamos la cantidad de virus en el interior de los tumores midiendo los genomas, no vimos diferencias entre el grupo tratado con Ad sólo o con AAV6. Esto puede deberse a que el aumento de la liberación va acompañado de una disminución de la producción total lo que compensaría la cantidad absoluta final de virus presente en el tumor.

1.7. Aplicaciones potenciales y posibles mejoras

La aplicación práctica de esta estrategia requiere de la coinfección de las células por ambos virus, por eso coadministramos los dos virus a la vez. Aunque la administración intratumoral es muy utilizada, idealmente, la administración sistémica sería preferible

para alcanzar todas las lesiones en casos de enfermedad diseminada. La administración sistémica de ambos virus requeriría del estudio de la biodistribución del AAV en ratones portadores de tumores. De todas formas, debido al bajo tropismo por el tumor de los Ad, las posibilidades de coinfección con el AAV serían mínimas. En este sentido nuevas aproximaciones que permitan la coinfección de las células tumorales por ambos virus de manera eficiente deben ser exploradas. El uso de células transportadoras sería una opción, como ha sido demostrado previamente (Coukos et al., 1999; Garcia-Castro et al., 2005; Hamada et al., 2007). Otra estrategia podría ser la administración de vectores no virales que portasen plásmidos infectivos con ambos genomas virales (Kwon et al., 2011). Esta estrategia es factible ya que el AAV es infectivo al transfectar un plásmido circular y existen plásmidos capaces de liberar el genoma del Ad una vez transfectados (Stanton et al., 2008). Por otro lado, el mecanismo exacto por el cual se produce este incremento en la liberación adenoviral, aumentando la propagación, resta por conocer. Estudios previos indican que los efectos de los AAV sobre los Ad son mediados por las proteínas Rep, con diferentes intensidades según la proteína. La caracterización de este efecto de liberación aumentada podría acotar a una sola proteína la causalidad. Posteriormente, mediante la expresión de esta proteína por inserción en el genoma adenoviral, se podría generar un Ad con este fenotipo sin necesidad de combinarlo con un AAV.

Con todo lo citado anteriormente vemos que el uso de virus adeno-asociados en combinación con un adenovirus aumenta la citotoxicidad y la potencia oncolítica de éstos. Aunque se hace necesaria la coinfección, ensayos de eficacia con adenovirus oncolíticos deben siempre ser precedidos de una comprobación de la presencia de virus adeno-asociados. Además el uso de esta aproximación no requiere de modificaciones en el genoma del adenovirus, haciendo susceptible de su combinación a cualquier adenovirus oncolítico que queramos potenciar. A la vez, como los virus adeno-asociados no han sido descritos como patógenos su uso es teóricamente seguro.

2. Desarrollo de un adenovirus oncolítico canino como tratamiento para la clínica veterinaria y modelo para la clínica humana con adenovirus

La replicación de manera especie específica de los Ad representa un reto a la hora de evaluar las propiedades de estos virus en modelos preclínicos. Nuevos modelos han sido propuestos recientemente (Jogler et al., 2006; Hallden et al., 2003; Lichtenstein et al., 2009), aunque éstos siguen aún presentando importantes carencias. Por ejemplo, en los modelos de roedores como el ratón y el hámster, es necesario implantar tumores artificiales, siendo además estas especies poco o nada permisivas a la replicación del Ad humano. Estos tumores implantados artificialmente, presentan una tasa de crecimiento muy rápida que no permite formar una estructura tumoral compleja como la de los tumores espontáneos. Además la respuesta del sistema immune se ve alterada, ya sea por esta rápida tasa de crecimiento o por una depleción directa en el caso de los ratones atímicos. Estas características limitan los beneficios de estos modelos a la hora de pronosticar resultados clínicos en humanos.

El perro se ha utilizado como modelo para la terapia del cáncer en humanos desde los años 60 (Paoloni and Khanna, 2008). En este contexto, la replicación del Ad5 en algunas líneas caninas, tanto primarias como establecidas, ha sido demostrada previamente (Ternovoi et al., 2005), sugiriendo el perro como un buen modelo para realizar ensayos preclínicos con Ad humanos de replicación condicional. En otro estudio reciente, Euler y colaboradores (Von Euler et al., 2008) inyectaron un vector basado en el Ad5 humano (AdCD40L), en dos pacientes caninos con melanoma, obteniendo muy buenos resultados, lo que invita al uso de esta terapia en la clínica humana.

El perro y el Ad canino tipo 2 (CAV2) se han propuesto como un modelo incluso mejor que los anteriores para tratamientos basados en Ad (Hemminki et al., 2003; Smith et al., 2006; Arendt et al., 2009). Aspectos como la influencia del medio, la homología del genoma y la esperanza de vida en aumento son más similares entre perros y humanos que entre estos y los roedores. Además, la incidencia de cáncer y su evolución clínica en perros, comparte muchas características con las humanas, lo que refuerza aún más el uso de esta combinación (perro-CAV2) como modelo (Paoloni and Khanna, 2008).

En un estudio anterior, un Ad oncolítico basado en CAV2 (OCCAV), con E1A bajo el control del promotor de osteocalcina, demostró una replicación selectiva en células de osteosarcoma canino y un beneficio terapéutico en modelos xenógrafos de osteosarcoma (Hemminki et al., 2003). Por otro lado Smith y colaboradores (Smith et al., 2006) administraron 2×10^{12} vp de OCCAV por vía intravenosa a Beagles de laboratorio sin tumor, demostrando la seguridad de este virus. Se observaron efectos adversos de carácter leve, y en un solo caso se produjo una neutropenia calificada como grave. Es importante recalcar la ausencia de necrosis o alteraciones graves de los órganos de mayor tropismo por el Ad, el hígado y el bazo, en la necropsia.

En otro estudio realizado en nuestro grupo, este mismo virus fue administrado por vía intratumoral o intravenosa mediante células transportadoras (D17 y Abrams) demostrando un beneficio terapéutico frente a la administración del virus desnudo en modelos xenógrafos de osteosarcoma canino (Abrams) con animales sin inmunizar y previamente inmunizados (Alcayaga-Miranda et al., 2010). Al trasladar esta aproximación a la clínica veterinaria, los resultados de eficacia han sido poco esperanzadores administrando la combinación células-virus por cualquiera de las dos vías. No se observó eficacia, con enfermedad progresiva en ambos casos y siendo sacrificados los pacientes al cabo de 1 y 6 meses respectivamente. Aun así el tratamiento resultó seguro sin efectos adversos graves. Solamente se dio una inflamación de la extremidad donde se ubicaba el tumor, posterior a la administración intratumoral, que revertió con AINEs (resultados no publicados, Tesis Doctoral Francisca Andrea Alcayaga Miranda).

Por tanto, la seguridad del OCCAV ha sido probada en perros en dos estudios diferentes y administrando el virus desnudo y mediante células transportadoras. Ahora bien, la efectividad en pacientes con osteosarcoma aún está por demostrar. En este sentido, la restricción de la replicación de OCCAV a células que expresen osteocalcina limita mucho el número de pacientes susceptibles de ser tratados. Un virus bajo el control de un promotor, con un tropismo más amplio, sería de más utilidad al poder administrarlo eficazmente en un abanico más amplio de pacientes con diferentes tumores.

En esta parte del trabajo hemos construido ICOCAV17, un Ad canino oncolítico basado en el CAV2 para el tratamiento de un amplio abanico de cánceres caninos. Además las similitudes que este virus presenta con su homólogo humano, ICOVIR17 (Guedan et al., 2010), lo hacen apropiado para extrapolar los datos obtenidos de un modelo singénico y con tumores espontáneos al campo de la clínica humana.

2.1. Modificación de la cápside

En un primer paso, insertamos el motivo RGD en el *HI-loop* de la fibra del Ad canino, ya que en el caso de los Ad humanos esta inserción aumenta la infectividad y permite una infección de manera independiente del receptor del *coxsackievirus* (CAR) (Dmitriev et al., 1998; Suzuki et al., 2001). Además, las células tumorales expresan niveles bajos de CAR, pero expresan altos niveles de integrinas (Suzuki et al., 2001). El efecto de esta modificación no podía ser extrapolado del Ad humano debido a las diferencias existentes en las vías que utilizan cada uno de los Ad, humano y canino, a la hora de infectar células. Además, el CAV2 no presenta un motivo de unión a integrinas en su cápside (Soudais et al., 2000; Chillón and Kremer, 2001). El CAR y las integrinas influyen en la infección y el transporte celular de CAV2 pero su mecanismo exacto aún está por definir. En todo caso en este trabajo la inserción de un motivo RGD en la fibra del CAV2 aumentó la infectividad y la capacidad de propagación en tres líneas tumorales caninas.

Disponer de un vector con expresión de un gen reportero hubiese sido de gran utilidad para evaluar específicamente los cambios de infectividad mediados por esta nueva cápside. Sin embargo, no fue posible su generación. Por otra parte, ensayos para demostrar explícitamente la vía de infección de CAV2 y CAV2RGD hubieran reforzado la prueba de concepto de la estrategia. Ensayos de bloqueo con uno y otro virus o con CAR soluble o con el péptido RGD nos permitirían clarificar las diferencias entre ambos. Un análisis exhaustivo de las vías de infección de CAV2 y la presencia o no de moléculas como integrinas, CAR o MHC en las células caninas sería de gran relevancia para el proyecto.

2.2. Modificación del promotor de E1A

Los promotores basados en lugares de unión a E2F han sido ampliamente utilizados para controlar la transcripción de los Ad, confiriéndoles selectividad y aumentando la potencia oncolítica de los mismos (Cascalló et al., 2007; Johnson et al., 2002; Rojas et al., 2010; Rojas et al., 2009; Tsukuda et al., 2002). En este trabajo, con el objetivo de conseguir una selectividad basada en E2F, se insertaron cuatro palíndromos imperfectos que contenían ocho lugares de unión a E2F y además se insertó un lugar de unión a Sp-I en el promotor endógeno de E1A del CAV2 y el CAV2RGD y el lugar de unión de E1A a pRB fue delecionado generando una $\Delta 21$ E1A. Para ello se utilizó la homología, previamente descrita (Shibata et al., 1989), entre la E1A de Ad5 y la de CAV2. La deleción $\Delta 24$ en el Ad humano, homóloga a la $\Delta 21$ en el CAV2, impide que el virus libere el E2F celular de los complejos E2F-pRB, confiriéndole selectividad por las células con el promotor de E2F activado (vía de pRB desregulada). Este es el caso de la mayoría de las células tumorales (Cascalló et al., 2007). Por otro lado, impide la replicación viral en células que no estén dividiéndose (promotor E2F inactivo, vía de pRB no alterada). En este trabajo la modificación del promotor de E1A canino aumentó la producción total del CAV2, aumentando la citotoxicidad en células tumorales, a la vez que disminuyó la producción total en más de un 80% en células caninas no tumorales diferenciadas.

Otro sistema, más válido debido al completo arresto del crecimiento celular, para determinar la selectividad viral, es el uso de tejidos como cortes de hígado e islotes pancreáticos (usados para Ad humanos). En nuestro caso debido a la menor disponibilidad de muestras no se pudo realizar esta aproximación. Además la falta de anticuerpos (p.ej. anti E1A) del CAV2, nos impidió valorar específicamente las diferencias en la expresión de E1A inducidas por las modificaciones de las cajas E2F y la $\Delta 21$.

2.3. Inserción de la PH20

Otro aspecto importante en la terapia del cáncer basada en los Ad es la limitada diseminación de éstos por el tumor debido a las barreras del estroma tumoral (Strauss et al., 2009; Jang et al., 2003). Entre estas barreras, la presencia de matriz extracelular rica en ácido hialurónico (HA) limita la eficacia de los Ad oncolíticos impidiendo su diseminación por el tumor. La presencia de HA en los tumores humanos es elevada (Toole et al., 2004), pero también en los de origen canino (Docampo et al., 2007). En relación a este concepto, medimos la cantidad de HA en varios tumores xenógrafos caninos mediante inmunotinción. Tanto los tumores de la línea CML1 como los de la línea Abrams presentaron gran cantidad de HA en su matriz, mientras que los de la línea 17CM98 presentaban escaso o nulo nivel de HA.

La PH20 es una hialuronidasa presente en el espermatozoide de mamíferos (Sabeur et al., 2002) con una secuencia genética muy conservada (Lathrop et al., 1990). La PH20 humana degrada el HA, su sustrato, a pH neutro, mientras que la PH20 de origen canino tiene mayor actividad a pH ácido (Sabeur et al., 2002). Debido a la naturaleza xenogénica del DNA del CAV2 en el perro junto con lo citado anteriormente, no consideramos utilizar la PH20 canina para armar nuestro Ad canino. Para ligar la expresión de hialuronidasa a la replicación viral insertamos el transgén bajo el control del aceptor de corte de la proteína IIIa canina (IIIaSA). El IIIaSA canino se obtuvo por alineación de las secuencias del CAV2 con las del Ad5. Esta alineación había sido realizada previamente (Tormanen et al., 2006). Esta estrategia resultó muy efectiva, alcanzando ICOCV17 altos niveles de expresión de hialuronidasa. En futuros diseños de Ad oncolíticos caninos, esta estrategia resultará muy útil debido a su efectividad y a la vez a su mínimo espacio genómico suplementario necesario para la incorporación del aceptor de corte. Por otro lado la verificación de la expresión asociada a la replicación (fase tardía del ciclo) resta por demostrar, aunque teóricamente al asociar la expresión a un aceptor de corte de una proteína tardía esta debería seguir la misma cinética de expresión.

2.4. Ensayos de potencia oncolítica y toxicidad

Los ensayos *in vitro* no mostraron ninguna desventaja para ICOCAV17 comparado con su virus parental ICOCAV15. Sin embargo, en los ensayos *in vivo* por administración intratumoral sí vimos una ventaja terapéutica para el virus armado con la PH20 en los dos modelos analizados.

Por otro lado la ventaja terapéutica obtenida mediante la administración intravenosa de los virus caninos oncolíticos fue limitada. Además se observó una gran toxicidad de estos virus comparados con los grupos PBS o administrados con los virus sin cápside modificada (CAV2 e ICOCAV15noRGD) en términos de pérdida de peso pero no en nivel de plaquetas en sangre (trombocitopenia) o enzimas hepáticos.

Al comparar estos resultados con los de su homólogo humano, ICOVIR17, se hace patente que, aunque compartan características y propiedades como el tropismo y la patología en condiciones naturales, cápside modificada con el motivo RGD, E1A bajo el control de la vía de Rb y la expresión de PH20 bajo el control del IIIaSA, la toxicidad inducida y el tropismo y la eficacia demostrados al inyectarlo sistémicamente en ratones distan mucho. La toxicidad observada sugiere que en el caso de los Ad caninos, ésta es mediada por la cápside y no involucra al hígado, algo que en el caso de los hAd es común. La trombocitopenia causada es a priori superior en el caso de los Ad caninos y también mediada directamente por la cápside. La causa específica de la pérdida de peso, es aún desconocida, aunque también implica la cápside, y requerirá de más ensayos para esclarecerla. Como vemos ambos virus se comportan de forma muy diferente en el modelo murino, lo que aconseja, como mínimo, actuar con precaución a la hora de administrar por vía intravenosa estos virus en pacientes caninos. Smith y colaboradores han demostrado la seguridad de OCCAV inyectando 2×10^{12} vp por vía intravenosa. Lo que sugiere que esa dosis, si como esperamos la toxicidad es principalmente mediada por cápside, es segura, marcando un posible punto de partida para un escalado de dosis en el tratamiento de pacientes.

2.5. Casos clínicos

El principal objetivo fue alcanzar las fases clínicas, tratando pacientes caninos, con un virus oncolítico completamente capaz de replicarse en su huésped. Hasta la fecha se han tratado 5 perros con tumores de diferente origen con nuestro candidato mediante administración intratumoral.

Bajo nuestro conocimiento, esta es la primera vez que se tratan pacientes caninos con un Ad canino de replicación condicional armado con un transgén.

La dosis administrada fue de 1×10^{12} vp de ICOCAV17. Esta dosis resultó de aplicar un factor de seguridad de 10 veces respecto a la dosis administrada en ratones y ajustada por el peso. También es importante recalcar el ensayo de Smith y colaboradores con sólo un evento adverso grave, lo que da aún mayor seguridad a la dosis administrada en este trabajo.

En ningún caso se observaron signos de toxicidad asociados directamente a la administración de ICOCAV17. Los análisis bioquímicos, hematológicos y las pruebas de coagulación realizados a diario durante al menos los cuatro primeros días post administración no dieron muestras de toxicidad sistémica. Aunque se llegaron a alcanzar valores de 10^5 partículas virales por mililitro de sangre, la toxicidad fue nula. La actividad lítica del virus en los tejidos diana, o tumores, provocó los eventos adversos observados en este trabajo. En el Caso II el paciente sufrió una lesión traumática, posiblemente por autoamputación de parte del tejido que recubría una de las zonas de administración del virus y por la necrosis que el virus indujo en la masa tumoral. En el Caso III se diagnosticó una Coagulación Intravascular Diseminada (DIC) como resultado de la lisis masiva del tumor y su prolongado estado de sangrado, lo que condujo a una respuesta inflamatoria generalizada. Para obtener mejores resultados en el futuro, pacientes con tumores proinflamatorios como el mastocitoma y pacientes con volúmenes tumorales elevados deben ser evitados, y en el caso de tratarlos, manejarlos con extremo cuidado y con previsión de sucesos adversos de esta naturaleza. A parte de estos dos eventos no se observaron otros efectos adversos en ningún caso. Las inmunotinciones realizadas en los

tejidos sanos adyacentes inyectados por error no mostraron ninguna evidencia de replicación viral, y en el examen macroscópico realizado tampoco se observaron signos de necrosis. Ningún paciente presentó alteraciones en los tejidos sanos adyacentes a las zonas inyectadas. Todas estas evidencias apoyan la selectividad del promotor de E2F/ Δ 21 vista en los ensayos *in vitro* y sugieren una buena tolerancia a la administración intratumoral de ICOCV17.

El criterio basado en RECIST (Eisenhauer et al., 2009) ha sido cuestionado como óptimo a la hora de valorar la eficacia de los tratamientos con virus ya que los virus suelen inducir inflamación y aumento del volumen tumoral, lo que puede ser malinterpretado como crecimiento tumoral y progresión de la enfermedad. Otros criterios basados en índices de calidad de vida (Reid et al., 2013) o tiempos de supervivencia han sido propuestos como métodos más fiables a la hora de valorar la eficacia de los tratamientos. En este trabajo hemos observado eficacia usando RECIST en los Casos I y III con un 51% y un 70% de reducción tumoral respectivamente. Los beneficios del tratamiento concomitante con virus y Toceranib en el Caso III deberán ser estudiados en profundidad en futuros trabajos, aunque se encuentran en la línea de las sinergias demostradas al combinar la viroterapia con tratamientos farmacológicos convencionales. Además, se observó un beneficio en términos de calidad de vida en el Caso I con una resolución rápida de los problemas de micción causados por el tumor. También observamos signos de necrosis de áreas tumorales de la lesión primaria y además en un nódulo metastásico en el Caso II, asociados a replicación viral, sugiriendo un beneficio asociado a la actividad viral y justificando la continuación de los ensayos con ICOCV17 en casos de osteosarcoma. En los Casos IV y V no se observaron beneficios tan claros, aunque se detectó presencia de replicación viral en el tumor del Caso V. También se observó una estabilización temporal post administración de las zonas inyectadas. El tumor del Caso V fue extirpado quirúrgicamente 15 días después de la administración. La recuperación de la cirugía fue totalmente normal, y hasta la fecha, más de medio año después, no se ha detectado recidiva del tumor. Este hecho refuerza la seguridad del tratamiento con ICOCV17 y podría sugerir un beneficio en términos de tiempo libre de enfermedad.

En términos de eficacia, la respuesta ha sido mejor que en estudios anteriores, sin embargo no se han alcanzado respuestas completas y en algún caso, no ha habido respuesta alguna, lo que indica que sí existen ciertos tumores resistentes a la actividad viral y que la diseminación viral aún no es suficiente extensa. Se hace necesaria la búsqueda de nuevas aproximaciones que permitan a los virus eliminar este tipo de células resistentes y mayor capacidad de diseminación. En este caso, la inserción de toxinas o genes suicidas en el genoma viral sería una opción como se ha comentado anteriormente.

Todos los pacientes tenían niveles detectables de anticuerpos circulantes frente a CAV2 antes del tratamiento. Los niveles aumentaron en todos los pacientes de manera significativa después del tratamiento. En estudios previos realizados tanto en modelos animales como en pacientes humanos, se ha sugerido que la existencia de inmunidad contra el virus, previa al tratamiento, podría aumentar la seguridad de los tratamientos sin afectar a la eficacia en casos de administración intratumoral. En este trabajo el paciente II mostró los niveles iniciales más altos de anticuerpos neutralizantes. Aun así, el virus fue capaz de inducir necrosis en la lesión primaria y también en un nódulo metastásico, pudiendo sugerir un transporte de partículas infectivas hasta la lesión metastásica aún en presencia de anticuerpos neutralizantes. Recientemente un nuevo estudio ha demostrado la protección de las partículas virales de Ad5 frente a los anticuerpos neutralizantes por el factor de coagulación X (Xu et al., 2013), aunque las interacciones del CAV2 con los factores de coagulación aún son desconocidas.

Los niveles de anticuerpos aumentaron progresivamente hasta la última medida en todos los casos excepto en el Caso V. Esto podría hacernos pensar que al extirpar el tumor, también eliminamos la fuente de virus, perdiendo por tanto la fuente de antígenos que estimulaban la creación de anticuerpos. La presencia de virus en sangre se ha asociado a la replicación viral en el tumor. En este trabajo se ha observado una actividad oncolítica sostenida hasta 6 meses después de la administración (Caso I), aunque los niveles de virus en sangre fueron disminuyendo progresiva y rápidamente siendo la última detección de virus a los 7 días post inyección. Por tanto es muy probable que aunque se hayan dado rondas de replicación viral, la rápida eliminación del virus del torrente sanguíneo haya

impedido su detección. En global, no hemos encontrado una relación entre niveles de anticuerpos o virus en sangre y la eficacia antitumoral o toxicidad.

2.6. Visión global y perspectivas

El tratamiento de pacientes caninos con ICOCV17 por vía intratumoral parece ser seguro. Hemos observado eficacia en dos casos bajo RECIST, en un adenoma infiltrativo y un mastocitoma. Además se han resuelto los problemas de micción causados por el tumor en un tiempo corto (3 días). También, se ha detectado replicación viral en los tumores de dos pacientes (Casos II y V) y la inducción de necrosis causada por replicación viral en la lesión tumoral primaria y un nódulo metastásico. El esfuerzo en incluir pacientes en estado no tan avanzado de enfermedad y con menores cargas tumorales, permitirá obtener mejores resultados de eficacia y a la vez disminuir los efectos adversos observados.

Es importante también determinar los motivos por los que ciertos tipos celulares son resistentes a la lisis viral para poder prever la eficacia del tratamiento. Nuevas estrategias encaminadas a aumentar la citotoxicidad viral en las células tumorales serán necesarias si queremos tratar tipos tumorales resistentes. Además, teniendo en cuenta que la administración de hialuronidasa mejora la eficacia de ciertos agentes quimioterapéuticos, la combinación de estos agentes con ICOCV17 podría inducir sinergias en la eficacia de ambos. Finalmente, es importante tener en cuenta que la incidencia del cáncer y su mortalidad en perros debe ser tomada como un reto para seguir investigando nuevas aproximaciones terapéuticas veterinarias, a la vez que la elevada incidencia de cáncer en perros debe ser tomada como una fuente valiosa de modelos para el desarrollo de adenovirus oncolíticos y otros agentes terapéuticos en la clínica humana.

Conclusiones

1. La coinfección con virus adeno-asociados (AAV) provoca un fenotipo de calva grande, un aumento de la liberación al medio y una disminución de la producción total de los adenovirus (Ad).
2. La coinfección con Ad y AAV induce una citotoxicidad acelerada.
3. El incremento de la liberación adenoviral al medio causada por AAV compensa la pérdida de producción total de Ad, aumentando la propagación de los Ad *in vitro*.
4. La coinyección intratumoral con AAV mejora la eficacia terapéutica del Ad oncolítico ICOVIR15.
5. La inserción del motivo RGD en el *HI-loop* de la fibra mejora la infectividad y aumenta la citotoxicidad del CAV2.
6. La modificación del promotor de E1A del CAV2RGD mediante la inserción de lugares de unión a E2F y la delección $\Delta 21$, disminuye la producción viral en una línea no tumoral de perro y la aumenta en varias líneas tumorales, incrementando la citotoxicidad.
7. La expresión de PH20 humana mejora la eficacia terapéutica intratumoral en dos modelos xenógrafos en ratón.
8. La administración sistémica en ratones de los Ad caninos produce una marcada trombocitopenia y pérdida de peso que se agrava en el caso de los virus con el motivo RGD y el gen de la PH20, pero no altera las funciones hepáticas en ningún caso.
9. La administración intratumoral del Ad oncolítico canino ICOCV17 en cinco pacientes caninos ha resultado segura, sin evidencias de toxicidad hepática o hematológica, ni tampoco de replicación en tejidos no tumorales. Sin embargo, la actividad lítica de ICOCV17 en tumores de naturaleza inflamatoria puede ocasionar efectos adversos.
10. Tras la administración intratumoral de ICOCV17 en cinco pacientes se han observado dos respuestas parciales con disminución significativa del volumen tumoral. En dos casos se ha observado replicación viral intratumoral, en uno de ellos asociada a la presencia de necrosis tumoral.
11. Los resultados sugieren que ICOCV17 es un buen candidato para el tratamiento de tumores caninos y su interpretación como modelo de la clínica humana con adenovirus, aunque presente diferencias manifiestas con ICOVIR17.

Bibliografía

A

AGHI, M. and MARTUZA, R. L. (2005). "Oncolytic viral therapies - the clinical experience." *Oncogene* 24(52): 7802-16.

AGRAWAL, N., MANE, M., CHIRIVA-INTERNATI, M., ROMAN, J. J., et al. (2002). "Temporal acceleration of the human papillomavirus life cycle by adeno-associated virus (AAV) type 2 superinfection in natural host tissue." *Virology* 297(2): 203-10.

ALCAYAGA-MIRANDA, F., CASCALLO, M., ROJAS, J. J., PASTOR, J., et al. "Osteosarcoma cells as carriers to allow antitumor activity of canine oncolytic adenovirus in the presence of neutralizing antibodies." *Cancer Gene Ther* 17(11): 792-802.

ALEMANY, R., BALAGUE, C. and CURIEL, D. T. (2000). "Replicative adenoviruses for cancer therapy." *Nat Biotechnol* 18(7): 723-7.

ALONSO, M. M., JIANG, H., YOKOYAMA, T., XU, J., et al. (2008). "Delta-24-RGD in combination with RAD001 induces enhanced anti-glioma effect via autophagic cell death." *Mol Ther* 16(3): 487-93.

ALLEN, J. M., HALBERT, C. L. and MILLER, A. D. (2000). "Improved adeno-associated virus vector production with transfection of a single helper adenovirus gene, E4orf6." *Mol Ther* 1(1): 88-95.

ARAKAWA, S., JR., HAMAMI, G., UMEZU, K., KAMIDONO, S., et al. (1987). "Clinical trial of attenuated vaccinia virus AS strain in the treatment of advanced adenocarcinoma. Report on two cases." *J Cancer Res Clin Oncol* 113(1): 95-8.

ARENDT, M., NASIR, L. and MORGAN, I. M. (2009). "Oncolytic gene therapy for canine cancers: teaching old dog viruses new tricks." *Vet Comp Oncol* 7(3): 153-61.

ASADA, T. (1974). "Treatment of human cancer with mumps virus." *Cancer* 34(6): 1907-28.

AUVINEN, P., TAMMI, R., PARKKINEN, J., TAMMI, M., et al. (2000). "Hyaluronan in peritumoral stroma and malignant cells associates with breast cancer spreading and predicts survival." *Am J Pathol* 156(2): 529-36.

B

BAUERSCHMITZ, G. J., LAM, J. T., KANERVA, A., SUZUKI, K., et al. (2002). "Treatment of ovarian cancer with a tropism modified oncolytic adenovirus." *Cancer Res* 62(5): 1266-70.

BAUMGARTNER, G. (1998). "The impact of extracellular matrix on chemoresistance of solid tumors--experimental and clinical results of hyaluronidase as additive to cytostatic chemotherapy." *Cancer Lett* 131(1): 1-2.

BAYO-PUXAN, N., CASCALLO, M., GROS, A., HUCH, M., et al. (2006). "Role of the putative heparan sulfate glycosaminoglycan-binding site of the adenovirus type 5 fiber shaft on liver detargeting and knob-mediated retargeting." *J Gen Virol* 87(Pt 9): 2487-95.

BELOUSOVA, N., KRENDELCHTIKOVA, V., CURIEL, D. T. and KRASNYKH, V. (2002). "Modulation of adenovirus vector tropism via incorporation of polypeptide ligands into the fiber protein." *J Virol* 76(17): 8621-31.

BERNS, K. I. (1990). "Parvovirus replication." *Microbiol Rev* 54(3): 316-29.

BHRIGU, V. and TREMPER, J. P. (2009). "Adeno-associated virus infection of murine fibroblasts with help provided by mouse adenovirus." *Virology* 390(1): 22-30.

BIRNBOIM, H. C. and DOLY, J. (1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." *Nucleic Acids Res* 7(6): 1513-23.

BISCHOFF, J. R., KIRN, D. H., WILLIAMS, A., HEISE, C., et al. (1996). "An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells." *Science* 274(5286): 373-6.

BLACK, A. R. and AZIZKHAN-CLIFFORD, J. (1999). "Regulation of E2F: a family of transcription factors involved in proliferation control." *Gene* 237(2): 281-302.

BULLER, R. M., JANIK, J. E., SEBRING, E. D. and ROSE, J. A. (1981). "Herpes simplex virus types 1 and 2 completely help adenovirus-associated virus replication." *J Virol* 40(1): 241-7.

BUONAVOGLIA, C. and MARTELLA, V. (2007). "Canine respiratory viruses." *Vet Res* 38(2): 355-73.

C

CARLISLE, R. C., DI, Y., CERNY, A. M., SONNEN, A. F., et al. (2009). "Human erythrocytes bind and inactivate type 5 adenovirus by presenting Coxsackie virus-adenovirus receptor and complement receptor 1." *Blood* 113(9): 1909-18.

CARTER, B. J., LAUGHLIN, C. A., DE LA MAZA, L. M. and MYERS, M. (1979). "Adeno-associated virus autointerference." *Virology* 92(2): 449-62.

CASCALLO, M., ALONSO, M. M., ROJAS, J. J., PEREZ-GIMENEZ, A., et al. (2007). "Systemic toxicity-efficacy profile of ICOVIR-5, a potent and selective oncolytic adenovirus based on the pRB pathway." *Mol Ther* 15(9): 1607-15.

CASCALLO, M., CAPELLA, G., MAZO, A. and ALEMANY, R. (2003). "Ras-dependent oncolysis with an adenovirus VAI mutant." *Cancer Res* 63(17): 5544-50.

CASCALLO, M., GROS, A., BAYO, N., SERRANO, T., et al. (2006). "Deletion of VAI and VAIL RNA genes in the design of oncolytic adenoviruses." *Hum Gene Ther* 17(9): 929-40.

CASTO, B. C., ATCHISON, R. W. and HAMMON, W. M. (1967). "Studies on the relationship between adeno-associated virus type I (AAV-1) and adenoviruses. I. Replication of AAV-1 in certain cell cultures and its effect on helper adenovirus." *Virology* 32(1): 52-9.

COUKOS, G., MAKRIGIANNAKIS, A., KANG, E. H., CAPARELLI, D., et al. (1999). "Use of carrier cells to deliver a replication-selective herpes simplex virus-1 mutant for the intraperitoneal therapy of epithelial ovarian cancer." *Clin Cancer Res* 5(6): 1523-37.

CHEONG, S. C., WANG, Y., MENG, J. H., HILL, R., et al. (2008). "E1A-expressing adenoviral E3B mutants act synergistically with chemotherapeutics in immunocompetent tumor models." *Cancer Gene Ther* 15(1): 40-50.

CHILLON, M. and KREMER, E. J. (2001). "Trafficking and propagation of canine adenovirus vectors lacking a known integrin-interacting motif." *Hum Gene Ther* 12(14): 1815-23.

CHIOCCA, E. A. (2002). "Oncolytic viruses." *Nat Rev Cancer* 2(12): 938-50.

CHU, R. L., POST, D. E., KHURI, F. R. and VAN MEIR, E. G. (2004). "Use of replicating oncolytic adenoviruses in combination therapy for cancer." *Clin Cancer Res* 10(16): 5299-312.

D

DECARO, N., MARTELLA, V. and BUONAVOGLIA, C. (2008). "Canine adenoviruses and herpesvirus." *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 38(4): 799-814, viii.

DEPACE, N. (1912). Sulla scomparsa di un enorme cancro vegetante del collo dell'utero senza cura chirurgica. *Ginecologia* 9, 82-89.

DESOIZE, B. and JARDILLIER, J. (2000). "Multicellular resistance: a paradigm for clinical resistance?" *Crit Rev Oncol Hematol* 36(2-3): 193-207.

DHAR, D., SPENCER, J. F., TOTH, K. and WOLD, W. S. (2009). "Effect of preexisting immunity on oncolytic adenovirus vector INGN 007 antitumor efficacy in immunocompetent and immunosuppressed Syrian hamsters." *J Virol* 83(5): 2130-9.

DILLEY, J., REDDY, S., KO, D., NGUYEN, N., et al. (2005). "Oncolytic adenovirus CG7870 in combination with radiation demonstrates synergistic enhancements of antitumor efficacy without loss of specificity." *Cancer Gene Ther* 12(8): 715-22.

DMITRIEV, I., KRASNYSKH, V., MILLER, C. R., WANG, M., et al. (1998). "An adenovirus vector with genetically modified fibers demonstrates expanded tropism via utilization of a coxsackievirus and adenovirus receptor-independent cell entry mechanism." *J Virol* 72(12): 9706-13.

DOCAMPO, M. J., RABANAL, R. M., MIQUEL-SERRA, L., HERNANDEZ, D., et al. (2007). "Altered expression of versican and hyaluronan in melanocytic tumors of dogs." *Am J Vet Res* 68(12): 1376-85.

DORONIN, K., TOTH, K., KUPPUSWAMY, M., KRAJCSI, P., et al. (2003). "Overexpression of the ADP (E3-11.6K) protein increases cell lysis and spread of adenovirus." *Virology* 305(2): 378-87.

E

EISENHAUER, E. A., THERASSE, P., BOGAERTS, J., SCHWARTZ, L. H., et al. (2009). "New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1)." *Eur J Cancer* 45(2): 228-47.

ENGLER, H., MACHEMER, T., PHILOPENA, J., WEN, S. F., et al. (2004). "Acute hepatotoxicity of oncolytic adenoviruses in mouse models is associated with expression of wild-type E1a and induction of TNF-alpha." *Virology* 328(1): 52-61.

F

FRANZMANN, E. J., SCHROEDER, G. L., GOODWIN, W. J., WEED, D. T., et al. (2003). "Expression of tumor markers hyaluronic acid and hyaluronidase (HYAL1) in head and neck tumors." *Int J Cancer* 106(3): 438-45.

FUEYO, J., GOMEZ-MANZANO, C., ALEMANY, R., LEE, P. S., et al. (2000). "A mutant oncolytic adenovirus targeting the Rb pathway produces anti-glioma effect in vivo." *Oncogene* 19(1): 2-12.

G

GAO, G., VANDENBERGHE, L. H., ALVIRA, M. R., LU, Y., et al. (2004). "Clades of Adeno-associated viruses are widely disseminated in human tissues." *J Virol* 78(12): 6381-8.

GARCIA-CASTRO, J., MARTINEZ-PALACIO, J., LILLO, R., GARCIA-SANCHEZ, F., et al. (2005). "Tumor cells as cellular vehicles to deliver gene therapies to metastatic tumors." *Cancer Gene Ther* 12(4): 341-9.

GIETZ, R. D. and WOODS, R. A. (2002). "Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method." *Methods Enzymol* 350: 87-96.

GIMENEZ-ALEJANDRE, M., GROS, A. and ALEMANY, R. "Construction of capsid-modified adenoviruses by recombination in yeast and purification by iodixanol-gradient." *Methods Mol Biol* 797: 21-34.

GIRISH, K. S. and KEMPARAJU, K. (2007). "The magic glue hyaluronan and its eraser hyaluronidase: a biological overview." *Life Sci* 80(21): 1921-43.

GMACHL, M., SAGAN, S., KETTER, S. and KREIL, G. (1993). "The human sperm protein PH-20 has hyaluronidase activity." *FEBS Lett* 336(3): 545-8.

GRANDER, D. (1998). "How do mutated oncogenes and tumor suppressor genes cause cancer?" *Med Oncol* 15(1): 20-6.

GRIMM, D., LEE, J. S., WANG, L., DESAI, T., et al. (2008). "In vitro and in vivo gene therapy vector evolution via multispecies interbreeding and retargeting of adeno-associated viruses." *J Virol* 82(12): 5887-911.

GRIMM, D., ZHOU, S., NAKAI, H., THOMAS, C. E., et al. (2003). "Preclinical in vivo evaluation of pseudotyped adeno-associated virus vectors for liver gene therapy." *Blood* 102(7): 2412-9.

GROS, A. (2010). Adenovirus Release from the Infected Cell as a Key Factor for Adenovirus Oncolysis. *The Open Gene Therapy Journal*. 3: 24-30.

GROS, A., MARTINEZ-QUINTANILLA, J., PUIG, C., GUEDAN, S., et al. (2008). "Biosselection of a gain of function mutation that enhances adenovirus 5 release and improves its antitumoral potency." *Cancer Res* 68(21): 8928-37.

GROS, A., PUIG, C., GUEDAN, S., ROJAS, J. J., et al. "Verapamil enhances the antitumoral efficacy of oncolytic adenoviruses." *Mol Ther* 18(5): 903-11.

GUEDAN, S., ROJAS, J. J., GROS, A., MERCADE, E., et al. "Hyaluronidase expression by an oncolytic adenovirus enhances its intratumoral spread and suppresses tumor growth." *Mol Ther* 18(7): 1275-83.

H

HAHN, W. C. and WEINBERG, R. A. (2002). "Modelling the molecular circuitry of cancer." *Nat Rev Cancer* 2(5): 331-41.

HALLDEN, G., HILL, R., WANG, Y., ANAND, A., et al. (2003). "Novel immunocompetent murine tumor models for the assessment of replication-competent oncolytic adenovirus efficacy." *Mol Ther* 8(3): 412-24.

HALLENBECK, P. L., CHANG, Y. N., HAY, C., GOLIGHTLY, D., et al. (1999). "A novel tumor-specific replication-restricted adenoviral vector for gene therapy of hepatocellular carcinoma." *Hum Gene Ther* 10(10): 1721-33.

HAMADA, K., DESAKI, J., NAKAGAWA, K., ZHANG, T., et al. (2007). "Carrier cell-mediated delivery of a replication-competent adenovirus for cancer gene therapy." *Mol Ther* 15(6): 1121-8.

HANAHAH, D. and WEINBERG, R. A. (2000). "The hallmarks of cancer." *Cell* 100(1): 57-70.

HANSEN, K. and KHANNA, C. (2004). "Spontaneous and genetically engineered animal models; use in preclinical cancer drug development." *Eur J Cancer* 40(6): 858-80.

HAUTMANN, S. H., LOKESHWAR, V. B., SCHROEDER, G. L., CIVANTOS, F., et al. (2001). "Elevated tissue expression of hyaluronic acid and hyaluronidase validates the HA-HAase urine test for bladder cancer." *J Urol* 165(6 Pt 1): 2068-74.

HAY, J. G. (2003). ""Man's best friend": a new model system for cancer therapeutics?" *Mol Ther* 7(2): 144-5.

- HAYEN, W., GOEBELER, M., KUMAR, S., RIESSEN, R., et al. (1999). "Hyaluronan stimulates tumor cell migration by modulating the fibrin fiber architecture." *J Cell Sci* 112 (Pt 13): 2241-51.
- HEDLEY, S. J., CHEN, J., MOUNTZ, J. D., LI, J., et al. (2006). "Targeted and shielded adenovectors for cancer therapy." *Cancer Immunol Immunother* 55(11): 1412-9.
- HEISE, C., HERMISTON, T., JOHNSON, L., BROOKS, G., et al. (2000). "An adenovirus E1A mutant that demonstrates potent and selective systemic anti-tumoral efficacy." *Nat Med* 6(10): 1134-9.
- HEMMINKI, A., KANERVA, A., KREMER, E. J., BAUERSCHMITZ, G. J., et al. (2003). "A canine conditionally replicating adenovirus for evaluating oncolytic virotherapy in a syngeneic animal model." *Mol Ther* 7(2): 163-73.
- HERNANDEZ-ALCOCEBA, R., PIHALJA, M., QIAN, D. and CLARKE, M. F. (2002). "New oncolytic adenoviruses with hypoxia- and estrogen receptor-regulated replication." *Hum Gene Ther* 13(14): 1737-50.
- HITT, M. M. and GRAHAM, F. L. (1990). "Adenovirus E1A under the control of heterologous promoters: wide variation in E1A expression levels has little effect on virus replication." *Virology* 179(2): 667-78.
- HOBARTH, K., MAIER, U. and MARBERGER, M. (1992). "Topical chemoprophylaxis of superficial bladder cancer with mitomycin C and adjuvant hyaluronidase." *Eur Urol* 21(3): 206-10.
- HOGGAN, M. D., BLACKLOW, N. R. and ROWE, W. P. (1966). "Studies of small DNA viruses found in various adenovirus preparations: physical, biological, and immunological characteristics." *Proc Natl Acad Sci U S A* 55(6): 1467-74.
- HONG, G., WARD, P. and BERNIS, K. I. (1992). "In vitro replication of adeno-associated virus DNA." *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(10): 4673-7.
- HSIEH, C. L., YANG, L., MIAO, L., YEUNG, F., et al. (2002). "A novel targeting modality to enhance adenoviral replication by vitamin D(3) in androgen-independent human prostate cancer cells and tumors." *Cancer Res* 62(11): 3084-92.
- HUANG, P. I., CHANG, J. F., KIRN, D. H. and LIU, T. C. (2009). "Targeted genetic and viral therapy for advanced head and neck cancers." *Drug Discov Today* 14(11-12): 570-8.
- HUEBNER, R. J., ROWE, W. P., SCHATTE, W. E., SMITH, R. R., et al. (1956). "Studies on the use of viruses in the treatment of carcinoma of the cervix." *Cancer* 9(6): 1211-8.
- HUNTER-CRAIG, I., NEWTON, K. A., WESTBURY, G. and LACEY, B. W. (1970). "Use of vaccinia virus in the treatment of metastatic malignant melanoma." *Br Med J* 2(5708): 512-5.

I

ITANO, N., ATSUMI, F., SAWAI, T., YAMADA, Y., et al. (2002). "Abnormal accumulation of hyaluronan matrix diminishes contact inhibition of cell growth and promotes cell migration." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(6): 3609-14.

ITANO, N., SAWAI, T., MIYAISHI, O. and KIMATA, K. (1999). "Relationship between hyaluronan production and metastatic potential of mouse mammary carcinoma cells." *Cancer Res* 59(10): 2499-504.

J

JACOBSON, A., RAHMANIAN, M., RUBIN, K. and HELDIN, P. (2002). "Expression of hyaluronan synthase 2 or hyaluronidase 1 differentially affect the growth rate of transplantable colon carcinoma cell tumors." *Int J Cancer* 102(3): 212-9.

JANG, S. H., WIENTJES, M. G., LU, D. and AU, J. L. (2003). "Drug delivery and transport to solid tumors." *Pharm Res* 20(9): 1337-50.

JANIK, J. E., HUSTON, M. M. and ROSE, J. A. (1981). "Locations of adenovirus genes required for the replication of adenovirus-associated virus." *Proc Natl Acad Sci U S A* 78(3): 1925-9.

JING, X. J., KALMAN-MALTESE, V., CAO, X., YANG, Q., et al. (2001). "Inhibition of adenovirus cytotoxicity, replication, and E2a gene expression by adeno-associated virus." *Virology* 291(1): 140-51.

JOGLER, C., HOFFMANN, D., THEEGARTEN, D., GRUNWALD, T., et al. (2006). "Replication properties of human adenovirus in vivo and in cultures of primary cells from different animal species." *J Virol* 80(7): 3549-58.

JOHNSON, D. G. and DEGREGORI, J. (2006). "Putting the Oncogenic and Tumor Suppressive Activities of E2F into Context." *Curr Mol Med* 6(7): 731-8.

JOHNSON, L., SHEN, A., BOYLE, L., KUNICH, J., et al. (2002). "Selectively replicating adenoviruses targeting deregulated E2F activity are potent, systemic antitumor agents." *Cancer Cell* 1(4): 325-37.

K

KARLSEDER, J., ROTHENEDER, H. and WINTERSBERGER, E. (1996). "Interaction of Sp1 with the growth- and cell cycle-regulated transcription factor E2F." *Mol Cell Biol* 16(4): 1659-67.

KATANO, H., AFIONE, S., SCHMIDT, M. and CHIORINI, J. A. (2004). "Identification of adeno-associated virus contamination in cell and virus stocks by PCR." *Biotechniques* 36(4): 676-80.

- KHLEIF, S. N., MYERS, T., CARTER, B. J. and TREMPER, J. P. (1991). "Inhibition of cellular transformation by the adeno-associated virus rep gene." *Virology* 181(2): 738-41.
- KIM, J. H., LEE, Y. S., KIM, H., HUANG, J. H., et al. (2006). "Relaxin expression from tumor-targeting adenoviruses and its intratumoral spread, apoptosis induction, and efficacy." *J Natl Cancer Inst* 98(20): 1482-93.
- KIRKNESS, E. F., BAFNA, V., HALPERN, A. L., LEVY, S., et al. (2003). "The dog genome: survey sequencing and comparative analysis." *Science* 301(5641): 1898-903.
- KNUDSON, W. (1996). "Tumor-associated hyaluronan. Providing an extracellular matrix that facilitates invasion." *Am J Pathol* 148(6): 1721-6.
- KOLLY, C., SUTER, M. M. and MULLER, E. J. (2005). "Proliferation, cell cycle exit, and onset of terminal differentiation in cultured keratinocytes: pre-programmed pathways in control of C-Myc and Notch1 prevail over extracellular calcium signals." *J Invest Dermatol* 124(5): 1014-25.
- KOSAKI, R., WATANABE, K. and YAMAGUCHI, Y. (1999). "Overproduction of hyaluronan by expression of the hyaluronan synthase Has2 enhances anchorage-independent growth and tumorigenicity." *Cancer Res* 59(5): 1141-5.
- KRASNYKH, V., DMITRIEV, I., MIKHEEVA, G., MILLER, C. R., et al. (1998). "Characterization of an adenovirus vector containing a heterologous peptide epitope in the HI loop of the fiber knob." *J Virol* 72(3): 1844-52.
- KREMER, E. J., BOUTIN, S., CHILLON, M. and DANOS, O. (2000). "Canine adenovirus vectors: an alternative for adenovirus-mediated gene transfer." *J Virol* 74(1): 505-12.
- KUMAR, S., WEST, D. C., PONTING, J. M. and GATTAMANENI, H. R. (1989). "Sera of children with renal tumours contain low-molecular-mass hyaluronic acid." *Int J Cancer* 44(3): 445-8.
- KWON, O. J., KANG, E., KIM, S. and YUN, C. O. "Viral genome DNA/lipoplexes elicit in situ oncolytic viral replication and potent antitumor efficacy via systemic delivery." *J Control Release* 155(2): 317-25.

L

- LAI, C. M., LAI, Y. K. and RAKOCZY, P. E. (2002). "Adenovirus and adeno-associated virus vectors." *DNA Cell Biol* 21(12): 895-913.
- LANG, F. F., YUNG, W. K., SAWAYA, R. and TOFILON, P. J. (1999). "Adenovirus-mediated p53 gene therapy for human gliomas." *Neurosurgery* 45(5): 1093-104.
- LATHROP, W. F., CARMICHAEL, E. P., MYLES, D. G. and PRIMAKOFF, P. (1990). "cDNA cloning reveals the molecular structure of a sperm surface protein, PH-20, involved in sperm-egg adhesion and the wide distribution of its gene among mammals." *J Cell Biol* 111(6 Pt 2): 2939-49.

LI, Y., YU, D. C., CHEN, Y., AMIN, P., et al. (2001). "A hepatocellular carcinoma-specific adenovirus variant, CV890, eliminates distant human liver tumors in combination with doxorubicin." *Cancer Res* 61(17): 6428-36.

LICHTENSTEIN, D. L., SPENCER, J. F., DORONIN, K., PATRA, D., et al. (2009). "An acute toxicology study with INGN 007, an oncolytic adenovirus vector, in mice and permissive Syrian hamsters; comparisons with wild-type Ad5 and a replication-defective adenovirus vector." *Cancer Gene Ther* 16(8): 644-54.

LIU, N., GAO, F., HAN, Z., XU, X., et al. (2001). "Hyaluronan synthase 3 overexpression promotes the growth of TSU prostate cancer cells." *Cancer Res* 61(13): 5207-14.

LIU, N., LAPCEVICH, R. K., UNDERHILL, C. B., HAN, Z., et al. (2001). "Metastatin: a hyaluronan-binding complex from cartilage that inhibits tumor growth." *Cancer Res* 61(3): 1022-8.

LIU, T. C., GALANIS, E. and KIRN, D. (2007). "Clinical trial results with oncolytic virotherapy: a century of promise, a decade of progress." *Nat Clin Pract Oncol* 4(2): 101-17.

LOKESHWAR, V. B., RUBINOWICZ, D., SCHROEDER, G. L., FORGACS, E., et al. (2001). "Stromal and epithelial expression of tumor markers hyaluronic acid and HYAL1 hyaluronidase in prostate cancer." *J Biol Chem* 276(15): 11922-32.

LOKESHWAR, V. B., YOUNG, M. J., GOUDARZI, G., IIDA, N., et al. (1999). "Identification of bladder tumor-derived hyaluronidase: its similarity to HYAL1." *Cancer Res* 59(17): 4464-70.

M

MA, L., BLUYSSSEN, H. A., DE RAEYMAEKER, M., LAURYSSENS, V., et al. (2001). "Rapid determination of adenoviral vector titers by quantitative real-time PCR." *J Virol Methods* 93(1-2): 181-8.

MAJEM, M., CASCALLO, M., BAYO-PUXAN, N., MESIA, R., et al. (2006). "Control of E1A under an E2F-1 promoter insulated with the myotonic dystrophy locus insulator reduces the toxicity of oncolytic adenovirus Ad-Delta24RGD." *Cancer Gene Ther* 13(7): 696-705.

MARTUZA, R. L., MALICK, A., MARKERT, J. M., RUFFNER, K. L., et al. (1991). "Experimental therapy of human glioma by means of a genetically engineered virus mutant." *Science* 252(5007): 854-6.

MATSUBARA, S., WADA, Y., GARDNER, T. A., EGAWA, M., et al. (2001). "A conditional replication-competent adenoviral vector, Ad-OC-E1a, to cotarget prostate cancer and bone stroma in an experimental model of androgen-independent prostate cancer bone metastasis." *Cancer Res* 61(16): 6012-9.

MCCORMICK, F. (2005). "Future prospects for oncolytic therapy." *Oncogene* 24(52): 7817-9.

MILTON, G. W. and BROWN, M. M. (1966). "The limited role of attenuated smallpox virus in the management of advanced malignant melanoma." *Aust N Z J Surg* 35(4): 286-90.

MOORE, A. E. (1954). "Effects of viruses on tumors." *Annu Rev Microbiol* 8: 393-410.

MORRISON, M. D., ONIONS, D. E. and NICOLSON, L. (1997). "Complete DNA sequence of canine adenovirus type 1." *J Gen Virol* 78 (Pt 4): 873-8.

MULLER, O. J., LEUCHS, B., PLEGER, S. T., GRIMM, D., et al. (2006). "Improved cardiac gene transfer by transcriptional and transductional targeting of adeno-associated viral vectors." *Cardiovasc Res* 70(1): 70-8.

N

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

NETTELBECK, D. M., RIVERA, A. A., BALAGUE, C., ALEMANY, R., et al. (2002). "Novel oncolytic adenoviruses targeted to melanoma: specific viral replication and cytolysis by expression of E1A mutants from the tyrosinase enhancer/promoter." *Cancer Res* 62(16): 4663-70.

NEUMAN, E., FLEMINGTON, E. K., SELLERS, W. R. and KAE LIN, W. G., JR. (1994). "Transcription of the E2F-1 gene is rendered cell cycle dependent by E2F DNA-binding sites within its promoter." *Mol Cell Biol* 14(10): 6607-15.

NEUMAN, E., FLEMINGTON, E. K., SELLERS, W. R. and KAE LIN, W. G., JR. (1995). "Transcription of the E2F-1 gene is rendered cell cycle dependent by E2F DNA-binding sites within its promoter." *Mol Cell Biol* 15(8): 4660.

P

PAOLONI, M. and KHANNA, C. (2008). "Translation of new cancer treatments from pet dogs to humans." *Nat Rev Cancer* 8(2): 147-56.

PATIL, S. S., GENTSCHEV, I., NOLTE, I., OGILVIE, G., et al. "Oncolytic virotherapy in veterinary medicine: current status and future prospects for canine patients." *J Transl Med* 10: 3.

PATNAIK, A. K., EHLER, W. J. and MACEWEN, E. G. (1984). "Canine cutaneous mast cell tumor: morphologic grading and survival time in 83 dogs." *Vet Pathol* 21(5): 469-74.

PAUL, C. P., EVERTS, M., GLASGOW, J. N., DENT, P., et al. (2008). "Characterization of infectivity of knob-modified adenoviral vectors in glioma." *Cancer Biol Ther* 7(5): 786-93.

PETER, I., GRAF, C., DUMMER, R., SCHAFFNER, W., et al. (2003). "A novel attenuated replication-competent adenovirus for melanoma therapy." *Gene Ther* 10(7): 530-9.

PUIG-SAUS, C., GROS, A., ALEMANY, R. and CASCALLO, M. "Adenovirus i-leader truncation bioselected against cancer-associated fibroblasts to overcome tumor stromal barriers." *Mol Ther* 20(1): 54-62.

R

RAMACHANDRA, M., RAHMAN, A., ZOU, A., VAILLANCOURT, M., et al. (2001). "Re-engineering adenovirus regulatory pathways to enhance oncolytic specificity and efficacy." *Nat Biotechnol* 19(11): 1035-41.

RAPER, S. E., CHIRMULE, N., LEE, F. S., WIVEL, N. A., et al. (2003). "Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer." *Mol Genet Metab* 80(1-2): 148-58.

REID, J., WISEMAN-ORR, M. L., SCOTT, E. M. and NOLAN, A. M. "Development, validation and reliability of a web-based questionnaire to measure health-related quality of life in dogs." *J Small Anim Pract*.

RODRIGUEZ, R., SCHUUR, E. R., LIM, H. Y., HENDERSON, G. A., et al. (1997). "Prostate attenuated replication competent adenovirus (ARCA) CN706: a selective cytotoxic for prostate-specific antigen-positive prostate cancer cells." *Cancer Res* 57(13): 2559-63.

ROENIGK, H. H., JR., DEODHAR, S., ST JACQUES, R. and BURDICK, K. (1974). "Immunotherapy of malignant melanoma with vaccinia virus." *Arch Dermatol* 109(5): 668-73.

ROJAS, J. J., CASCALLO, M., GUEDAN, S., GROS, A., et al. (2009). "A modified E2F-1 promoter improves the efficacy to toxicity ratio of oncolytic adenoviruses." *Gene Ther* 16(12): 1441-51.

ROJAS, J. J., GUEDAN, S., SEARLE, P. F., MARTINEZ-QUINTANILLA, J., et al. "Minimal RB-responsive E1A Promoter Modification to Attain Potency, Selectivity, and Transgene-arming Capacity in Oncolytic Adenoviruses." *Mol Ther*.

RUSSELL, S. J., PENG, K. W. and BELL, J. C. "Oncolytic virotherapy." *Nat Biotechnol* 30(7): 658-70.

RUSSELL, W. C. (2000). "Update on adenovirus and its vectors." *J Gen Virol* 81(Pt 11): 2573-604.

RYAN, P. C., JAKUBCZAK, J. L., STEWART, D. A., HAWKINS, L. K., et al. (2004). "Antitumor efficacy and tumor-selective replication with a single intravenous injection of OAS403, an oncolytic adenovirus dependent on two prevalent alterations in human cancer." *Cancer Gene Ther* 11(8): 555-69.

S

- SABEUR, K., FORISTALL, K. and BALL, B. A. (2002). "Characterization of PH-20 in canine spermatozoa and testis." *Theriogenology* 57(2): 977-87.
- SAMULSKI, R. J., ZHU, X., XIAO, X., BROOK, J. D., et al. (1991). "Targeted integration of adeno-associated virus (AAV) into human chromosome 19." *Embo J* 10(12): 3941-50.
- SAUTHOFF, H., HEITNER, S., ROM, W. N. and HAY, J. G. (2000). "Deletion of the adenoviral E1b-19kD gene enhances tumor cell killing of a replicating adenoviral vector." *Hum Gene Ther* 11(3): 379-88.
- SAUTHOFF, H., HU, J., MACA, C., GOLDMAN, M., et al. (2003). "Intratumoral spread of wild-type adenovirus is limited after local injection of human xenograft tumors: virus persists and spreads systemically at late time points." *Hum Gene Ther* 14(5): 425-33.
- SCHALEY, J., O'CONNOR, R. J., TAYLOR, L. J., BAR-SAGI, D., et al. (2000). "Induction of the cellular E2F-1 promoter by the adenovirus E4-6/7 protein." *J Virol* 74(5): 2084-93.
- SCHMIDT, M., AFIONE, S. and KOTIN, R. M. (2000). "Adeno-associated virus type 2 Rep78 induces apoptosis through caspase activation independently of p53." *J Virol* 74(20): 9441-50.
- SCHMIDT, M., GROT, E., CERVENKA, P., WAINER, S., et al. (2006). "Identification and characterization of novel adeno-associated virus isolates in ATCC virus stocks." *J Virol* 80(10): 5082-5.
- SEIRADAKE, E., HENAFF, D., WODRICH, H., BILLET, O., et al. (2009). "The cell adhesion molecule "CAR" and sialic acid on human erythrocytes influence adenovirus in vivo biodistribution." *PLoS Pathog* 5(1): e1000277.
- SETALA, L. P., TAMMI, M. I., TAMMI, R. H., ESKELINEN, M. J., et al. (1999). "Hyaluronan expression in gastric cancer cells is associated with local and nodal spread and reduced survival rate." *Br J Cancer* 79(7-8): 1133-8.
- SHIBATA, R., SHINAGAWA, M., IIDA, Y. and TSUKIYAMA, T. (1989). "Nucleotide sequence of E1 region of canine adenovirus type 2." *Virology* 172(2): 460-7.
- SHIMIZU, Y., HASUMI, K., OKUDAIRA, Y., YAMANISHI, K., et al. (1988). "Immunotherapy of advanced gynecologic cancer patients utilizing mumps virus." *Cancer Detect Prev* 12(1-6): 487-95.
- SHIMONY, N., ELKIN, G., KOLODKIN-GAL, D., KRASNY, L., et al. (2009). "Analysis of adenoviral attachment to human platelets." *Virol J* 6: 25.
- SHUSTER, S., FROST, G. I., CSOKA, A. B., FORMBY, B., et al. (2002). "Hyaluronidase reduces human breast cancer xenografts in SCID mice." *Int J Cancer* 102(2): 192-7.
- SIKORSKI, R. S. and HIETER, P. (1989). "A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*." *Genetics* 122(1): 19-27.
- SIMPSON, M. A., WILSON, C. M. and MCCARTHY, J. B. (2002). "Inhibition of prostate tumor cell hyaluronan synthesis impairs subcutaneous growth and vascularization in immunocompromised mice." *Am J Pathol* 161(3): 849-57.

SMITH, B. F., CUIEL, D. T., TERNOVOI, V. V., BOROVJAGIN, A. V., et al. (2006). "Administration of a conditionally replicative oncolytic canine adenovirus in normal dogs." *Cancer Biother Radiopharm* 21(6): 601-6.

SONG, J. S., KIM, H. P., YOON, W. S., LEE, K. W., et al. (2003). "Adenovirus-mediated suicide gene therapy using the human telomerase catalytic subunit (hTERT) gene promoter induced apoptosis of ovarian cancer cell line." *Biosci Biotechnol Biochem* 67(11): 2344-50.

SOUAIS, C., BOUTIN, S., HONG, S. S., CHILLON, M., et al. (2000). "Canine adenovirus type 2 attachment and internalization: coxsackievirus-adenovirus receptor, alternative receptors, and an RGD-independent pathway." *J Virol* 74(22): 10639-49.

SOUTHAM, C. M. and MOORE, A. E. (1951). "West Nile, Ilheus, and Bunyamwera virus infections in man." *Am J Trop Med Hyg* 31(6): 724-41.

STANTON, R. J., MCSHARRY, B. P., ARMSTRONG, M., TOMASEC, P., et al. (2008). "Re-engineering adenovirus vector systems to enable high-throughput analyses of gene function." *Biotechniques* 45(6): 659-62, 664-8.

STRAUSS, R. and LIEBER, A. (2009). "Anatomical and physical barriers to tumor targeting with oncolytic adenoviruses in vivo." *Curr Opin Mol Ther* 11(5): 513-22.

SUBRAMANIAN, T., VIJAYALINGAM, S. and CHINNADURAI, G. (2006). "Genetic identification of adenovirus type 5 genes that influence viral spread." *J Virol* 80(4): 2000-12.

SUZUKI, K., FUEYO, J., KRASNYKH, V., REYNOLDS, P. N., et al. (2001). "A conditionally replicative adenovirus with enhanced infectivity shows improved oncolytic potency." *Clin Cancer Res* 7(1): 120-6.

SZELECHOWSKI, M., FOURNIER, A., RICHARDSON, J., ELOIT, M., et al. (2009). "Functional organization of the major late transcriptional unit of canine adenovirus type 2." *J Gen Virol* 90(Pt 5): 1215-23.

T

TAUBER, B. and DOBNER, T. (2001). "Molecular regulation and biological function of adenovirus early genes: the E4 ORFs." *Gene* 278(1-2): 1-23.

TERNOVOI, V. V., LE, L. P., BELOUSOVA, N., SMITH, B. F., et al. (2005). "Productive replication of human adenovirus type 5 in canine cells." *J Virol* 79(2): 1308-11.

THOMAS, M. A., SPENCER, J. F., LA REGINA, M. C., DHAR, D., et al. (2006). "Syrian hamster as a permissive immunocompetent animal model for the study of oncolytic adenovirus vectors." *Cancer Res* 66(3): 1270-6.

THOMAS, M. A., SPENCER, J. F., TOTH, K., SAGARTZ, J. E., et al. (2008). "Immunosuppression enhances oncolytic adenovirus replication and antitumor efficacy in the Syrian hamster model." *Mol Ther* 16(10): 1665-73.

TIMPE, J. M., VERRILL, K. C., BLACK, B. N., DING, H. F., et al. (2007). "Adeno-associated virus induces apoptosis during coinfection with adenovirus." *Virology* 358(2): 391-401.

TIMPE, J. M., VERRILL, K. C. and TREMPER, J. P. (2006). "Effects of adeno-associated virus on adenovirus replication and gene expression during coinfection." *J Virol* 80(16): 7807-15.

TOLLEFSON, A. E., RYERSE, J. S., SCARIA, A., HERMISTON, T. W., et al. (1996). "The E3-11.6-kDa adenovirus death protein (ADP) is required for efficient cell death: characterization of cells infected with adp mutants." *Virology* 220(1): 152-62.

TOLLEFSON, A. E., SCARIA, A., HERMISTON, T. W., RYERSE, J. S., et al. (1996). "The adenovirus death protein (E3-11.6K) is required at very late stages of infection for efficient cell lysis and release of adenovirus from infected cells." *J Virol* 70(4): 2296-306.

TOLLEFSON, A. E., SCARIA, A., SAHA, S. K. and WOLD, W. S. (1992). "The 11,600-MW protein encoded by region E3 of adenovirus is expressed early but is greatly amplified at late stages of infection." *J Virol* 66(6): 3633-42.

TOOLE, B. P. (2004). "Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue." *Nat Rev Cancer* 4(7): 528-39.

TORMANEN, H., BACKSTROM, E., CARLSSON, A. and AKUSJARVI, G. (2006). "L4-33K, an adenovirus-encoded alternative RNA splicing factor." *J Biol Chem* 281(48): 36510-7.

TSUKUDA, K., WIEWRODT, R., MOLNAR-KIMBER, K., JOVANOVIC, V. P., et al. (2002). "An E2F-responsive replication-selective adenovirus targeted to the defective cell cycle in cancer cells: potent antitumoral efficacy but no toxicity to normal cell." *Cancer Res* 62(12): 3438-47.

V

VILLANUEVA, A., GARCIA, C., PAULES, A. B., VICENTE, M., et al. (1998). "Disruption of the antiproliferative TGF-beta signaling pathways in human pancreatic cancer cells." *Oncogene* 17(15): 1969-78.

VON EULER, H., SADEGHI, A., CARLSSON, B., RIVERA, P., et al. (2008). "Efficient adenovector CD40 ligand immunotherapy of canine malignant melanoma." *J Immunother* 31(4): 377-84.

W

WADDINGTON, S. N., MCVEY, J. H., BHELLA, D., PARKER, A. L., et al. (2008). "Adenovirus serotype 5 hexon mediates liver gene transfer." *Cell* 132(3): 397-409.

WEIN, L. M., WU, J. T. and KIRN, D. H. (2003). "Validation and analysis of a mathematical model of a replication-competent oncolytic virus for cancer treatment: implications for virus design and delivery." *Cancer Res* 63(6): 1317-24.

WEINDLER, F. W. and HEILBRONN, R. (1991). "A subset of herpes simplex virus replication genes provides helper functions for productive adeno-associated virus replication." *J Virol* 65(5): 2476-83.

WILLMON, C., HARRINGTON, K., KOTTKE, T., PRESTWICH, R., et al. (2009). "Cell carriers for oncolytic viruses: Fed Ex for cancer therapy." *Mol Ther* 17(10): 1667-76.

X

XIA, H., ANDERSON, B., MAO, Q. and DAVIDSON, B. L. (2000). "Recombinant human adenovirus: targeting to the human transferrin receptor improves gene transfer to brain microcapillary endothelium." *J Virol* 74(23): 11359-66.

XU, Z., QIU, Q., TIAN, J., SMITH, J. S., et al. "Coagulation factor X shields adenovirus type 5 from attack by natural antibodies and complement." *Nat Med* 19(4): 452-7.

Y

YAN, W., KITZES, G., DORMISHIAN, F., HAWKINS, L., et al. (2003). "Developing novel oncolytic adenoviruses through bioselection." *J Virol* 77(4): 2640-50.

YING, B., TOTH, K., SPENCER, J. F., MEYER, J., et al. (2009). "INGN 007, an oncolytic adenovirus vector, replicates in Syrian hamsters but not mice: comparison of biodistribution studies." *Cancer Gene Ther* 16(8): 625-37.

YOKOYAMA, T., IWADO, E., KONDO, Y., AOKI, H., et al. (2008). "Autophagy-inducing agents augment the antitumor effect of telerase-selve oncolytic adenovirus OBP-405 on glioblastoma cells." *Gene Ther* 15(17): 1233-9.

Z

ZHENG, S., ULASOV, I. V., HAN, Y., TYLER, M. A., et al. (2007). "Fiber-knob modifications enhance adenoviral tropism and gene transfer in malignant glioma." *J Gene Med* 9(3): 151-60.

ZHOU, C. and TREMPPE, J. P. (1999). "Induction of apoptosis by cadmium and the adeno-associated virus Rep proteins." *Virology* 261(2): 280-7.

ZHOU, C., YANG, Q. and TREMPER, J. P. (1999). "Enhancement of UV-induced cytotoxicity by the adeno-associated virus replication proteins." *Biochim Biophys Acta* 1444(3): 371-83.

ZOLOTUKHIN, S., BYRNE, B. J., MASON, E., ZOLOTUKHIN, I., et al. (1999). "Recombinant adeno-associated virus purification using novel methods improves infectious titer and yield." *Gene Ther* 6(6): 973-85.

