

## Trabajo de Fin de Grado

---

# Desarrollo de una Nanopartícula Viral No Replicativa en *Escherichia coli* Capaz de Inducir Apoptosis en Glioblastoma Multiforme

## NV-ApoGliM

---

**HUGO MORGADO RUIZ**

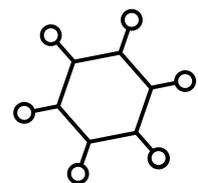
TUTORIZADO POR ANTONIO VILLAVERDE CORRALES PHD

---

Grado en Microbiología

Facultat de Biociències

Universitat Autònoma de Barcelona (UAB)



## CONTENIDO

<b>Antecedentes</b> .....	2
<b>Hipòtesis inicial y objetivos</b> .....	3
<b>Materiales y métodos</b> .....	3
1. Obtención de una cepa de <i>E. coli</i> capaz de producir rAAV .....	4
1.1 Proteína activadora del ensamblaje (AAP) .....	5
1.2 Proteínas codificadas por el gen <i>rep</i> del AAV .....	5
1.3 Clonación en <i>E. coli</i> BL21 .....	5
1.4 Problemas asociados y plan de contingencia .....	6
2. Optimización del tropismo vectorial .....	7
2.1 Error-prone PCR .....	8
2.2 <i>Gibson Assembly</i> .....	8
2.3 Cotransformación plasmídica y producción de rAAV .....	9
2.4 Purificación de los rAAV mutantes, caracterización y evaluación del tropismo vectorial y la capacidad de cruce de la BBB .....	9
2.5 Problemas asociados y plan de contingencia .....	10
3. Encapsidación del gen terapéutico .....	10
4. Pruebas de eficacia y toxicidad .....	11
4.1 Limitaciones y resultados esperados .....	11
<b>Presupuesto y plan de difusión</b> .....	11
<b>Agradecimientos</b> .....	12
<b>Referencias</b> .....	13

## Antecedentes

El glioblastoma multiforme (GBM) es un tipo de tumor cerebral que destaca por ser el más prevalente y a su vez el más agresivo entre este tipo de tumores.<sup>1</sup> La Organización Mundial de la Salud (OMS) en su última clasificación (CNS5, 2021) sitúa el GBM como un tipo de astrocitoma (originado de astrocitos) con fenotipo salvaje para el enzima isocitrato deshidrogenasa (IDH-*wildtype*). Además, clasifica el GBM como grado 4, el nivel más agresivo de tumores del sistema nervioso central (SNC).<sup>2</sup>

En España en el año 2022 se diagnosticaron un total de 280.101 nuevos casos de cáncer, de los cuales 4.169 correspondieron a tumores del SNC.<sup>3</sup> Esto representa aproximadamente un 1,49% del total de diagnósticos oncológicos en ese año, siendo el GBM el más común entre estos, con una frecuencia del 50% según algunos estudios.<sup>4</sup>

La terapia actual para estos pacientes no ha cambiado en los últimos 20 años, consistiendo en cirugía inicial para obtener una muestra y para reseca siempre que sea posible la mayor parte del tumor, radioterapia y quimioterapia adyuvante. En concreto, el quimioterápico de primera línea es la temozolamida (TMZ), un fármaco capaz de atravesar la barrera hematoencefálica (BBB, por sus siglas en inglés) administrado por vía oral. No obstante, el tratamiento puede variar según el grupo de edad.<sup>5</sup>

El pronóstico de la enfermedad a pesar del tratamiento suele ser bajo, con una supervivencia media de 15 meses.<sup>6</sup>

Por todo lo mencionado anteriormente, junto con la dificultad de atravesar eficazmente la BBB, se precisa de investigación en nuevas terapias que ofrezcan un mejor pronóstico para los pacientes con este tipo de tumores.

En los últimos años, ha aumentado el interés por estrategias dirigidas que permitan una alta eficacia así como un alto perfil de seguridad, como la inmunoterapia, terapias basadas en objetivos moleculares (*molecular-targeted therapies*), la viroterapia empleando virus oncolíticos o la terapia génica, siendo esta última la más controvertida por las implicaciones éticas que presenta.<sup>6-9</sup>

En relación con los objetivos moleculares y la terapia génica una de las vías más y mejor estudiadas, debido a su frecuente alteración en células tumorales, es la vía de p53. Varios estudios sugieren que restaurar la función original de la vía proporciona beneficios que en algunos casos pueden ser curativos.<sup>10</sup> Algunas aproximaciones incluyen la complementación con el gen TP53 en células tumorales, la inhibición del regulador negativo MDM2 de p53 o la complementación con genes inductores de la apoptosis mediada por p53, como el gen *bax*.<sup>11-</sup>

15

El uso de nanopartículas suele ser la aproximación más frecuente para llevar a cabo estas terapias. Las nanopartículas permiten una administración segura y dirigida contra los objetivos terapéuticos. En concreto, el uso de nanopartículas virales no replicativas puede ser una estrategia prometedora para la transducción y expresión de genes terapéuticos en células tumorales. La expresión selectiva de los genes terapéuticos en las células diana se pueden lograr de dos maneras: modificando el tropismo de la nanopartícula (vía extrínseca) o añadiendo un promotor al gen terapéutico que haga que este únicamente se exprese en un ambiente tumoral (vía intrínseca).<sup>16</sup>

En los últimos años ha aumentado el uso y el interés por los virus adenoasociados (AAV) como vectores para la terapia génica.<sup>17</sup> Estos AAV son virus satélite, por lo que son incapaces de replicar en la célula hospedadora en ausencia de un virus auxiliar o *helper*, que

usualmente suele ser un adenovirus o un herpesvirus.<sup>18,19</sup> Los AAV presentan un genoma de ADN de cadena sencilla o ssDNA de unas 4,7 kb, flanqueado por dos secuencias invertidas repetidas (ITR), que forman una estructura secundaria en forma de horquilla y se cree que están relacionadas con la encapsidación del material genético.<sup>19</sup>

La obtención de AAV recombinantes o rAAV se realiza en sistemas de expresión eucariotas como células HEK 293, células de insecto o incluso levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* mediante la introducción de dos o tres plásmidos codificantes de todos los elementos necesarios para la generación de las partículas virales.<sup>20</sup> Si bien algunas partículas parecidas a virus (VLPs) derivadas de la cápside de virus adenoasociados han sido obtenidas a partir de sistemas de expresión bacterianos como *Escherichia coli*, hasta el momento solo se han expresado partículas con una única proteína natural o recombinante.<sup>21-23</sup> La obtención de rAAV portadores de un gen terapéutico a partir de un sistema de expresión bacteriano no se ha realizado hasta la fecha, posiblemente por las limitaciones y retos que representa.

## Hipótesis inicial y objetivos

La hipótesis inicial del trabajo plantea si la inducción apoptótica mediante terapia génica empleando vectores virales no replicativos generados en *E. coli* con tropismo aumentado para las células tumorales del GBM puede generar beneficios terapéuticos en pacientes para los cuales el tratamiento de primera línea no ha sido curativo o no ha supuesto una mejora en el pronóstico de la enfermedad, los cuales resultan ser la mayoría.

Si bien la hipótesis inicial es la capacidad de la partícula generada para proporcionar beneficios terapéuticos, otra hipótesis que se desarrolla en el proyecto es si los sistemas de expresión bacterianos pueden resultar útiles y efectivos en la generación de rAAV.

Es por lo anterior mencionado que los objetivos del proyecto se dividen en dos grandes retos. Por un lado, se pretende por primera vez expresar un rAAV funcional a partir de una bacteria modificada por ingeniería genética. Por otro lado, se pretende aumentar las líneas de tratamiento existentes para tratar el GBM, formular una alternativa terapéutica más eficaz y selectiva, mejorar la calidad de vida (QoL) de estos pacientes, alargar la supervivencia y disminuir la cantidad de efectos secundarios que aparecen a causa del tratamiento convencional. Estos últimos objetivos van ligados a la necesidad actual de nuevas líneas terapéuticas para los pacientes con GBM, debido a su alta incidencia dentro de los tumores malignos primarios del sistema nervioso central (50%) y su pobre pronóstico.<sup>1,6</sup>

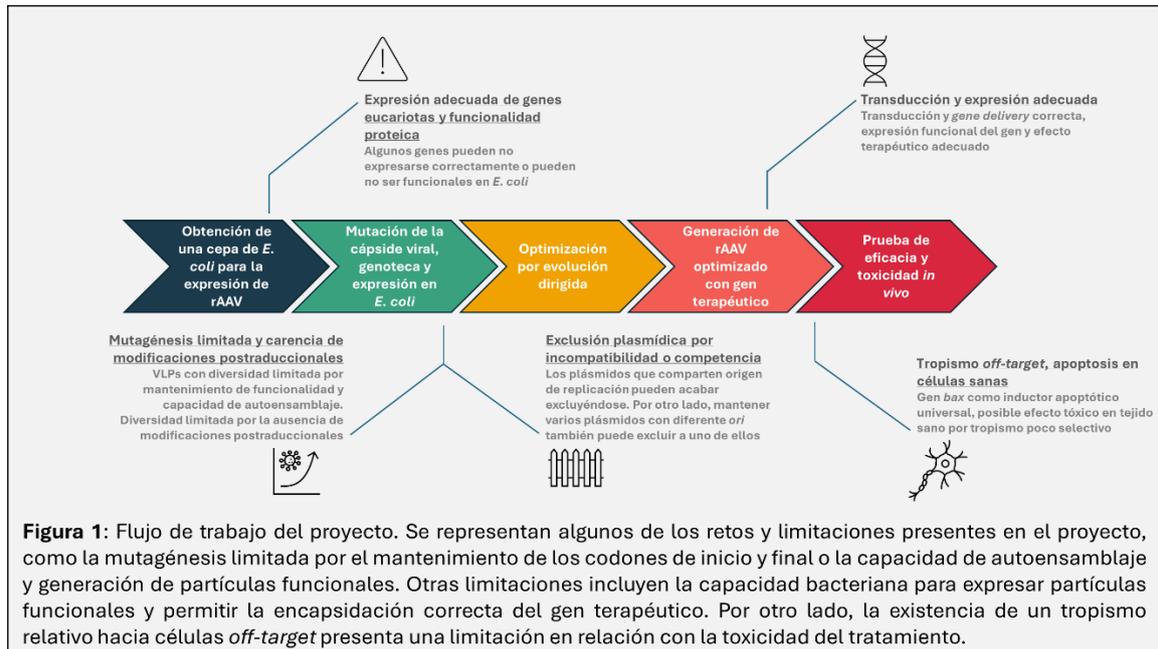
En el siguiente proyecto de investigación se propone una alternativa terapéutica para el GBM basada en la inducción apoptótica de células tumorales gracias a la transducción del gen pro-apoptótico *bax* mediante un virus adeno-asociado (AAV) cuyo tropismo y capacidad de atravesar la BBB han sido optimizados.

## Materiales y métodos

El siguiente proyecto se divide en paquetes de trabajo o *workpacks*. La finalidad de esta distribución es establecer un protocolo controlado y dividido en diferentes fases con objetivos parciales en aras de identificar etapas de riesgo y proponer alternativas.

A grandes rasgos, los paquetes de trabajo se dividen en: obtención de una fábrica celular bacteriana que permita la generación de rAAV, optimización del tropismo vectorial, obtención del producto terapéutico final y evaluación de eficacia y seguridad (**Figura 1**).

En los siguientes subapartados se detallan las etapas de riesgo y las limitaciones de cada fase, con alternativas que permitan que el proyecto continúe en caso de que alguna etapa falle.



## 1. Obtención de una cepa de *E. coli* capaz de producir rAAV

Usualmente, los rAAV no se expresan en sistemas bacterianos, sino en sistemas eucariotas como las células HEK 293 o células de insecto.<sup>20</sup> Es por eso que no existe un método estandarizado para la generación de rAAV en células procariotas. En algunos estudios se han generado VLPs de virus adenoasociados capaces de autoensamblarse en *E. coli* mediante la sobreexpresión de una única proteína, en concreto la VP3.<sup>21-23</sup> Sin embargo, son partículas sin material genético, y por tanto su finalidad no es la terapia génica.

La generación de partículas recombinantes a partir de un virus adenoasociado en procariotas puede resultar controversial por varios motivos, como la carencia de sistemas de modificación postraduccionales o la incapacidad de generar ARNm distintos a partir de un mismo gen mediante *splicing* alternativo o *leaky scanning*. No obstante, los sistemas de expresión bacterianos presentan numerosas ventajas, como el coste, la escalabilidad o la facilidad de modificación y selección de mutantes.

Construir VLPs de AAV con todas las proteínas de la cápsida en *E. coli* teóricamente es posible simplemente expresando las proteínas de la cápsida junto con la proteína activadora del ensamblaje o AAP. El proceso se complica si se pretenden generar rAAV que contengan ADN o ARN, ya que se ha demostrado que la generación de partículas no es siempre dependiente de virus auxiliares, y puede suceder en células expuestas a sustancias genotóxicas.<sup>24</sup> Es por esto, que la replicación y empaquetamiento de un virus adenoasociado en procariotas teóricamente no precisa de la complementación de proteínas auxiliares de otros virus, como herpesvirus, papilomavirus o adenovirus.

Para poder expresar rAAV en procariotas se podría emplear la clonación de ADNc de los diferentes ARNm que codifican la cápsida proteica y las proteínas involucradas en la replicación y la encapsidación del ADN. Para ello, se diseñaría mediante ingeniería genética una cepa de *E. coli* capaz de expresar las proteínas necesarias en el proceso de generación de

partículas de virus adenoasociados. Como se ha mencionado anteriormente, la necesidad de proteínas auxiliares de otros virus en principio no es necesaria.

La cepa obtenida se denominará *E. coli* rAAVexp. A continuación se detallan las proteínas necesarias para producir estos rAAV.

### 1.1 Proteína activadora del ensamblaje (AAP)

Para que la cápside viral se autoensamble en algunos serotipos de AAV, se precisa de una proteína auxiliar codificada por el propio virus que ayude a la estabilización de los capsómeros.<sup>25</sup> Esta proteína auxiliar debería estar presente en el sistema de expresión del rAAV si se desea un ensamblaje correcto de la cápside vírica. La AAP está codificada en el gen *cap* del AAV, y en células eucariotas se expresa gracias a procesos como *leakly scanning*. Para expresar este gen en *E. coli*, se debería unir a un promotor inducible el ADNc del ARNm salvaje que codifica esta proteína en el serotipo de AAV escogido.

### 1.2 Proteínas codificadas por el gen *rep* del AAV

El genoma de los virus adenoasociados cuenta únicamente con dos genes. Uno de ellos es el gen *cap*, que codifica las proteínas de la cápside viral y la AAP, como se ha mencionado anteriormente. Por otro lado, el genoma contiene el gen *rep*, que codifica diferentes proteínas involucradas en la replicación y encapsidación del genoma viral.<sup>26</sup> Este gen codifica para las proteínas Rep78, Rep68, Rep52 y Rep48, que se sintetizan en células eucariotas por *splicing* alternativo y por la iniciación de la transcripción en dos ORFs distintos. Las proteínas Rep78 y Rep68 están involucradas en la replicación del genoma del virus. Estudios han demostrado que la expresión de una de estas dos proteínas en ausencia de otras es suficiente para la replicación del genoma vírico.<sup>27</sup> Por otro lado, las proteínas Rep52 y Rep48 son helicasas involucradas en el proceso de encapsidación del genoma en cápsides preformadas.<sup>28</sup>

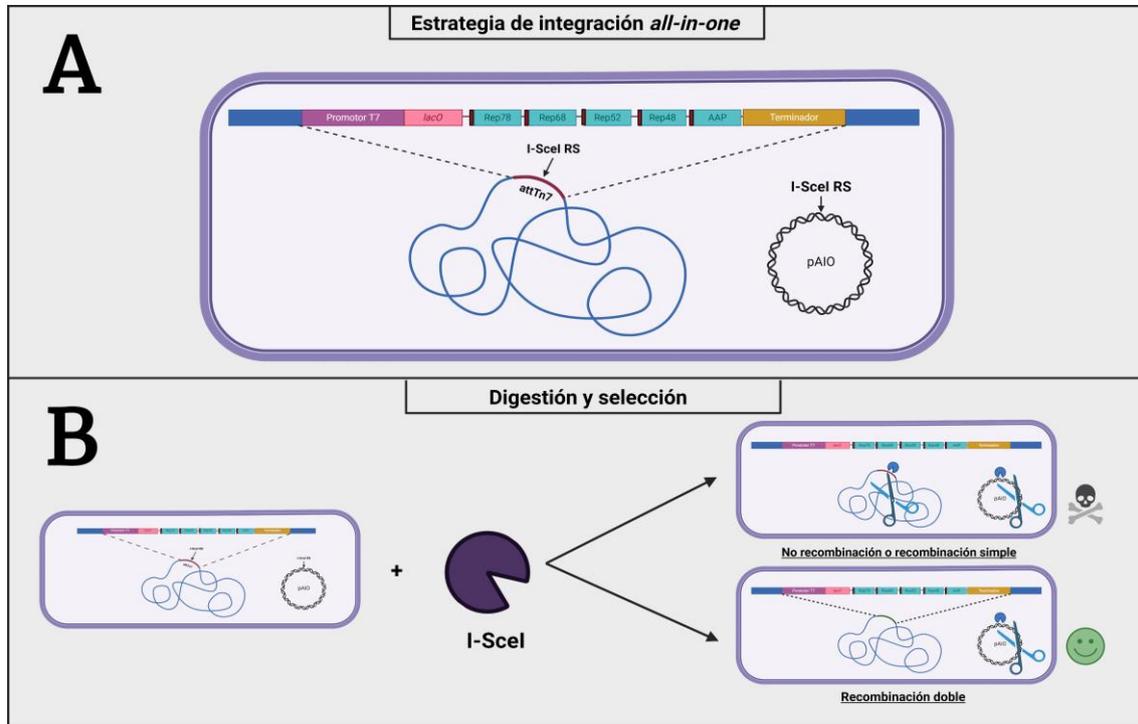
Estas proteínas se pueden expresar en *E. coli* de la misma manera que la AAP, clonando el ADNc de los transcritos maduros en la bacteria.

### 1.3 Clonación en *E. coli* BL21

Por lo comentado anteriormente, las proteínas AAP, Rep78, Rep68, Rep52 y Rep48 serán clonadas en el genoma de la cepa BL21 de *E. coli*. Esta cepa es la elegida para ser modificada porque ya presenta diferentes cualidades que permiten emplearla para sobreexpresar una o varias proteínas de interés mediante el control del promotor de la polimerasa del bacteriófago T7, inducible por el reactivo isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosódico (IPTG).<sup>29</sup>

Para clonar todos estos genes en la bacteria, se ha optado por realizar una estrategia “*all-in-one*” descrita por Egger et al. (2020), que permite la obtención de bacterias modificadas genéticamente sin la necesidad de emplear un gen de resistencia antibiótica.<sup>30</sup> En resumen, esta estrategia permite la integración de un *cassette* amplificado por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con los genes que se desean expresar en la zona de integración del Transposón 7 llamada attTn7 (**Figura 2A**). Al Tn7 se le añade un sitio de corte para el enzima de restricción *I-SceI*, que será el único sitio de corte para este enzima en el genoma bacteriano. La integración sucede por recombinación homóloga mediada por proteínas del fago  $\lambda$ Red, codificadas en el plásmido pAIO, que es transformado en la cepa de *E. coli* antes de la transformación del *cassette*. Por último, se realiza una digestión con *I-SceI* para seleccionar aquellas bacterias en las que ha habido un doble evento de recombinación, y por tanto el *cassette* se ha integrado exitosamente (**Figura 2B**).

Es una técnica que se describe para la cepa BL21 de *E. coli*, lo que facilita el proceso, ya que simplemente es necesario ajustar el *cassette* de interés que se desea clonar, que en este caso será policistrónico (**Figura 2A**). Este *cassette* será inducible por IPTG, ya que se le incorpora el promotor de T7 junto con el represor *lacO*. De esta manera se pretende controlar la expresión génica de todas las proteínas necesarias para la expresión de rAAV.



**Figura 2:** Proceso de obtención de una cepa de *E. coli* mutante capaz de generar rAAV. **(A) Estrategia de integración.** El *cassette* construido presenta dos regiones flanqueantes homólogas al genoma de la bacteria, el promotor de T7, el represor *lacO*, los genes de interés con sus respectivos RBS y el terminador transcripcional. En el genoma bacteriano se observa el transposón Tn7 insertado en el genoma, que presenta la secuencia de corte del enzima I-SceI. También se observa el plásmido pAIO, que codifica las proteínas necesarias para la recombinación, y además también presenta una secuencia de corte para el enzima I-SceI. **(B) Digestión de las células transformadas con el *cassette*.** Al realizar el experimento de digestión, únicamente las células que hayan incorporado el *cassette* en su genoma por doble recombinación serán viables. Si la recombinación no se ha dado o se ha dado un único evento de recombinación, el cromosoma bacteriano linealiza y la célula no será viable. Tras el ensayo de digestión, el plásmido pAIO es cortado y por tanto se pierde por la acción de exonucleasas.

Es importante empelar posteriormente cebadores específicos para amplificar la secuencia del *cassette* y parte del genoma con la finalidad de confirmar la correcta inserción. Posteriormente se realizaría una secuenciación o se correría un gel de agarosa para comprobar que el amplicón es del tamaño esperado.

#### 1.4 Problemas asociados y plan de contingencia

Los principales problemas asociados a la metodología de este paquete de trabajo son la funcionalidad proteica y la capacidad de expresión adecuada de las proteínas en *E. coli* rAAVexp.

Al ser proteínas que se expresan en sistemas eucariotas, la diferencia en la maquinaria celular puede conllevar a la expresión de proteínas no funcionales. En este caso, es posible que la VLP no pueda autoensamblarse o que el gen de interés a empaquetar no pueda ser replicado y encapsidado correctamente según qué proteína no es funcional.

Si la AAP no es funcional, es posible que la VLP no pueda autoensamblarse correctamente, aunque en concreto el AAV9 solo precisa de un fragmento de la AAP llamado CAAP para poder autoensamblarse.<sup>25</sup> Es importante tener en cuenta que, de todas maneras, las proteínas de la cápside expresadas podrían autoensamblarse en *E. coli* sin necesidad de la AAP, pero sería interesante confirmarlo experimentalmente.

Por otro lado, si las proteínas Rep no son funcionales, el genoma no podrá replicar ni encapsidarse. Algunas alternativas para este problema serían la replicación independiente de proteínas Rep o la replicación del gen de interés *in vitro* empleando proteínas Rep funcionales.<sup>31</sup>

Si el genoma no es capaz de encapsidarse, una alternativa sería realizar la encapsidación *in vitro* siguiendo el método descrito por Xiaohua Zhou and Nicholas Muzyczka. (1997).<sup>32</sup>

Algunos problemas se podrían dar en etapas posteriores, pero en resumen las alternativas propuestas en este apartado cubren gran parte de las limitaciones y problemas que podrían surgir a lo largo del proyecto.

## 2. Optimización del tropismo vectorial

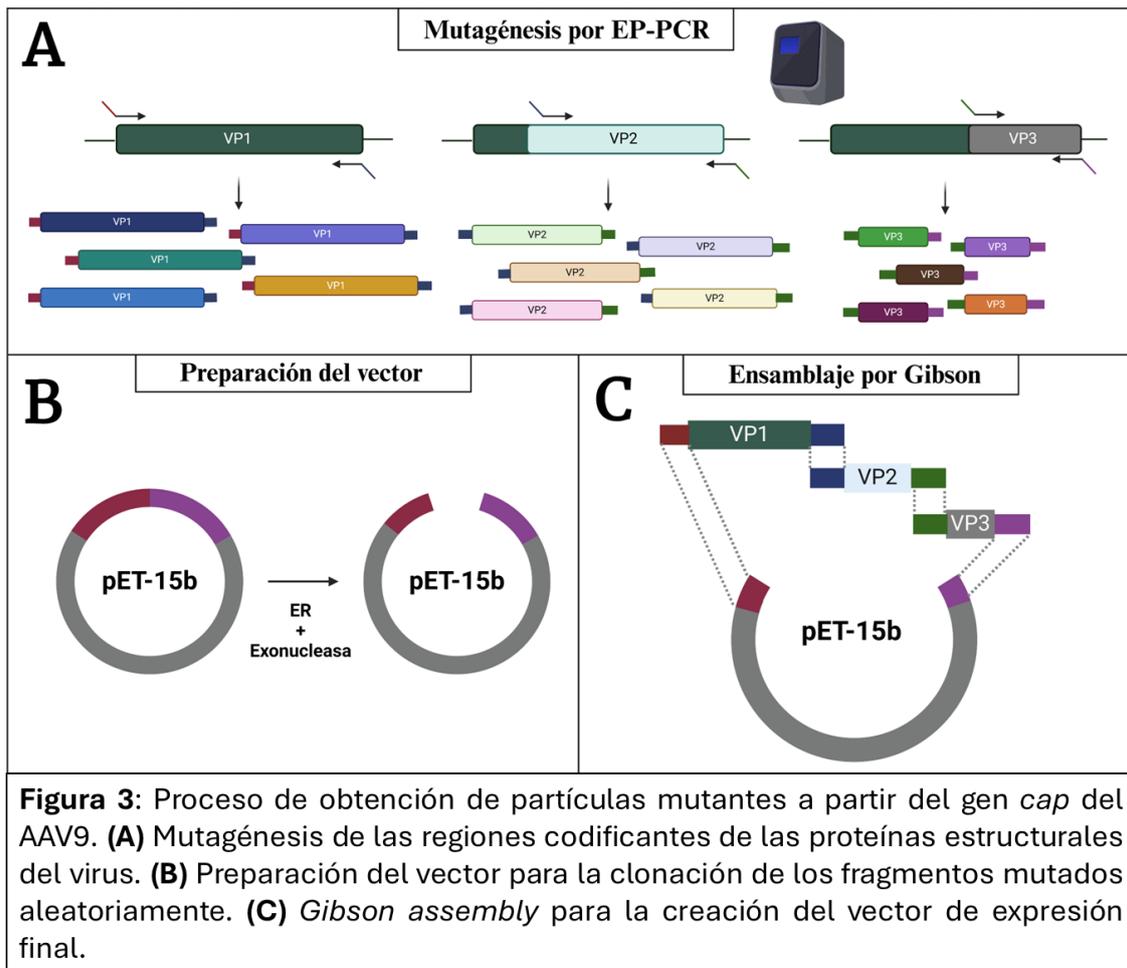
Se optimizará el serotipo 9 o AAV9, por su capacidad natural de atravesar la BBB y presentar cierto tropismo por el SNC.

El aumento del tropismo vectorial por las células tumorales y de la capacidad de atravesar la BBB se llevará a cabo a través de un experimento de evolución dirigida, en el cual se generará una genoteca de plásmidos, cada uno con la capacidad de generar una partícula viral diferente.<sup>16</sup> Para crear la genoteca, se mutarán al azar los genes codificantes de las proteínas de la cápside del AAV9 mediante PCR con tendencia al error o EP-PCR<sup>33,34</sup> Estos amplicones se ensamblarán mediante *Gibson assembly* junto con un vector de expresión previamente linealizado para generar una unidad de expresión policistrónica que será expresada en *E. coli* rAAVexp.<sup>35</sup> La célula será a su vez cotransformada con otro plásmido con diferente origen de replicación y diferente gen seleccionable que contendrá el ADN que se desea empaquetar en la partícula.

Para posteriormente evaluar el tropismo y capacidad de cruce de la BBB de los diferentes mutantes, se empeará la proteína verde fluorescente o GFP expresada bajo el promotor del citomegalovirus (CMV). Esta secuencia debe estar flanqueada por las ITRs del AAV9 para que pueda ser correctamente empaquetada.

Al final se obtendrá un conjunto de partículas víricas con diferentes mutaciones capaces de expresar la GFP, y por tanto, su tropismo y capacidad de cruce de la BBB será evaluable.

El proceso de generación de fragmentos mutantes de la cápside y la clonación de estos en un vector de expresión para obtener la genoteca se resume en la **Figura 3**.



## 2.1 Error-prone PCR

A partir de la secuencia del gen *cap* del AAV9 (AY530579.1), se amplificarán por separado mediante EP-PCR los fragmentos génicos codificantes de las proteínas de la cápside VP1, VP2 y VP3.<sup>33,34</sup> Los cebadores empleados, contienen una región extendida que presenta secuencias no codificantes homólogas entre amplicones y el propio vector, tal y como se observa por colores en la **Figura 3A**. Estas secuencias deberán de contener regiones de Shine-Dalgarno, que son secuencias a las que se une el ribosoma bacteriano (RBS), en aras de que el ribosoma bacteriano pueda traducir correctamente y por separado cada proteína.

Los amplicones mutados al azar serán purificados posteriormente en un gel de agarosa o mediante algún kit comercial, según el tamaño estimado del amplicón.

## 2.2 Gibson Assembly

El ensamblaje por Gibson es una técnica que permite la unión de hasta 5 fragmentos de ADN *in vitro*, lo cual permite clonar varios fragmentos de ADN a un vector previamente linealizado.<sup>35</sup> Es una técnica de elección en este caso porque ofrece una alternativa de clonación de ADN al uso de enzimas de restricción, que debido a la EP-PCR, podría generar cortes en el interior de los amplicones, pudiendo bajar la eficiencia en la obtención de fragmentos mutantes.

La adición de regiones homólogas en los amplicones permite realizar un ensamblaje de Gibson de todos los productos de PCR junto con un vector de expresión previamente linealizado empleando el enzima de restricción *NdeI* y la exonucleasa T5 (**Figura 3B y C**).

En este caso el vector de expresión elegido es un plásmido de la serie pET, en concreto el plásmido pET-15b. Los plásmidos de la serie pET son uno de los vectores de expresión más empleados para la sobreexpresión de proteínas en *E. coli* por su alto nivel de expresión y su relativamente fácil manipulación y regulación.

De nuevo, los plásmidos recombinantes obtenidos por este método se purificarán empleando un kit comercial o realizando electroforesis en gel de agarosa.

Para finalizar, sería conveniente amplificar el inserto con cebadores adecuados y posteriormente secuenciar para confirmar la correcta clonación del inserto.

### 2.3 Cotransformación plasmídica y producción de rAAV

A partir de la genoteca creada, se transformará mediante electroporación la cepa de *E. coli* rAAVexp con dos plásmidos, uno que contenga los genes que codifican la cápside y otro que contenga el ADN a empaquetar con el gen *reporter* EGFP.

Existen varios plásmidos comerciales que contienen ya el gen EGFP controlado bajo el promotor del CMV o el promotor CAG, como por ejemplo el pAV-CAG-GFP. Este plásmido permite la replicación del genoma modificado del AAV9 y su encapsidación. Es importante que los dos plásmidos contengan orígenes de replicación y resistencias antibióticas diferentes, para asegurar la cotransformación, evitar la pérdida de un plásmido por exclusión o competencia y seleccionar adecuadamente las bacterias que han incorporado ambos plásmidos.

Al final, se siembran las bacterias cotransformadas en medio selectivo para los dos plásmidos y se induce la expresión de todas las proteínas necesarias para la producción y encapsidación del rAAV añadiendo IPTG.

### 2.4 Purificación de los rAAV mutantes, caracterización y evaluación del tropismo vectorial y la capacidad de cruce de la BBB

Las partículas resultantes se purificarán por separado para poder establecer trazabilidad. La purificación se realizará según el método descrito por Fripont. (2019).<sup>36</sup> Este método deberá adaptarse a células procariontas, empleando los enzimas necesarios para la lisis bacteriana.

Por otro lado, estas partículas se analizarían por microscopía electrónica para comprobar la estructura de la cápside viral.

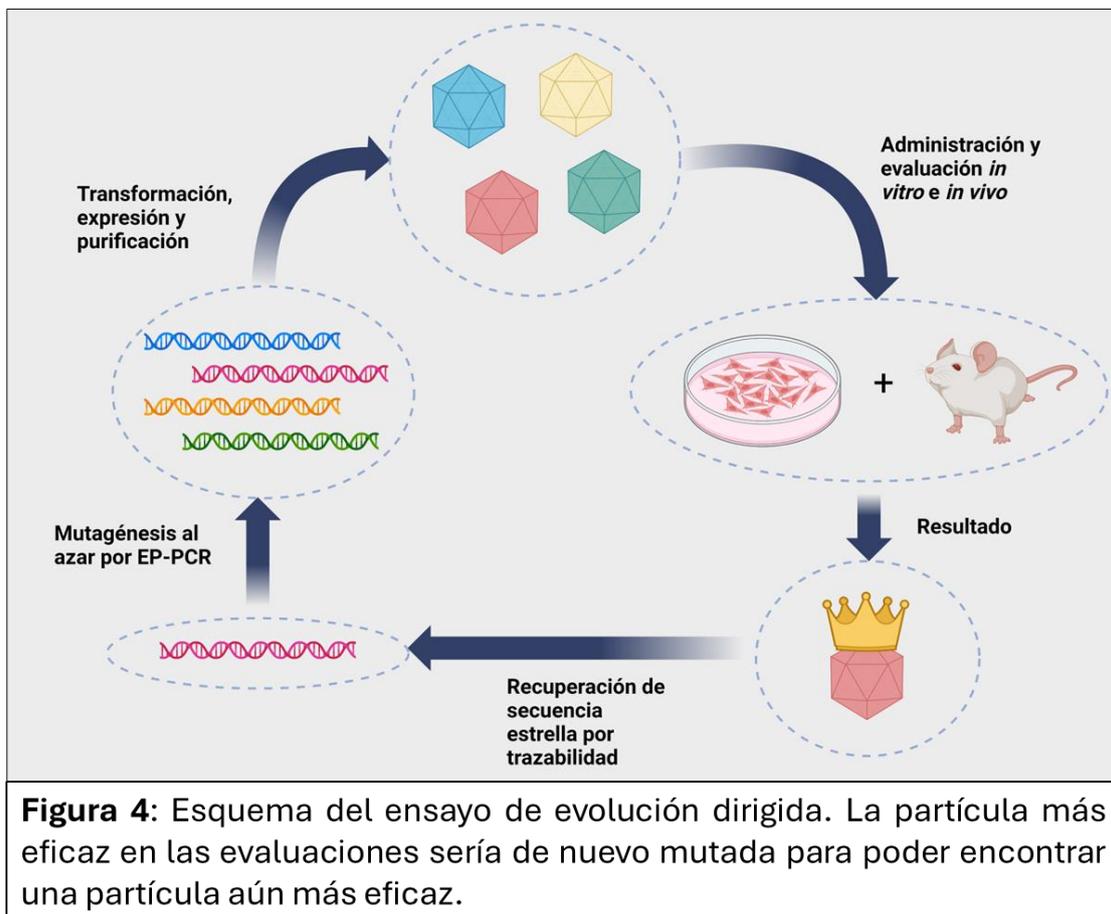
El método descrito por Fripont. (2019) también permite evaluar el tropismo selectivo de las partículas purificadas mediante la detección de fluorescencia. Esto se realizaría primero *in vitro* y posteriormente en un modelo murino.

Para la evaluación del tropismo *in vitro* se realizaría un cultivo de células de GBM y se transfectaría con diferentes rAAV para evaluar la más selectiva. Esto se ha realizado con otros virus y otros genes *reporter* también para el GBM, por lo que el protocolo sería el mismo.<sup>37</sup> Por otro lado, para evaluar la capacidad de cruzar la BBB se pueden emplear estrategias *in vitro* como la descrita por Cho et al. (2017).<sup>38</sup>

Estos experimentos *in vitro* deberían acompañarse de la evaluación de las mismas partículas en un modelo murino infectado por vía sistémica, que sería la ruta preferente de administración del producto terapéutico final. No obstante, también podría realizarse la evaluación empleando diferentes rutas de administración para ver cuál presenta mayor eficacia y perfil de seguridad. El modelo de elección sería ratones a los que se les ha inoculado células tumorales de GBM.<sup>39</sup>

La situación ideal sería aquella en la que, tras analizar la fluorescencia producida en el ratón, haya una detección muy alta en la localización del tumor y muy baja o nula en el resto del ratón.

Una vez realizados ambos ensayos, se escogería la partícula más eficaz, se observaría por trazabilidad cuál es la secuencia de los genes *cap* que la ha producido y estos genes *cap* se volverían a someter al mismo proceso mencionado en este apartado (EP-PCR, generación de genoteca...). Esto se realizaría varias veces para aumentar la selectividad y la capacidad de cruce de la BBB (**Figura 4**).



### 2.5 Problemas asociados y plan de contingencia

Muchos de los problemas asociados durante este proceso ya han sido mencionados anteriormente en el [apartado 1.4](#). Como posible problema en este último proceso, se encuentra la capacidad de la bacteria de generar las tres proteínas y que sean capaces de autoensamblarse. En caso de que no fueran capaces, se podrían expresar las proteínas por separado y posteriormente se juntarían en un entorno óptimo que permita su autoensamblaje *in vitro*.<sup>32</sup> Este proceso se podría realizar en conjunto con la encapsidación *in vitro* antes mencionada.

### 3. Encapsidación del gen terapéutico

Para encapsidar el gen terapéutico, en este caso el gen *bax* humano, se sigue el mismo principio mencionado en el [apartado 2.3](#), pero el gen *EGFP* ahora será el gen *bax*. Este gen se insertará en el plásmido como ADNc, con el fin de optimizar el espacio.

Al final se obtiene la partícula vírica con el tropismo aumentado y portadora del gen pro-apoptótico *bax*.

De nuevo, y como plan de contingencia, si no fuera posible el empaquetamiento en las células de *E. coli* rAAVexp, se podría empaquetar *in vitro*. Otra alternativa sería generar la partícula recombinante con los genes *cap* que permiten el tropismo aumentado y el genoma con el gen terapéutico en células HEK 239 o células de insecto.

Se deberá asegurar que las partículas han empaquetado correctamente el ADN gen terapéutico mediante comprobación por PCR.

#### 4. Pruebas de eficacia y toxicidad

De la misma manera que en la evolución dirigida, se cuantificará la capacidad del rAAV generado de inducir apoptosis en células de GBM, tanto *in vitro* como en un modelo murino.

Para evaluar esto *in vitro*, se emplearán algunas pruebas como el ensayo TUNEL, la microscopía de fluorescencia o la detección de formas activas de caspasas o de sus siguientes moléculas cascada.<sup>40</sup>

Es importante utilizar un control negativo, como un cultivo de astrocitos sanos, para comprobar que la partícula únicamente genera apoptosis en células tumorales, y no en células sanas. Se requerirán también otros tejidos para evaluar la toxicidad, como el tejido hepático.

Las pruebas *in vivo* se realizarán de la misma manera que *in vitro*, pero además se podría medir la disminución del tamaño del tumor mediante resonancia magnética nuclear (RMN) y se podría evaluar la supervivencia del ratón, siempre comparando con un control.

##### 4.1 Limitaciones y resultados esperados

A pesar de que los resultados que se esperan obtener son favorables, existen algunas limitaciones que podrían hacer que la eficacia del tratamiento variara. Las dos grandes limitaciones del tratamiento son la existencia de anticuerpos neutralizantes contra el producto terapéutico y la incapacidad del virus de replicar en células tumorales. Desarrollando esta última limitación, las células tumorales destacan por su capacidad de división, lo que modifica la eficacia del tratamiento, ya que el virus no es replicativo y por tanto es incapaz de mantenerse en la progenie tras varios eventos de división celular.

## Presupuesto y plan de difusión

El presupuesto para el proyecto se estima teniendo en cuenta que se realizará en el Institut de Biotecnologia i Biomedicina de la UAB (IBB). El personal necesario ya se encuentra contratado en el centro, por lo que los sueldos del personal ya son pagados por la institución o becas externas. Además, la tecnología y equipos de trabajo básicos como termocicladores o centrifugadoras ya se encuentran en el centro,

El equipo contará con el investigador principal, un técnico de laboratorio que emplee la mitad de su tiempo en el proyecto, una investigadora, investigadore o investigador relacionado con el mundo de la microbiología, la biotecnología y la virología, una persona licenciado en veterinaria para el cuidado y manutención de animales y una plaza de doctorado en biología molecular y biomedicina. Quisiera mencionar que la elección del personal se realizará en función de las cualidades individuales de cada persona, sin importancia de sexo, género, procedencia u orientación sexual.

A continuación se desglosa el presupuesto del proyecto por paquetes, teniendo en cuenta que tiene una duración de unos 3 años.

- Personal: 0€ (personal ya contratado más becas predoctorales).
- Establecimiento:
  - Costes de equipo de libre uso comprado por el IBB: 0€
  - Costes de servicios externos como microscopía electrónica, secuenciación o cultivos celulares: 10.000€
  - Costes estabulario y manutención animal: 25.200€
- Gasto en ratones (a 30€ el ratón): se emplearían uno 50 ratones, por lo que el coste sería de 1.500€
- Gastos de material fungible y reactivos (1.000€ por persona y mes): 144.000€
- Gastos de difusión: 0€ (convenios del IBB con editoriales)
- Asistencia a congresos (2.000€ al año): 6.000€
- Análisis de patentabilidad: 10.000€

A este presupuesto se le añade un 25% para gastos indirectos e imprevistos, por lo que el presupuesto total del proyecto es de 245.875€.

En caso de que el análisis de patentabilidad permitiera patentar el producto, el presupuesto podría variar, con una cifra estimada de 100.000€.

El plan de difusión consiste en la publicación de los resultados obtenidos en artículos científicos, publicados en las editoriales que presentan convenio con el IBB o con la UAB. Estas publicaciones se realizarán teniendo en cuenta si el producto es patentable o no, con la finalidad de proteger la propiedad intelectual. Además, por principios personales, los resultados solo se publicarán en revistas de acceso libre y gratuito.

## Agradecimientos

Quisiera primero agradecer a mi tutor del trabajo, por brindarme la ayuda necesaria para desarrollar el proyecto. También me gustaría expresar mi gratitud a mi entorno de amistades más cercano por su apoyo. Por último, quiero agradecer especialmente a mi pareja por proporcionarme la perspectiva clínica necesaria para desarrollar el proyecto, así como por transmitirme el problema relacionado con los tumores cerebrales.

## Referencias

1. Wirsching, H.-G., Galanis, E. & Weller, M. Glioblastoma. in *Handbook of Clinical Neurology* vol. 134 381–397 (Elsevier, 2016).
2. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34185076/>.
3. Sociedad Española de Oncología Médica. (2022). Las cifras del cáncer en España. [https://seom.org/images/LAS\\_CIFRAS\\_DEL\\_CANCER\\_EN\\_ESPANA\\_2022.pdf](https://seom.org/images/LAS_CIFRAS_DEL_CANCER_EN_ESPANA_2022.pdf)
4. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2015-2019 - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36196752/>.
5. Martínez-García, M. *et al.* SEOM clinical guidelines for diagnosis and treatment of glioblastoma (2017). *Clin. Transl. Oncol.* **20**, 22–28 (2018).
6. Verdugo, E., Puerto, I. & Medina, M. Á. An update on the molecular biology of glioblastoma, with clinical implications and progress in its treatment. *Cancer Commun.* **42**, 1083–1111 (2022).
7. Mahmoud, A. B. *et al.* Advances in immunotherapy for glioblastoma multiforme. *Front. Immunol.* **13**, 944452 (2022).
8. Ma, R., Taphoorn, M. J. B. & Plaha, P. Advances in the management of glioblastoma. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **92**, 1103–1111 (2021).
9. Rong, L., Li, N. & Zhang, Z. Emerging therapies for glioblastoma: current state and future directions. *J. Exp. Clin. Cancer Res. CR* **41**, 142 (2022).
10. p53-based Cancer Therapy - PMC. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2926755/>.
11. Köck, H. *et al.* Adenovirus-mediated p53 gene transfer suppresses growth of human glioblastoma cells in vitro and in vivo. *Int. J. Cancer* **67**, 808–815 (1996).
12. p53-based Cancer Therapy - PMC.
13. Zhang, W.-W. *et al.* The First Approved Gene Therapy Product for Cancer Ad-p53 (Gendicine): 12 Years in the Clinic. *Hum. Gene Ther.* **29**, 160–179 (2018).
14. Hernández Borrero, L. J. & El-Deiry, W. S. Tumor suppressor p53: Biology, signaling pathways, and therapeutic targeting. *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer* **1876**, 188556 (2021).
15. Liu, Y. *et al.* Targeting tumor suppressor genes for cancer therapy. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* **37**, 1277–1286 (2015).
16. Engineering Cancer Selective Virotherapies: Are the Pieces of the Puzzle Falling into Place? <https://www.liebertpub.com/doi/epdf/10.1089/hum.2022.178>  
doi:10.1089/hum.2022.178.

17. Ji, S.-O. & Dv, S. Adeno-associated virus (AAV) vectors in cancer gene therapy. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* **240**, (2016).
18. Balakrishnan, B. & Jayandharan, G. R. Basic biology of adeno-associated virus (AAV) vectors used in gene therapy. *Curr. Gene Ther.* **14**, 86–100 (2014).
19. Adeno-Associated Virus Biology | SpringerLink. [https://link-springer-com.are.uab.cat/protocol/10.1007/978-1-61779-370-7\\_1](https://link-springer-com.are.uab.cat/protocol/10.1007/978-1-61779-370-7_1).
20. Gray, J. T. & Zolotukhin, S. Design and Construction of Functional AAV Vectors. in *Adeno-Associated Virus: Methods and Protocols* (eds. Snyder, R. O. & Moullier, P.) 25–46 (Humana Press, Totowa, NJ, 2011). doi:10.1007/978-1-61779-370-7\_2.
21. Le, D. T., Radukic, M. T., Teschner, K., Becker, L. & Müller, K. M. Synthesis and Concomitant Assembly of Adeno-Associated Virus-like Particles in Escherichia coli. *ACS Synth. Biol.* **11**, 3601–3607 (2022).
22. Le, D. T., Radukic, M. T. & Müller, K. M. Adeno-associated virus capsid protein expression in Escherichia coli and chemically defined capsid assembly. *Sci. Rep.* **9**, 18631 (2019).
23. Production of VP3-only virus-like particles of Adeno-associated virus 2 in E. coli cells - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38754753/>.
24. Nicolas, A. *et al.* Factors influencing helper-independent adeno-associated virus replication. *Virology* **432**, 1–9 (2012).
25. The Assembly-Activating Protein Promotes Stability and Interactions between AAV's Viral Proteins to Nucleate Capsid Assembly - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29742436/>.
26. Timpe, J., Bevington, J., Casper, J., Dignam, J. D. & Trempe, J. P. Mechanisms of adeno-associated virus genome encapsidation. *Curr. Gene Ther.* **5**, 273–284 (2005).
27. Hölscher, C., Kleinschmidt, J. A. & Bürkle, A. High-level expression of adeno-associated virus (AAV) Rep78 or Rep68 protein is sufficient for infectious-particle formation by a rep-negative AAV mutant. *J. Virol.* **69**, 6880–6885 (1995).
28. King, J. A., Dubielzig, R., Grimm, D. & Kleinschmidt, J. A. DNA helicase-mediated packaging of adeno-associated virus type 2 genomes into preformed capsids. *EMBO J.* **20**, 3282–3291 (2001).
29. Recombinant Protein Expression in Escherichia coli (E.coli): What We Need to Know - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29384059/>.
30. Fast and antibiotic free genome integration into Escherichia coli chromosome | Scientific Reports. <https://www.nature.com/articles/s41598-020-73348-x>.
31. Ni, T. H., Zhou, X., McCarty, D. M., Zolotukhin, I. & Muzyczka, N. In vitro replication of adeno-associated virus DNA. *J. Virol.* **68**, 1128–1138 (1994).

32. Zhou, X. & Muzyczka, N. In vitro packaging of adeno-associated virus DNA. *J. Virol.* **72**, 3241–3247 (1998).
33. Cadwell, R. C. & Joyce, G. F. Randomization of genes by PCR mutagenesis. *PCR Methods Appl.* **2**, 28–33 (1992).
34. Wilson, D. S. & Keefe, A. D. Random mutagenesis by PCR. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* **Chapter 8**, Unit8.3 (2001).
35. Avilan, L. Assembling Multiple Fragments: The Gibson Assembly. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **2633**, 45–53 (2023).
36. Production, Purification, and Quality Control for Adeno-associated Virus-based Vectors - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30774140/>.
37. Wang, L. *et al.* A tropism-transformed Oncolytic Adenovirus with Dual Capsid Modifications for enhanced Glioblastoma Therapy. *J. Cancer* **11**, 5713–5726 (2020).
38. Cho, C.-F. *et al.* Blood-brain-barrier spheroids as an in vitro screening platform for brain-penetrating agents. *Nat. Commun.* **8**, 15623 (2017).
39. Jin, F., Jin-Lee, H. J. & Johnson, A. J. Mouse Models of Experimental Glioblastoma. in *Gliomas* (ed. Debinski, W.) (Exon Publications, Brisbane (AU), 2021).
40. Kyrylkova, K., Kyryachenko, S., Leid, M. & Kioussi, C. Detection of apoptosis by TUNEL assay. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **887**, 41–47 (2012).