



Universitat Autònoma de Barcelona

CENTRO DE BIOTECNOLOGÍA ANIMAL Y TERAPIA GÉNICA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR
PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOQUÍMICA, BIOLOGÍA
MOLECULAR Y BIOMEDICINA

**INMUNOMODULACIÓN DE LA VÍA TH17
CON VECTORES VIRALES PORTADORES DEL
RECEPTOR SOLUBLE DE IL23:
UNA NUEVA ESTRATEGIA DE TERAPIA GÉNICA
PARA EL TRATAMIENTO DE ESCLEROSIS MÚLTIPLE**

TESIS DOCTORAL

MARTA MIRALLES CONSUEGRA

Julio, 2014



IV. Discusión

IL23, Th17 y enfermedades autoinmunes

El sistema inmune se encarga de defender al organismo de una gran cantidad de patógenos como bacterias, virus, hongos o parásitos, que se encuentran en constante evolución. Ello se consigue gracias a células inmunes poseedoras de un casi ilimitado repertorio de receptores de antígenos, que se generan en un proceso aleatorio, por lo que es crucial la capacidad del sistema inmune de distinguir lo propio de lo no-propio mediante los mecanismos de tolerancia. Algunas células autoinmunoreactivas consiguen escapar de estos mecanismos de tolerancia convirtiéndose en un peligro para la salud del organismo, ya que pueden dar lugar al desarrollo de desordenes autoinmunes. La patogénesis de estas enfermedades en muchas ocasiones implica una reacción espontánea de linfocitos T *helper* (Th), que producen citoquinas proinflamatorias y ayudan a las células T autoreactivas y linfocitos B. Dependiendo del perfil de citoquinas generadas, existen varias subpoblaciones de células Th.

Durante años estuvo vigente la hipótesis de que las células Th1 eran las responsables de la autoinmunidad. Sin embargo, varios estudios habían demostrado que los animales carentes de esta vía no solo no eran resistentes a la inducción de modelos de enfermedad autoinmunes, sino que incluso eran más susceptibles (Ferber et al., 1996; Jones et al., 1997).

El descubrimiento de la IL23 (formada por las subunidades IL12p40 y p19) fue crucial en el cambio de este paradigma, pues quedó al descubierto que la cadena IL12-p40 no pertenecía únicamente a la IL12. Esta creencia había llevado en el pasado a la suposición errónea de que los trastornos autoinmunes eran producidos por una respuesta Th1, pues la detección de IL12-p40 se explicaba únicamente por la presencia de IL12 (Cua et al., 2003). Más tarde se demostró que la IL23 inducía una subpoblación de células Th, llamadas Th17 por su alta producción de IL17. En un estudio de Cua *et al.* se mostró que la carencia de p19, y por tanto de IL23, confería resistencia a la EAE, mientras que los animales deficientes en IL12-p35 (subunidad única de IL12) seguían siendo vulnerables a la enfermedad (Murphy et al., 2003). Asimismo, fueron detectados niveles altos de IL17 en enfermedades como esclerosis múltiple (Matusevicius et al., 1999), artritis reumatoide (Aarvak et al., 1999) y psoriasis

(Teunissen et al., 1998), todas ellas autoinmunes. Ello condujo a la creencia de que las células Th17 juegan un papel indispensable en el desarrollo de este tipo de enfermedades.

Los estudios sobre las células Th17 han señalado que la diferenciación en estas células se origina por la presencia en el medio de TGF- β e IL6, sin el requerimiento de IL23 (Bettelli et al., 2006; Veldhoen et al. 2006). Sin embargo, los ratones deficientes en IL23 o IL23R son incapaces de desarrollar una respuesta significativa Th17 *in vivo*, siendo la IL23 una citoquina esencial en los estados iniciales de la expansión y el mantenimiento de esta población celular (Langrish et al., 2005; McGeachy et al., 2009). Por otra parte, por el momento no se conoce ninguna implicación directa de la IL23 en otros subconjuntos de células T *helper*, siendo específica de Th17.

En el período de inicio de la tesis, existían estudios publicados que señalaban que la inhibición de IL12-p40 por anticuerpos monoclonales inhibía a su vez la inflamación mediada por Th17 (Brok et al., 2002; 't Hart et al., 2005). De hecho, más tarde fue aprobado el medicamento Ustekinumab, consistente en anticuerpos humanos monoclonales contra p40 para el tratamiento de enfermedades autoinmunes (Cingoz, 2009). De igual manera, los resultados publicados sobre el uso del compuesto activo triptolida, derivado de la planta *Tripterygium wilfordii* y que actúa como inhibidor natural de la p40, también sugieren un efecto positivo en modelos de autoinmunidad (Zhang et al., 2010). No obstante, ninguno de estos abordajes terapéuticos inhibe específicamente Th17, pues mediante la inhibición de la subunidad p40, se ven afectadas IL23 e IL12.

En 2006 fue publicado un artículo del grupo del grupo del Dr. Cua en el cual se demostraba que una terapia basada en el bloqueo de IL23 mediante anticuerpos monoclonales anti-p19 prevenía la inducción de EAE y revertía la enfermedad una vez establecida (Chen et al., 2006). En este estudio comparaban la terapia anti-p40 con la anti-p19, concluyendo que, si bien ambas aproximaciones proporcionaban resistencia a la inflamación autoinmune, la primera ocasionaba innumerables efectos secundarios debido a la inhibición de Th1 y Th17. Además también se demostró que la inhibición de Th1 era del todo innecesaria para bloquear la respuesta autoinmune. Otros estudios

llevados a cabo con modelos de artritis determinaron que la inyección intraarticular en ratones de un anticuerpo anti-IL23R disminuía la gravedad clínica a la vez que reducía la expresión de TNF α , IL6, IL17, IL23 e IL23R en el espacio sinovial (Lee et al., 2007). En ratas, la neutralización de IL23 con anticuerpos anti-p19 reducía la puntuación clínica de la enfermedad y disminuía la erosión del hueso (Yago et al., 2007). En concordancia con estos trabajos, en 2009 fue publicado un estudio en el cual se reportaba una mejora de los síntomas clínicos en ratones con CIA tras un tratamiento basado en la vacunación contra IL23p19 (Ratsimandresy et al., 2011). Además, se ha demostrado que la neutralización de IL23 no compromete la eficacia de la inmunidad contra infecciones mediada por IL12 (Chackerian et al., 2006).

Debido a la implicación de Th17 en la respuesta autoinmune y del papel esencial y específico de la IL23 en el desarrollo de esta vía, hechos bastante recientes en el inicio de este trabajo, establecimos como objetivo principal de la tesis la inmunomodulación de la vía Th17 por inhibición selectiva de IL23, mediante una estrategia de terapia génica basada en un bloqueo de la cadena única p19.

Para este trabajo se priorizó el planteamiento de un diseño experimental no basado en anticuerpos, pues deben ser administrados repetidamente a los pacientes. Tampoco se consideró un diseño basado en shRNAs, pues solo son eficientes en las células transfectadas. Por el contrario, nos propusimos realizar un diseño experimental que consistiera en un factor soluble que pudiera ser expresado y secretado por vectores virales.

En este sentido, en 2006, había sido publicado un artículo describiendo la existencia de al menos seis isoformas de IL23R humano originadas por *splicing* alternativo (Zhang et al., 2006). Algunas de ellas, como IL23R4, eran solubles y secretadas al exterior celular. Estas isoformas solubles eran preferentemente producidas por células cancerígenas, hecho que llevó a los autores a conjeturar que podrían proporcionar un mecanismo de escape a las células tumorales frente al ataque inmunológico. Se decidió pues, clonar la forma soluble del receptor de IL23 (IL23R4) en vectores virales, y llevar a cabo un diseño experimental basado en el bloqueo de IL23 por medio de su receptor soluble, expresado por vectores virales de terapia génica.

Sin embargo, en ese momento desconocíamos si el receptor soluble de IL23 ejercería el efecto antagónico deseado, disminuyendo o modulando la respuesta inmune, o por el contrario podría desempeñar un efecto agónico; como sucedía con el receptor soluble de la IL6, el cual tras unirse a IL6 amplificaba la respuesta inmune por un aumento del reclutamiento de leucocitos (Jones, 2005).

Administración de vectores virales en un modelo de enfermedad de Crohn

Inicialmente, fue necesario decidir en qué modelo animal de enfermedad autoinmune iban a ser probados los virus con el fin de analizar su potencial terapéutico. En este sentido, se optó por el modelo de colitis aguda inducido por administración oral de DSS, un modelo de Enfermedad de Crohn. Se tomó esta decisión en base a la experiencia de nuestro grupo trabajando con este modelo de enfermedad en un proyecto anterior.

Una vez decidido el modelo animal de colitis, fue necesario contar con un vector viral que tuviera un fuerte tropismo intestinal. Afortunadamente, nuestro grupo había desarrollado con anterioridad a esta tesis un vector quimérico llamado Ad5/40S, constituido por el genoma del Ad5 y las proteínas *fiber short* del Ad40. El Ad40 había sido descrito como un adenovirus del subgrupo F con un tropismo muy elevado por intestino, pero su producción *in vitro* era muy difícil. Por el contrario, el Ad5/40S se podía generar en el laboratorio, a la vez que conservaba el tropismo intestinal típico del Ad40 (Rodríguez et al., 2013). Por otra parte, siendo casi la totalidad del genoma procedente del Ad5 se evitaban problemas de bioseguridad, ya que el Ad5 se encuentra completamente caracterizado.

Así pues, el Ad5/40S era el vector idóneo para una estrategia de terapia génica intestinal. No obstante, pronto se advirtió que su baja productividad *in vitro* sería un problema en la obtención de títulos elevados, indispensables para la administración *in vivo*. El protocolo de producción de Ad5/40S utilizado hasta el momento, basado en células en adherencia, era largo y costoso, además de proporcionar unos títulos virales por célula muy bajos. Por consiguiente, paralelamente a la clonación de IL23R4, fue necesario desarrollar un protocolo optimizado de producción del vector quimera Ad5/40S.

Se optó por diseñar un protocolo de producción basado en células en suspensión por varios motivos. En primer lugar, la agitación de los cultivos en suspensión favorece la homogenización del medio, provocando un aumento de la infectividad del virus. En segundo lugar, la manipulación de grandes cantidades de células en suspensión (siembra, infección, *passages*, recogida,...) es más fácil y rápida que en células en adherencia. Y por último, y más importante, un protocolo basado en el uso de células en suspensión permite una escalabilidad viable, siendo posible su producción en bioreactores si fuera necesario en un futuro.

Desde un principio, asumimos que la baja productividad del virus *in vitro* en el protocolo clásico era debido a la baja infectividad de las partículas víricas en las células productoras. De este modo, nuestro principal objetivo fue incrementar la eficiencia de infección.

En primer lugar, establecimos que las células más apropiadas para la producción eran las células 211B. Estas células expresan constitutivamente el *fiber* del Ad5 (F5) en su citoplasma, de manera que cuando un virus Ad5/40S las infecta y se reproduce en su interior, las partículas víricas formadas incorporan las fibras F5 que se encuentran expresadas en el citoplasma (Von Seggern et al., 1998). Además, estas partículas también incorporan las proteínas *fiber short* del Ad40 (F40S) que se generan por la traducción de las proteínas virales. De esta manera, se originan partículas víricas “mosaico” que presentan ambos tipos de *fiber*. Por consiguiente, en las siguientes reinfecciones durante el proceso de amplificación del virus, las partículas entrarán de forma más eficiente en las células productoras a través de la interacción entre F5 y el receptor CAR. De hecho, estas células originalmente habían sido utilizadas para cambiar el tropismo *in vivo* de vectores carentes del F5 (Von Seggern et al., 2000).

No obstante, las células 211B crecían en adherencia, por lo que el primer objetivo que se estableció fue su adaptación a crecer en suspensión, por los motivos anteriormente mencionados. La línea celular adaptada a crecer en suspensión se llamó 211BS.

Posteriormente a su adaptación, se demostró que los viriones Ad5/40S producidos en células 211BS (llamados Ad5/40S mosaico) y portadores de F40S/F5 infectaban con más eficiencia las células 293F que los viriones producidos en 293F (Ad5/40S

portadores únicamente de F40S). Además de observar un porcentaje significativamente mayor de células infectadas, también se observó una mayor intensidad en la expresión del gen marcador GFP, indicando que cada célula había sido infectada por una cantidad mayor de virus. Por otro lado, también se realizó un análisis del ciclo viral de Ad5/40S mosaico, para conocer el momento óptimo de su recogida.

En segundo lugar, se utilizó el polybrene para ayudar a la infectividad del virus. El polybrene es un polímero catiónico utilizado en las producciones de vectores retrovirales y lentivirales (Davis et al., 2004; Kaplan et al., 1998; Wang et al., 2008). Su carga positiva hace que interaccione con las cargas negativas externas de la cápside del adenovirus, envolviéndola en una atmósfera positiva, y volviéndola más afín a la membrana celular, cargada negativamente (Arcasoy et al., 1997; Jacobsen et al., 2006). Sin embargo, F40S tiene un alto contenido en aminoácidos básicos, que causan una disminución del punto isoeléctrico en comparación con F5, provocando una disminución en la carga negativa neta del virión quimérico. Por este motivo, *a priori* desconocíamos si el uso de esta molécula catiónica tendría un efecto positivo en la infectividad. El consiguiente estudio reveló que las infecciones llevadas a cabo en presencia de polybrene eran significativamente más eficientes, tanto en células 293F como en células 211BS.

En conclusión, el uso de células 211BS en suspensión y polybrene durante las infecciones aumentó la infectividad de las partículas víricas, permitiendo el desarrollo de un protocolo de producción con el que se consiguió aumentar sustancialmente la producción de virus quimera en cada paso de amplificación. Ello permitió una reducción del número de pasos totales de amplificación, y consecuentemente, una disminución del tiempo total de producción del virus, de los materiales necesarios y lo más importante, una disminución del riesgo de formación de viriones competentes para la replicación, producidos por recombinación con las secuencias E1 de las células productoras.

Estos resultados fueron publicados en la revista PlosOne (*Resultados*, pg. 63), en un capítulo de libro (*Anexo*), y permitieron la elaboración de una patente (*Resultados*, pg. 75).

Los estudios de biotropismo con el vector Ad5/40S desarrollados con anterioridad a este trabajo (Rodríguez et al., 2013), demostraron la preferencia de este vector en la infección de células enteroendocrinas y macrófagos residentes. Sin embargo, la existencia de un vector capaz de infectar eficientemente células *stem cells* situadas en las criptas de Lieberkühn, contribuiría a una expresión del transgen más duradera, debido a la longevidad de estas células. E incluso los niveles de expresión podrían verse amplificados si el transgen fuese heredado por las células descendientes. Por este motivo, se realizó un estudio de biotropismo celular intestinal con diferentes vectores virales administrados intrarrectalmente.

Los resultados obtenidos mostraron que ninguno de los vectores utilizados era capaz de infectar eficientemente *stem cells* de las criptas de Lieberkühn. Ello concuerda con los datos disponibles en la bibliografía, donde se señala que, a pesar de la utilización de diferentes vectores virales y no virales, el tracto intestinal es un objetivo difícil para estrategias de terapia génica. Por un lado, la inmunidad preexistente en el tracto digestivo puede ser la causa de la neutralización de vectores virales y limitar la transferencia génica (Manno et al., 2006). Por otro lado, las barreras extracelulares de protección, como mucosidad, proteasas y pH gástrico ácido pueden reducir la estabilidad de los vectores administrados oralmente (Shao et al., 2006; Tang et al., 2006). Además, estudios *in vivo* e *in vitro* con retrovirus y vectores AAV han reportado una baja eficiencia de transducción en las células epiteliales intestinales (Lozier et al., 1997; Seppen et al., 2000; Shao et al., 2006; Tang et al., 2005), incluso con una administración intrarrectal en un modelo murino de colitis (Farlow et al., 2007). No obstante, aunque de forma muy ineficiente, se ha observado que el pseudotipo AAV2 permite la expresión persistente del transgen tanto en células epiteliales como en células de la lámina propia, lo que sugiere la transducción de pocas células progenitoras de la cripta (Polyak et al., 2008). Desafortunadamente, la estabilidad de los vectores de AAV2 se ve fuertemente reducida por el medio luminal del tracto gastrointestinal proximal (Shao et al., 2006). Por otra parte, tras una administración orofaríngea de adenovirus se observó expresión del transgen en células epiteliales de las vellosidades, pero no en las células de las criptas (Wu et al., 1999; Foreman et al., 1998). En contraste, la inyección directa en diversas regiones del intestino delgado y

grueso en ratas y conejos permitió una mayor eficiencia de transducción (Foreman et al., 1998). No obstante, en todos los casos, los enterocitos fueron los objetivos principales y la expresión del transgen fue similar independientemente del segmento intestinal donde se administró el adenovirus.

Volviendo al tema del desarrollo del vector, debido a que la optimización de la producción del vector quimera Ad5/40S llevó un tiempo, en paralelo se generaron vectores Ad5 y AAV9 portadores de IL23R1 e IL23R4 para así poder realizar pruebas de concepto en el modelo de colitis por DSS.

Desafortunadamente, los primeros experimentos con estos animales proporcionaron resultados difíciles de interpretar, pues no observábamos un patrón claro de respuesta al virus o al receptor de la IL23. En consecuencia, se decidió realizar un análisis del perfil de citoquinas presente en los animales DSS y los animales control. De este modo, se descubrió que el perfil de citoquinas que nuestros animales DSS presentaban no era un perfil típico de Th17.

Existe controversia en la bibliografía sobre este hecho, con estudios a favor y en contra del perfil molecular Th17 de los ratones DSS (Alex et al., 2009; Kim et al., 2011). Si bien éste es un gran modelo animal de colitis aguda desde el punto de vista histopatológico y fisiológico, nuestros ratones no presentaron el perfil de citoquinas típico de Th17. Teniendo en cuenta que la enfermedad de Crohn en humanos es Th17, carecía de relevancia trabajar con un modelo no representativo de lo que sucede en humanos. Además, el objetivo principal de este trabajo era demostrar una inmunomodulación de la respuesta Th17 por medio del bloqueo de IL23, por lo tanto era imprescindible para nuestros experimentos que los animales presentaran una respuesta Th17 clara, independientemente de la enfermedad estudiada. En otras palabras, el modelo de enfermedad no era tan importante, como que ésta fuera provocada por una respuesta Th17. Por este motivo, se decidió sustituir el modelo de colitis aguda por otro modelo animal.

Estrategias de terapia génica para Esclerosis Múltiple

Desde que se descubrió el papel de IL23 y su implicación en la autoinmunidad ha habido cuatro enfermedades autoinmunes que, por el hecho de compartir un rol patogénico central y una alteración del sistema inmune muy similar, han estado relacionadas: Psoriasis, Esclerosis Múltiple, Artritis Reumatoide y Enfermedad de Crohn. Comúnmente, las investigaciones en la patogenia de una de estas enfermedades suelen adaptarse a las otras, de manera que cuando se descubre un nuevo fármaco o agente potencialmente terapéutico para una de ellas, rápidamente se prueba también con las otras enfermedades, obteniendo a veces mejores resultados con unas que con otras. Un ejemplo claro es el caso de los fármacos inhibidores de TNF α , adalimumab (Humira®), etanercept (Enbrel®) y infliximab (Remicade®).

Así pues, se consideró continuar con un modelo animal de Psoriasis, de Artritis Reumatoide o de EM. Finalmente, nos decidimos por la EM en base a la experiencia de nuestro grupo trabajando con sistema nervioso (tanto central como periférico) y por el elevado impacto social de esta enfermedad. La EM es una enfermedad crónica desmielinizante que perjudica gravemente la calidad de vida de los afectados, imposibilitando en la mayoría de casos el desarrollo de una vida personal y laboral normal. Comúnmente, aparece con un curso remitente-recurrente donde los síntomas revierten parcialmente entre brotes, y posteriormente evoluciona hacia un curso crónico, con una progresión de la discapacidad sostenida. Además también presenta pérdidas cognitivas como problemas de memoria, dificultad para imaginar conceptos abstractos o dificultades en el habla, por poner solo algunos ejemplos (Brodkey et al., 2011).

Al impacto social que genera la EM debe sumarse el impacto económico y sanitario, dado que se trata de una enfermedad de larga duración que afecta principalmente a adultos jóvenes, y los cuidados multidisciplinarios requeridos por los pacientes y el coste en medicamentos son elevados.

Desafortunadamente, en la actualidad la EM no tiene cura. Los medicamentos actuales son eficaces frenando la evolución de la enfermedad hacia una fase progresiva y

controlando algunos de sus síntomas, pero a largo plazo ninguno logra evitar el transcurso de la EM.

A corto plazo, tras la aparición de un brote agudo, suele administrarse a los pacientes cortisona intravenosa. A largo plazo, los tratamientos más utilizados se basan en el uso de IFN- β (Rebif[®], Avonex[®] o Betaferon[®]), el uso de acetato de glatirámico (Copaxone[®]), mitoxantrona (Novantrone[®]) y Natalizumab. Estos fármacos logran reducir la frecuencia de los brotes con más o menos éxito, sin embargo, su eficacia es tan solo parcial y el efecto que éstos pueden tener en el pronóstico a largo plazo es aún desconocido. Además, presentan efectos secundarios preocupantes. A modo de ejemplo, Natalizumab es un anticuerpo monoclonal dirigido contra las α 4-integrinas que actúa impidiendo la migración leucocitaria a través de la barrera hematoencefálica. No obstante, presenta un riesgo potencial de inducir leucoencefalopatía multifocal progresiva (Landy et al., 2014; Toussirot et al., 2014). Por otro lado, la mitoxantrona deteriora el corazón, ocasionando trastornos cardíacos cuando su uso se prolonga (Ghalie et al., 2002; Pai et al., 2000).

Además de los fármacos más usados, existen una gran cantidad de tratamientos experimentales para EM y otras enfermedades autoinmunes que se encuentran en fase clínica. Según la página web ClinicalTrials.gov (U.S. National Institutes of Health), existen actualmente 371 ensayos clínicos para EM abiertos en todo el mundo. Muchos de ellos se centran en el uso de anticuerpos con potencial inmunomodulador. Sin embargo, estas estrategias basadas en el uso de anticuerpos derivan en efectos secundarios graves. Por ejemplo, Alemtuzumab, un anticuerpo contra CD52, genera un estado de linfopenia que provoca en el 20-30% de los pacientes autoinmunidad secundaria tiroidea, llamada enfermedad de Graves (Button et al., 2010).

Además, los fármacos basados en el uso de anticuerpos sugieren un tratamiento crónico y rutinario en los afectados por EM, aumentando de esta forma el coste económico-sanitario. En cambio, una terapia génica basada en vectores virales y la expresión de la molécula inmunosupresora desde el propio organismo evitaría la administración rutinaria del fármaco, disminuyendo así el coste social y económico. Por otra parte, en este trabajo también exponemos que una terapia que inhiba

específicamente IL23 manifestará una disminución considerable de los efectos secundarios.

Así pues, tras el cambio de modelo animal, fue necesario también cambiar el vector, pues el tropismo intestinal de Ad5/40S ya no era el idóneo para estos animales. De cualquier modo, poco después, la patente del vector Ad5/40S fue licenciada a una empresa farmacéutica, por lo que su uso en nuestros experimentos hubiera quedado restringido.

a) Estudios *in vitro*

Antes de proceder con los estudios *in vivo*, se realizaron estudios *in vitro* para analizar la capacidad de IL23R soluble de unirse e interactuar con IL23. De esta manera, gracias a la concesión de una beca para estancias breves en el extranjero, dentro del programa de becas FPU, realicé una estancia de dos meses en el laboratorio de la Dra. Brigitta Stockinger (Molecular Immunology Division, MRC National Institute for Medical Research, London), experta en el estudio de los mecanismos moleculares de la respuesta Th17. Nuestro primer objetivo fue evaluar la unión de IL23 a IL23R4, mediante un diseño basado en el marcaje intracelular de STAT3 fosforilado. Desafortunadamente, el marcaje intracelular es una técnica compleja, y a pesar de varios experimentos con diferentes tipos celulares humanos y murinos, no fuimos capaces de ponerla a punto, pues no observamos diferencias entre los controles positivos y negativos. Así pues, se cambió de estrategia y se estudió la interacción IL23-IL23R *in vitro* por otros mecanismos.

A todo esto, debido a que las citoquinas humanas podían no inducir una correcta señalización en células murinas y que el modelo animal que íbamos a utilizar era de ratón, decidimos generar nuevos vectores virales portadores de IL23R e IL23R soluble (IL23Rs) murinos. Para ello, fue necesario diseñar el gen IL23Rs de ratón, ya que contrariamente al humano, no se encontró en la bibliografía información sobre ningún *splicing* alternativo soluble natural. Por ello, se diseñó siguiendo los criterios descritos para el IL23R4 (receptor humano soluble) (Zhang et al., 2006). Así, se utilizaron los exones previos a la región transmembrana y posteriormente se le añadió una pequeña secuencia peptídica del extremo C-terminal del IL23R4, con la idea de que tuviera un

papel en la estabilidad o la conformación final de la proteína. Según la composición del IL23Rs diseñado y de acuerdo con los programas de predicción de proteínas, éste debía secretarse al exterior extracelular y unirse a IL23.

Se generaron vectores Ad5 y AAV9 portadores de IL23Rs e IL23R murinos, y se comprobó que el IL23Rs efectivamente era producido y secretado al medio extracelular de células infectadas por estos virus. Cabe mencionar que para la detección de IL23R e IL23Rs fue necesario añadir una secuencia 3xFlag-tag en el extremo 5' de los genes. Por otra parte, en las células infectadas se observó que IL23R se expresaba en membrana, mientras que IL23Rs se observaba difuso en el citoplasma y no se hallaba concentrado en la membrana celular, en concordancia con el comportamiento esperado para una proteína producida en el citoplasma y secretada al exterior.

En cuanto a los estudios de interacción IL23Rs-IL23, los intentos de coprecipitación proteica fueron ineficaces. Posiblemente, la interacción IL23Rs-IL23 fuera débil en estas condiciones de ensayo y la citoquina se perdiera en los lavados. Sin embargo, esta técnica nos proporcionó una forma rápida y eficiente de obtener IL23Rs purificado, hecho que permitió realizar otro tipo de ensayos, lo que finalmente condujo a la demostración de que IL23Rs e IL23 se unen *in vitro*.

Es importante mencionar que en octubre de 2010, durante el desarrollo de nuestros experimentos *in vitro*, Yu y Gallagher de Humigen, se adelantaron con la publicación de un artículo en el que demostraban que el IL23R soluble humano inhibía el desarrollo de células Th17 *in vitro* (Yu and Gallagher, 2010). Ésta es, hasta el momento, la única publicación en la que se demuestra el uso de IL23Rs como inhibidor de Th17. Sin embargo, este grupo no ha publicado resultados *in vivo*. Por tanto, somos el primer grupo en reportar un efecto positivo de IL23Rs *in vivo*, utilizando ratones EAE (Oral communication, SETGyC and ESGCT Collaborative Congress, Madrid, 2013). Curiosamente, Yu y Gallagher también manifestaron haber tenido problemas con la detección de IL23R, motivo que les llevó a la incorporación de una secuencia flag-tag. Desafortunadamente, éste ha sido un problema constante en el transcurso de la tesis, ya que en sus inicios no existían anticuerpos eficaces contra IL23 e IL23R.

b) Estudios *in vivo*

En primer lugar se realizó una aproximación terapéutica, administrando los vectores tras la inmunización de los animales. Ello provocó la muerte de los ratones en los primeros 2-3 minutos post-administración. Este efecto, observado tanto con Ad5 como con AAV9, fue probablemente debido a una respuesta inmune desmesurada frente a los vectores virales, ya que la inmunización de los animales para inducir la EAE conlleva una potente activación de la respuesta inmune innata y adquirida (Lassmann 2007). De hecho, este modelo animal es muy susceptible a algunos patógenos oportunistas, que pueden provocar incluso la muerte de los ratones. Tras sucesivas reducciones en la dosis de los vectores, se consiguió evitar este efecto. No obstante, debido seguramente a la baja dosis de vector utilizada, este experimento no reportó ningún efecto en el curso clínico de la EAE en los grupos tratados con los vectores terapéuticos respecto a los tratados con los vectores control. Posteriormente, se probó la administración del vector una vez inducida la enfermedad (día 15 post-inmunización), con el fin de comprobar si en este punto la hiperreactividad frente a los vectores virales era menor. Desafortunadamente, si bien el efecto fue más lento, los animales también murieron. Finalmente, la administración del vector viral a día 30 post-inmunización permitió la supervivencia de los animales tras una dosis elevada. Sin embargo, la observación de estos animales durante 3 semanas no reportó ninguna mejora en la clínica, debido posiblemente a que tras 30 días de evolución de la EAE el daño neurodegenerativo es muy elevado y difícil de revertir y que el papel de la IL23 parece ser más importante en la fase inflamatoria de la enfermedad y no en etapas posteriores de la misma (Croxford et al., 2012).

En consecuencia, en los siguientes experimentos se realizó la administración del vector viral previamente a la inducción de la enfermedad, proporcionando a las partículas víricas tiempo suficiente para ser eliminadas del torrente sanguíneo.

Se observó que en los ratones tratados con Ad5-IL23Rs intravenoso había un retraso en la aparición de los signos y que la gravedad de los mismos era significativamente menor. Esta diferencia era especialmente visible los primeros días de la enfermedad, ya que desafortunadamente, se perdía hacia el final del seguimiento clínico. Ésta es

una aproximación de tipo sistémica, pues el tropismo mayoritario de Ad5 administrado por la vía intravenosa es el hígado, desde el cuál expresa el transgen de interés.

El Ad5 se caracteriza por tener una expresión del transgen rápida y elevada, pero poco duradera (2-3 semanas) debido a la respuesta inmune (Dumasius et al., 2003; Eslami et al., 2000), por lo que la disminución del efecto beneficioso de la expresión de IL23Rs podría coincidir con la esperada disminución de la expresión del transgen por parte del adenovirus.

Aún así, estos experimentos sirvieron como prueba de concepto para considerar la IL23 como una posible diana terapéutica en la EAE. Sin embargo, era necesario encontrar el vector y la estrategia apropiada para que este efecto terapéutico fuese más potente y duradero. Por consiguiente, nos centramos en los vectores AAV, pues proporcionan una expresión del transgen mucho más duradera que los vectores adenovirales (Chirmule et al., 2000).

La primera aproximación con AAV9-CMV-IL23Rs administrado directamente en cerebro, ofrecía un abordaje terapéutico localizado. No obstante, este experimento no reportó ninguna mejora en los ratones tratados. Con los resultados disponibles no podemos llegar a una conclusión, ya que podría tratarse de un problema de insuficiencia de dosis o que la administración local no fuera suficientemente efectiva. En futuros experimentos se valorará retomar esta vía de ensayo con el objetivo de realizar una aproximación lo más localizada posible.

Tras este resultado, y teniendo en cuenta los buenos resultados obtenidos con la aproximación sistémica del Ad5, se determinó administrar el vector adenoasociado utilizando también la vía intravenosa.

La administración intravenosa de AAV9-CMV-IL23Rs no reportó diferencias estadísticamente significativas entre el grupo tratado y el control, aunque pudo observarse una tendencia a la significación estadística en uno de los dos experimentos. Por otra parte, los estudios de proliferación celular antígeno-específica revelaron diferencias significativas entre el grupo tratado con AAV9-CMV-IL23Rs y su control, mostrando que el índice de estimulación de células T reactivas a MOG era

significativamente menor en el grupo tratado, por lo que la expresión del transgen tenía un efecto protector a nivel celular.

Dado que los vectores AAV tienen una cinética más lenta que los adenovirus, alcanzando los niveles máximos de expresión del transgen 2-3 semanas después de la administración en ratón (Miao et al., 1998; Xiao et al., 1998), se decidió realizar la administración de vectores adenoasociados 3 semanas antes de la inmunización. También se optó por cambiar el promotor CMV por un CAG, pues la bibliografía al respecto sugiere que este promotor es más eficiente para la expresión proteica con vectores adenoasociados *in vivo* (Halbert et al., 2007; Nitta et al., 2005).

Además, teniendo en cuenta que el vector Ad5, que infecta muy eficientemente hígado, había reportado mejores resultados, se decidió cambiar el AAV9 por un AAV8, debido al fuerte tropismo por hígado que tiene este pseudotipo (Sands 2011). De esta manera, podrían emularse los resultados conseguidos con el Ad5, aunque esperando que la expresión más duradera del transgen reflejase una mejora más duradera de los síntomas clínicos de la EAE.

La administración de AAV8-CAG-IL23Rs de forma intravenosa reportó una gran mejora clínica en el grupo tratado. Si bien fue necesario aumentar la dosis inicial para poder observar este efecto, finalmente, la expresión de IL23Rs logró disminuir de forma significativa la gravedad de la enfermedad de forma sostenida hasta el final del experimento. También se observó un retraso en la aparición de los primeros síntomas clínicos de la enfermedad y una menor mortalidad en el grupo tratado. Por otra parte, la variación de peso corporal concordaba con el efecto clínico, pues la EAE generalmente se correlaciona con la pérdida de peso (Schattling et al., 2012), y ésta fue menor en los ratones tratados que en el grupo no tratado.

No obstante, en contraste con los resultados obtenidos con AAV9-CMV-IL23Rs, este abordaje terapéutico no disminuyó la respuesta proliferativa de los esplenocitos frente a MOG₄₀₋₅₅, por lo que el efecto clínico observado no se debió a una disminución de la respuesta proliferativa antígeno-específica. Por otra parte, en el sobrenadante del cultivo de los esplenocitos de los ratones tratados con AAV8-CAG-IL23Rs se halló una concentración significativamente mayor de IFN γ respecto a los tratados con el vector

control. Ello contrasta con la observación de que en pacientes con EM la administración de IFN γ resulta en una exacerbación de la enfermedad (Panitch et al., 1987b), mientras que los ensayos clínicos con anticuerpos neutralizantes específicos para IFN γ administrados en pacientes con EM demuestran un beneficio terapéutico (Skurkovich et al., 2001). Sin embargo, los niveles elevados de IFN γ que observamos en los ratones tratados con AAV8-CAG-IL23Rs concuerdan con los niveles descritos por otros autores que demuestran que el aumento de IFN γ se relaciona con un mejor pronóstico clínico de la EAE en ratones. De hecho, el IFN γ se ha descrito como un potente regulador negativo para las respuestas inmunes mediadas por IL23/IL17, demostrando que inhibe fuertemente el desarrollo de células Th17 (Harrington et al., 2005; Park et al., 2005). Paradójicamente, aunque la transferencia de células Th1 antígeno-específicas productoras de IFN γ puede inducir la EAE (Domingues et al., 2010), se ha observado que la administración de anticuerpos anti-IFN γ provoca una exacerbación de la EAE en ratones (Billiau et al., 1988; Heremans et al., 1996; Lublin et al., 1993). Este efecto también sucede en ratones deficientes para IFN γ o su receptor, donde se observa una EAE más severa (Ferber et al., 1996; Willenborg et al., 1996). Además, la administración de IFN γ exógeno en ratones genera un efecto protector para la EAE (Billiau et al., 1988; Heremans et al., 1996). Como es sabido los diferentes tipos de células Th se inhiben mutuamente, de manera que Th1 (mediante IFN γ) inhibe el desarrollo de respuestas de tipo Th2 y Th17. De la misma manera que la respuesta Th2, mediante IL10 e IL4, inhibe la proliferación de células Th1 y Th17 y, a su vez, la Th17 inhibe las respuestas Th1 y Th2 (Bettelli et al., 2007; Gajewski et al., 1989; Ivanov et al., 2007). En conclusión, la evidente mejora clínica de los ratones tratados con IL23Rs concuerda con el aumento significativo de la concentración de IFN γ . No obstante, este aumento de IFN γ debería ir acompañado de una disminución significativa en la concentración de citoquinas proinflamatorias típicas de Th17. Sin embargo, nuestros resultados no sugieren esta disminución del perfil de Th17, pues no se observaron diferencias significativas en la concentración de citoquinas como IL22 o IL17A entre los ratones tratados y el control. Incluso se observó un ligero aumento de GM-CSF en los ratones tratados con IL23Rs. Tampoco se observaron cambios en el patrón de citoquinas reguladoras como la IL10 o antiinflamatorias como la IL4.

Por otra parte, los datos histopatológicos obtenidos estuvieron en concordancia con la mejora clínica observada. Así, se observó una reducción del componente inflamatorio en la médula espinal de ratones tratados con IL23Rs, además de no hallarse evidencias de desmielinización. Al mismo tiempo, tanto la respuesta astrocitaria como la activación de la microglía fueron significativamente menores en los animales tratados. De hecho, el grupo IL23Rs presentaba unos niveles de activación de microglía y astroglia similares a los del grupo inmunizado con suero fisiológico y que no habían desarrollado la enfermedad; mientras que los animales tratados con el vector *null* tenían unos niveles similares al grupo de ratones enfermos no tratados. Así pues, podemos concluir que la sola presencia del virus y los mecanismos de respuesta inmunológica que desencadena no perturbaron el transcurso de la enfermedad ni su afectación histopatológica, por lo que la mejora observada en los ratones AAV8-CAG-IL23Rs fue debida a la expresión de IL23Rs.

Consideraciones finales

Los resultados *in vivo* mostrados en este trabajo corresponden a un abordaje preventivo, pues la administración del vector se da antes de la inducción de la enfermedad, originando un efecto protector. Sin embargo, como ya se ha comentado, nuestro objetivo inicial consistía en una aproximación de índole curativa, administrando el vector después de la inducción de la enfermedad. Esta primera aproximación resultó difícil de realizar debido a dificultades técnicas asociadas a este modelo de enfermedad, más concretamente, a su hiperreactividad inmune, pues los ratones morían tras la administración del vector viral. No obstante, estos resultados han sido una prueba de concepto positiva que ha reportado que la expresión de IL23Rs por los vectores de terapia génica diseñados en este trabajo genera un efecto protector en el desarrollo y evolución de la sintomatología clínica de la enfermedad, además de proporcionar un perfil histopatológico acorde con la mejoría clínica. Con los resultados obtenidos en el análisis del perfil de citoquinas no podemos esclarecer el mecanismo de acción de esta terapia, aunque ello será extensamente estudiado en futuros experimentos.

Una manera de conseguir una estrategia de tipo curativo en ratones EAE sería, en primer lugar, generar un vector AAV con el gen IL23Rs asociado a un promotor inducible. De esta manera, el vector podría administrarse en los ratones antes de la inmunización y la expresión de IL23Rs podría inducirse una vez aparecidos los síntomas clínicos o en su establecimiento. Por otra parte, también es posible cambiar el modelo animal, pues la hiperreactividad asociada a los ratones con EAE, no tiene porqué estar presente en otros modelos de enfermedad autoinmune, permitiendo la administración de los vectores después de la aparición de la enfermedad.

En segundo lugar, en cuanto a la EM, podrían considerarse diferentes estrategias utilizando diferentes vectores, en función del momento y del curso de la enfermedad. En la mayoría de los casos, la EM se caracteriza en sus etapas iniciales por tener brotes, intercalados por fases de remisión. Tras la aparición de los primeros síntomas que indican el inicio de un brote se podría optar por una terapia basada en Ad5, pues la expresión de IL23Rs sería rápida y aguda. En cambio, en fases de remisión de la enfermedad podría optarse por un vector AAV, proporcionando una expresión de IL23Rs basal y duradera, con el fin de prevenir el siguiente brote.

Por otro lado, en estos experimentos se ha utilizado el hígado como fuente de producción, ya sea por la infección con Ad5, como la infección con AAV8. Sin embargo, pueden considerarse otras estrategias, como por ejemplo, terapia celular *ex vivo* con el uso de Ad5/40S portador de IL23Rs. Al inicio de la tesis, se dedicó mucho tiempo a conseguir una producción óptima de este vector, no obstante, un cambio en el modelo animal y la licencia de la patente a la empresa Nanotherapix S.L., indujo un cambio en nuestro diseño experimental. Aunque en un principio Ad5/40S fue escogido por su tropismo intestinal, más adelante se descubrió que Ad5/40S infecta monocitos muy eficientemente. De esta manera, podría considerarse una estrategia consistente en la extracción de monocitos de un paciente, seguido de su infección por Ad5/40S-IL23Rs, para finalmente volver a reincorporarse al paciente. Esta terapia generaría una serie de ventajas. Primeramente, al tratarse de una terapia *ex vivo* habrían menos problemas de bioseguridad, pues los virus que no hubieran infectado las células serían eliminados del medio antes de ser reincorporadas en el paciente. En segundo lugar, se trataría de una terapia dirigida al paciente, pues se utilizarían sus propias células. Y por último, los

monocitos productores de IL23Rs irían directamente al lugar de inflamación, donde podrían actuar de forma más localizada.

En consistencia con la infección de monocitos observada con el vector Ad5/40S, nuestros resultados indicaron que este vector también infecta linfocitos T CD4+ murinos purificados de manera muy eficiente. Estos datos en conjunto apoyan firmemente la idea de que el Ad5/40S es un vector a tener en cuenta no solo en terapias intestinales, sino también en abordajes terapéuticos que requieran de la infección de células del sistema inmune como monocitos o linfocitos.

El objetivo de las terapias modificadoras de la EM es reducir o inhibir la respuesta inflamatoria. Sin embargo, la evidencia disponible sugiere que enfermedades complejas y multifactoriales como la EM precisarían de una terapia inmunomoduladora combinada con fármacos que actúen sobre los aspectos más importantes de la enfermedad, como la pérdida de mielina, bien conteniendo la desmielinización o activando la remielinización, para así recuperar la actividad motora además de prevenir nuevas lesiones.

Como es natural, la principal preocupación que una terapia experimental genera es la aparición de efectos secundarios graves. Desafortunadamente, los tratamientos experimentales existentes actualmente para la EM despiertan desconfianza por los efectos adversos que pueden generar. Se ha comentado anteriormente el caso de natalizumab, un anticuerpo monoclonal que inhibe la migración leucocitaria a través de la barrera hematoencefálica. En 2005, unos meses después de la autorización de su uso, fue retirado del mercado por la detección de dos casos de leucoencefalopatía multifocal progresiva (LMP) (Langer-Gould et al., 2005; Kleinschmidt-DeMasters et al., 2005), una enfermedad para la que no existe un tratamiento eficaz y que tiene una supervivencia media de 6 meses. Posteriormente, el fármaco volvió a comercializarse al observar que esta complicación secundaria era poco frecuente. Aún así, se han reportado más de 200 casos de LMP en pacientes tratados con natalizumab (aproximadamente 1-11/1000 casos, dependiendo de otros factores de riesgo y el tiempo de exposición al fármaco) (FDA. Drug Safety Communication). Por lo que su uso está sujeto a un seguimiento exhaustivo del paciente con el fin de detectar cuanto

antes una posible LMP, con la consiguiente interrupción del tratamiento con natalizumab. No obstante, la interrupción del tratamiento se asocia a un síndrome inflamatorio de reconstitución inmune (IRIS), que puede causar un empeoramiento del estado del paciente (Langer-Gould et al., 2005; Wenning et al., 2009).

Por otro lado, la mayoría de las nuevas terapias experimentales inmunomoduladoras se basan en el uso de anticuerpos monoclonales o en el uso de citoquinas efectoras (ClinicalTrials.gov). La administración repetida de proteínas recombinantes puede inducir a la formación de anticuerpos neutralizantes con la consiguiente pérdida de eficacia de estos medicamentos, como sucede con la administración de IFN β en pacientes (Vartanian et al., 2004). Desconocemos si la expresión de IL23Rs por vectores virales generará anticuerpos específicos contra este transgen, reduciendo su eficacia. Posiblemente, como pasa en los otros fármacos, cuánto más elevada sea la dosis de IL23Rs y más duradera en el tiempo, más probabilidades habrá de una reacción de saturación. Por este motivo, es importante centrarse en desarrollar un abordaje terapéutico localizado, bien con el uso de vectores con tropismo específico para SNC para un tratamiento puntual, bien con una estrategia *ex vivo* basada en la infección de monocitos por Ad5/40S; o bien con el uso de AAV con promotores inducibles que permitan la expresión de IL23Rs en el momento necesario, prescindiendo de una expresión basal o constitutiva.

No se conocen estudios a largo plazo que expongan los problemas que pueden desarrollarse debido al bloqueo de IL23. Los resultados más estudiados son los obtenidos con el fármaco ustekinumab, no obstante, estos no son concluyentes dado que además de inhibir IL23 también inhibe IL12 y por consiguiente Th1. El principal problema del uso de ustekinumab es el incremento en el riesgo de infecciones y desarrollo de tumores. Sin embargo, por lo que respecta al aumento de infecciones, según el grupo del Dr. Cua estos efectos adversos estarían vinculados a la inhibición de Th1, más que de Th17 (Chen et al., 2006). Estos autores también evalúan las diferencias entre una terapia anti-p40 (ustekinumab) y una terapia anti-p19, llegando a la conclusión de que el efecto protector de ambas terapias sobre el desarrollo de EAE es el mismo, y por tanto, que las consecuencias adversas del uso de la terapia anti-p40, afectando un amplio rango de respuestas inmunes, es completamente innecesario.

Mientras la inhibición de IL12 provocaría un aumento de susceptibilidad a infecciones como *Toxoplasma*, *Mycobacterium*, *Listeria* y *Leishmania*; la inhibición de IL23 presentaría un incremento del riesgo de contraer una infección por *Klebsiella pneumoniae* (Khader et al., 2005; Lieberman et al., 2004). Las hipótesis actuales sostienen que IL23, induciendo la expresión de IL17 y GM-CSF, es importante en el mantenimiento de la homeostasis de los neutrófilos, exactamente en el reclutamiento e infiltración de éstos hacia los lugares de infección, de ahí la susceptibilidad a infecciones de *Klebsiella* en ratones deficientes en IL23 (Happel et al., 2003).

Respecto al incremento del riesgo de desarrollo de tumores tras el tratamiento con ustekinumab, se ha demostrado que IL12 es una citoquina que promueve intensamente la vigilancia inmune y las respuestas anti-cancerígenas mediante la inducción de la proliferación y la actividad citotóxica de las células *natural killer* y las células T CD8+ (Trinchieri, 2003). Por el contrario, IL23, IL17 y GM-CSF están estrechamente relacionadas con el crecimiento tumoral y la angiogénesis de los procesos cancerosos (Mueller et al., 1999; Numasaki et al., 2003). Por este motivo, la inhibición de IL12 por ustekinumab aumenta el riesgo de aparición de tumores, mientras que la inhibición de IL23 debiera tener el efecto contrario.

Un estudio publicado por la revista Nature (Langowski et al., 2006) esclarece definitivamente la diferencia entre IL12 e IL23 con respecto a la vigilancia inmunológica y la aparición de tumores. En este trabajo se observó que los ratones deficientes en IL12 mostraban un rápido desarrollo de tumores, mientras que los ratones deficientes en IL23 y los ratones deficientes en IL23 e IL12 eran resistentes a su aparición, poniendo en relieve el papel fundamental de la IL23 en el desarrollo de tumores. Además, realizaron un estudio donde se administró sistémicamente anticuerpos anti-p19, inhibiendo específicamente la IL23, lo que reportó un aumento de la vigilancia inmune contra tumores, una disminución del crecimiento tumoral y un incremento en el rechazo a células cancerígenas. Así pues concluyeron que el bloqueo de IL23 favorece la disminución de numerosos factores inflamatorios y tipos celulares esenciales para la promoción de células cancerígenas, y que una terapia anti-IL23p19 puede resultar eficaz para el tratamiento de tumores.

En definitiva, el uso de vectores portadores de IL23Rs como terapia génica para el tratamiento de EM puede suponer un avance en el panorama actual donde la mayoría de ensayos clínicos contemplan el uso de anticuerpos o proteínas recombinantes. Por otra parte, sería interesante probar la efectividad de esta estrategia en otras enfermedades con una patogenia autoinmune similar como enfermedad de Crohn, psoriasis o artritis reumatoide, o incluso en modelos animales para cáncer. Además la especificidad del sistema hacia Th17 favorece la disminución de efectos secundarios innecesarios. No obstante, sería adecuado alcanzar una aproximación terapéutica que permita una expresión regulada de IL23Rs para evitar una sobreexposición de este factor.



V. Conclusiones

1. Se ha diseñado, generado y clonado el IL23Rs murino.
2. Se han generado los constructos plasmídicos necesarios para la producción de vectores virales adenovirales y adenoasociados portadores del los genes IL23R e IL23Rs. Posteriormente estos vectores han sido amplificados y purificados.
3. Se ha adaptado la línea celular 211B a crecer en suspensión, denominándola 211BS. Se ha demostrado que tanto el uso de 211Bs como célula productora, como polybrene durante las infecciones, aumenta la infectividad y consecuentemente la eficiencia de producción de Ad5/40S.
4. Se ha optimizado la producción del vector quimera Ad5/40S mediante la combinación de células 211BS y polybrene. Con este protocolo optimizado se consigue un título mayor de virus, se reduce significativamente el tiempo de producción y el uso de fungibles, y se disminuyen los pasos de amplificación, reduciendo así el riesgo de producción de partículas competentes por recombinación con las secuencias E1 de las células productoras.
5. La eficiencia de transducción *in vitro* de los cultivos de células T CD4+ purificadas de ratón es mayor con el virus Ad5/40S que con el Ad5. Los diferentes pseudotipos de AAV (AAV2, AAV5, AAV8 y AAV9) probados no reportaron transducción en estas células.
6. La administración de los vectores virales AAV1, AAV2, AAV4, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, Ad5 y CAV por la vía intrarrectal no permite transducir eficientemente células madre del epitelio intestinal murino.
7. El IL23Rs diseñado es producido correctamente y tiene una localización citoplasmática en lugar de transmembranal como la de la forma natural de IL23R. El IL23Rs se procesa correctamente y se secreta al exterior celular.

8. Los experimentos *in vitro* revelan también que el IL23Rs secretado es capaz de unirse a IL23.
9. En el modelo de EAE, la aproximación terapéutica basada en la administración post-inmunización de vectores virales no es posible debido a la hiperreactividad del sistema inmune.
10. El tratamiento preventivo con vectores virales portadores de IL23Rs en el modelo de EAE tiene un efecto beneficioso en la evolución clínica de la enfermedad. Así, con la administración de una dosis elevada (5×10^{11} vg/ratón) de AAV8-CAG-IL23Rs se observa un retraso en la aparición de los primeros síntomas y una reducción estadísticamente significativa de la gravedad clínica de la EAE.
11. Los ratones tratados con AAV8-CAG-IL23Rs muestran una reducción del componente inflamatorio en la médula espinal, además de no hallarse evidencias de desmielinización.
12. La expresión de IL23Rs en el modelo EAE reduce significativamente la respuesta astrocitaria y la activación microglial en la médula espinal, con valores similares a los animales inmunizados con suero fisiológico.
13. Los ratones tratados no muestran una reducción en la respuesta proliferativa de esplenocitos frente al antígeno MOG₄₀₋₅₅.
14. La expresión elevada de IFN γ por parte de los esplenocitos antígeno específicos hace pensar que el aumento de su producción podría estar implicado en la mejora clínica observada. Por otra parte, no se han encontrado niveles alterados en la concentración de las citoquinas analizadas que están involucradas en la vía Th17.



VI. Materiales y Métodos

1. MATERIALES

1.1. Vectores plasmídicos

Los plásmidos de partida a partir de los cuales se generaron los plásmidos de este trabajo son: pTG6600 (Transgene), pKP1.4, pKP1.4 Δ CMV, pXX6 (Xiao et al., 1998) pRep2Cap1, pRep2Cap2, pRep2Cap4, pRep2Cap6, pRep2Cap7, pRep2Cap8, pRep2Cap9, pRep2Cap10, pGV, pAAVCAG-PLK-WPRE, pAAVCAG-PLK-GFP-WPRE (generado en nuestro laboratorio), pEBG-2t. Los plásmidos generados a partir de éstos se muestran en la tabla del *Anexo*.

1.2. Vectores virales

En esta tesis se han utilizado vectores virales Ad5, Ad5/40S y diferentes pseudotipos de AAV. La lista de vectores generados y producidos en este trabajo se detallan en el *Anexo*.

1.3. Cultivos *in vitro*

- **HEK-293:** *Human Embryonic Kidney cells 293*. Línea celular inmortalizada de células humanas embrionarias de riñón. Tienen incorporada la región E1 (*early 1*) del adenovirus, necesaria para la producción de estos vectores virales.
- **HEK-293QB** (Q-BIOgene): Clon de HEK-293 utilizado para la producción de Ad5, para estudios de expresión proteica y estudios de distribución celular.
- **HEK-293AAV:** Clon de HEK-293 utilizado para la producción de los vectores AAV.
- **293F:** Clon de HEK-293. Línea celular que crece en suspensión. Utilizada para la producción de Ad5/40S.
- **211B:** Clon de HEK-293 que expresa constitutivamente el *fiber* del Ad5 (Von Seggern et al., 1998). Utilizada para la producción de Ad5/40S.
- **211BS:** Línea celular estable adaptada en este trabajo a crecer en suspensión a partir de 211B. Utilizada para la producción de Ad5/40S.

- **Jurkat:** Línea celular inmortalizada de linfocitos T humanos. Utilizada para estudios de expresión proteica.
- **Cultivos primarios:** se realizaron cultivos primarios de esplenocitos de ratón y de linfocitos T CD4+ purificados.

1.4. Animales

Para el modelo de colitis inducida por DSS se utilizaron ratones C57BL/6J de 5-6 meses. Los experimentos se llevaron a cabo en el *Servei d'Estabulari de la Universitat Autònoma de Barcelona* y se realizaron con la aprobación del comité de ética y experimentación animal y humana de la UAB. Los animales fueron estabulados con ciclos de luz-oscuridad de 12 horas y con temperatura controlada.

Para el modelo de EAE se utilizaron ratones C57BL/6J de 8-11 semanas. Los experimentos se llevaron a cabo en el estabulario del *Institut de Recerca de l'Hospital Universitari Vall d'Hebrón*, y se realizaron con la aprobación del comité ético de experimentación animal de dicho instituto. Los animales fueron estabulados con ciclos de luz-oscuridad de 12 horas y con temperatura controlada.

2. MÉTODOS

2.1. Obtención y análisis de DNA

2.1.1. Minipreparaciones de DNA plasmídico por lisis alcalina

Técnica utilizada para la obtención de DNA plasmídico mediante lisis alcalina de un precultivo de bacterias y posterior precipitación con isopropanol. El DNA se obtiene en bajas cantidades (5-15 µg) y de poca pureza, pero es suficiente para su amplificación por PCR o digestión con enzimas de restricción. Para su extracción se parte de 3ml de medio de cultivo (suplementado con el antibiótico de selección) inoculado previamente con colonias aisladas crecidas en placa de LB-agar.

Reactivos: Solución I de resuspensión (4°C): 50mM Tris-HCl (Sigma) pH=8,0, 10mM EDTA (USB), 100µg/ml RNAsa (Sigma). Solución II de lisis: 200mM NaOH (Panreac), 1% SDS (p/v)(USB). Solución III de precipitación proteica (4°C): 3M acetato potásico, pH=5,5 (Panreac). Isopropanol y etanol absoluto (Panreac).

Procedimiento: Se centrifuga 1,5ml de cultivo en un Eppendorf durante 1 minuto a 12.000g. Se descarta el sobrenadante y se resuspende el precipitado con 200µl de Solución I de resuspensión. A continuación, se añade 400µl de Solución II de lisis, se mezcla suavemente invirtiendo el tubo varias veces y se deja incubar 5 minutos a temperatura ambiente. Se añade 400µl de Solución III de precipitación proteica y se agita hasta homogeneizar. Se incuba 10 minutos en hielo. Se centrifuga 10 minutos a 12.000g y se recupera el sobrenadante traspasándolo a otro tubo. Se añade 0,6 volúmenes de isopropanol y se deja reposar 10 minutos a temperatura ambiente. Se centrifuga 10 minutos a 12.000g y se descarta el sobrenadante. Se lava con etanol 70% y se centrifuga otros 10 minutos a 12.000g. Se descarta el sobrenadante y se deja secar el precipitado. Finalmente se resuspende en 30µl de agua MilliQ.

2.1.2. Maxipreparaciones de DNA plasmídico

Esta técnica nos permite obtener DNA plasmídico en cantidades elevadas (250-1000µg) y de gran pureza, imprescindible para la transfección en líneas celulares de

mamífero. Se ha utilizado el kit comercial E.Z.N.A.TM Fastfilter (Omega Bio-Tek) o el kit comercial Phoenix Maxiprep Kit (Q-BIOgene) siguiendo en ambos casos el protocolo facilitado por el fabricante.

Procedimiento: La extracción de DNA plasmídico se lleva a cabo a partir de un gran volumen de cultivo bacteriano (200ml) y se realiza por medio de lisis alcalina y posterior precipitación con acetato potásico. Seguidamente, el DNA se purifica por cromatografía de intercambio iónico en columna y se precipita con isopropanol. Finalmente, se resuspende con agua MilliQ.

2.1.3. Preparación de bacterias quimiocompetentes

Para que un plásmido pueda replicarse debe insertarse dentro de células bacterianas mediante el proceso llamado transformación. Estas células bacterianas deben adquirir previamente la habilidad de transformar el DNA. Para ello se utilizan células quimiocompetentes TOP10 (Invitrogen).

Reactivos: TFB1: 10mM RbCl (Fluka), 50mM MgCl₂ (Sigma), 30mM acetato potásico (Panreac), 10mM CaCl₂ (Sigma), 15% glicerol (v/v) (Panreac); pH=5,8 (HCl). TFB2: 10mM MOPS (Fluka), 10mM RbCl (Fluka), 75mM CaCl₂ (Sigma), 15% glicerol (v/v) (Panreac); pH=6,8 (HCl). Tras su preparación las dos soluciones se esterilizan mediante filtros de jeringa 0,22µm (Millex).

Procedimiento: Se crece o/n un pre-inoculo de 3ml de LB a partir de una alícuota de 5µl de bacterias de preparaciones anteriores. Al día siguiente, se utiliza para inocular 200ml de LB y se incuba a 37°C en agitación (incubador orbital), hasta que el cultivo alcanza una densidad óptica (DO₆₀₀) de 0,5, correspondiente a la fase exponencial de crecimiento. A continuación, se deja enfriar el cultivo en hielo durante 5 minutos y se reparte en Falcons de 50ml. Se centrifuga 5 minutos a 4.000g a 4°C y se descarta el sobrenadante por decantación. Es importante mantener siempre las bacterias en hielo. A continuación, se resuspende el *pellet* en 30ml de TFB1 por cada 100ml de cultivo centrifugado y se incuba en hielo durante 90 minutos. Seguidamente, se centrifuga durante 5 minutos a 4.000g a 4°C, se descarta el sobrenadante y se resuspende el *pellet* celular con 4ml de TFB2 por cada 100ml de cultivo original

centrifugado. Por último, se preparan alícuotas de 100µl en tubos *Eppendorf* previamente enfriados a -80°C y se almacenan a -80°C.

2.1.4. Transformación bacteriana por choque térmico

Reactivos: Placas de Petri (Nunc) de LB-agar con ampicilina: Luria Broth (Miller's LB Broth), agar (Panreac), ampicilina 100µg/ml (USB). Medio de crecimiento LB líquido.

Procedimiento: Se descongelan los viales de células quimiocompetentes durante 10 minutos en hielo y se añade 5-10µl del plásmido (procedente de una miniprep o de una reacción de ligación). Se incuba en hielo 30 minutos y a continuación se realiza el choque térmico, consistente en mantener los viales durante 90 segundos en el baño a 42°C e inmediatamente ponerlos en hielo durante 2 minutos. Se añaden entonces 200µl de LB sin antibiótico y se incuba 1 hora a 37°C en agitación (incubador orbital). De esta manera las células podrán recuperarse y expresar la resistencia al antibiótico. Finalmente, se siembran las células en placas de Petri LB-agar con ampicilina y se incuban o/n en la estufa a 37°C.

2.1.5. Electroforesis de DNA en gel de agarosa

Para separar fragmentos de DNA de diferente tamaño se utilizó la técnica de la electroforesis. El DNA cargado negativamente se somete a un campo eléctrico y migra a través de la matriz en dirección al ánodo de manera proporcional a su tamaño. El porcentaje de agarosa puede variar (1-2%) dependiendo de los fragmentos a aislar.

Reactivos: Agarosa (p/v) (Amresco). Tampón de electroforesis TAE 1X: 40mM tris-acetato, pH=8,0; 0,1mM EDTA. Tampón de carga 10X: 50% glicerol (v/v) (Panreac), 100mM EDTA pH=8,0 (USB), 1%SDS (p/v) (USB), 0,1% Azul de Bromofenol (p/v) (Sigma), 0,1% Xileno cianol (p/v). GeneRuler 1Kb DNA Ladder (Fermentas), Bromuro de Etidio (Invitrogen).

Procedimiento: Para la preparación del gel se funde la agarosa con el porcentaje deseado (p/v) en tampón TAE (1x), y se vierte en un portageles, colocando un peine adecuado para realizar los pozos. Tras su polimerización, se retira el peine y se añade TAE (1x) hasta cubrir el gel. A continuación, se cargan las muestras de DNA en los

pozos juntamente con tampón de carga y se aplica una corriente de 60-110V el tiempo necesario para la separación de los fragmentos de DNA. Se sumerge el gel en una solución de Bromuro de Etidio (6µg/ml en TAE) durante 15 minutos y finalmente se visualiza mediante luz UV en un transiluminador (Syngene).

2.1.6. Purificación de fragmentos de DNA

La purificación de bandas de DNA de geles de electroforesis se llevó a cabo con el kit comercial GENE CLEAN Turbo Kit de Q-BIOgene (Ref. 1102#400) siguiendo el protocolo del fabricante.

2.1.7. Cuantificación del DNA

La cuantificación del DNA procedente de minipreparaciones, maxipreparaciones, etc. se realizó mediante lectura en NanoDrop (NanoDrop Technologies, Inc. Wilmington, DE, USA) a una longitud de onda (λ) de 260nm (OD 260/280). Este sistema permite determinar la concentración de DNA y su pureza con volúmenes de muestra muy pequeños (1-2µl).

2.1.8. Digestión mediante enzimas de restricción

Las endonucleasas de restricción son enzimas que actúan reconociendo secuencias cortas y específicas de nucleótidos, rompiendo la cadena en lugares concretos. Para la digestión se utilizan entre 4 y 10 U de enzimas por 1µg de DNA. La temperatura y los tampones necesarios son establecidos por el fabricante. El tiempo de digestión varía desde una hora a o/n dependiendo de la cantidad de enzima utilizada y del propio enzima. Los enzimas de restricción utilizados en éste trabajo son de Fermentas y New England Biolabs.

2.1.9. Clonación

El objetivo de ésta técnica es unir dos segmentos de DNA plasmídico para formar una única molécula de DNA con autonomía para replicarse en una bacteria. Las construcciones utilizadas en este trabajo se han obtenido mediante clonación por ligación y clonación por recombinación.

2.1.9.1. Clonación por ligación

Procedimiento: Se obtiene el vector y el inserto de sus respectivos plásmidos mediante digestión con enzimas de restricción (New England Biolabs, Fermentas) generando extremos compatibles. Seguidamente, se separan los fragmentos de DNA mediante electroforesis en gel de agarosa, se purifican las bandas de interés mediante GeneClean y se cuantifican con el NanoDrop. Para evitar una posible religación, se desfosforilan los extremos del inserto mediante la fosfatasa FastAP (thermosensitive alkaline phosphatase, Fermentas).

Para la reacción de ligación se utiliza la T4DNA ligasa (New England Biolabs). Habitualmente se utilizan 50ng del vector por reacción de ligación. Con el fin de calcular la cantidad molar equivalente del inserto es necesario conocer la relación de tamaño vector/inserto. Se prepara una condición equimolar (1:1), una condición donde el inserto se encuentra en exceso (1:3 o 1:4), una condición control sin ligasa (para conocer la cantidad de vector sin digerir) y una condición control sin inserto (para determinar la eficiencia de la ligasa). Las reacciones de ligación se realizan a 16°C durante 4 horas. Posteriormente, se transforman los productos de estas ligaciones en células quimiocompetentes TOP10 (Invitrogen). Finalmente, se inoculan precultivos de 3ml de LB con ampicilina (antibiótico de selección utilizado) y se dejan crecer o/n a 37°C en agitación. Seguidamente, se extrae el DNA plasmídico por minipreparación y se comprueba con enzimas de restricción .

2.1.9.2. Clonación por recombinación homóloga en bacterias

Procedimiento: Para la generación de vectores adenovirales el último paso de clonación se realiza mediante recombinación homóloga debido al gran tamaño de los plásmidos implicados. Así pues, el plásmido pKP1.4, portador del genoma del adenovirus flanqueado por secuencias ITR, se linealiza mediante digestión con la enzima de restricción *Swa*I. A su vez el plásmido lanzadera p6600 portador del cassette de replicación con el transgen se digiere con dos enzimas que tengan dianas externas a la zona de recombinación, para ello se han utilizado *Bsr*BI y *Bst*ZI. Para la reacción de recombinación se utilizaron 50ng del pKP1.4 digerido con *Swa*I. Se prepara una condición equimolar (1:1), una condición 1:2 y otra 1:3 (p6600 linealizado en exceso).

A continuación se transforma en células BJ5183, se inoculan precultivos de 3ml de LB con ampicilina a partir de colonias aisladas y se dejan crecer o/n a 37°C en agitación. Seguidamente, se extrae el DNA plasmídico por minipreparación y se analiza por enzimas de restricción para comprobar el patrón de digestión. Los clones positivos se transforman en células TOP10, que permite un mayor rendimiento en la replicación del DNA plasmídico.

2.1.10. Amplificación de fragmentos de DNA mediante PCR

La PCR (reacción en cadena de la polimerasa o *Polymerase Chain Reaction*) es una técnica en la cual se amplifican fragmentos de DNA gracias al uso de dos oligonucleótidos o cebadores que hibridan de forma complementaria con los extremos del fragmento de DNA a amplificar, y gracias a la acción de la enzima TaqPolimerasa. Esta enzima incorpora los nucleótidos necesarios hasta llegar al final de la cadena de DNA que está amplificando, proceso que se repite hasta 25-35 ciclos por PCR, obteniendo el DNA deseado. Las PCR del presente trabajo han sido realizadas utilizando los siguientes reactivos y condiciones:

Reactivos:

0,4µl dNTPs (25mM)
1,6 µl MgCl₂ (65mM)
2 µl tampón de la enzima TaqPol
0,3 µl Taq Pol (5U/µl)
2 µl de cada oligonucleótido
1 µl de cDNA de muestra de células infectadas
Volumen final de 20 µl (con agua MilliQ)

Condiciones de amplificación:

98°C-10 minutos
(92°C-15 segundos, 42°C-30 segundos, 72°C-45 segundos) 30 ciclos
72°C-10 minutos
Mantener a 4°C o congelar a -20°C

2.1.11. Secuenciación

La secuenciación fue llevada a cabo por el *Servei de Secuenciació de la Universitat Autònoma de Barcelona*.

2.2. Obtención y análisis de RNA

El RNA es muy sensible a la acción de las RNAsas, por tanto es muy importante trabajar con material libre de RNAsas, guantes y puntas con filtro. También es aconsejable trabajar en hielo.

2.2.1. Extracción del RNA de células de cultivo

Reactivos: Trizol (Invitrogen), Isopropanol (Panreac), 2-bromo-3-cloropropano (Sigma).

Procedimiento: Se centrifugan las células 3 minutos a 1400g, se descarta el sobrenadante y se resuspende el *pellet* con Trizol. A continuación, se incuban las muestras 10 minutos a temperatura ambiente (para la disociación de los complejos nucleoproteicos) y se añade 0,1ml de 2-bromo-3-cloropropano por cada ml de Trizol utilizado, se agita 15 segundos con vórtex y se incuba 2-3 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente, se centrifuga 15 minutos a 12000g a 4°C, y se recupera la fase acuosa de cada muestra. Se añade 0,25ml de isopropanol por cada ml de Trizol utilizado. Tras una incubación de 10 minutos a temperatura ambiente, el RNA se precipita centrifugando 10 minutos a 12000g a 4°C y se decanta el sobrenadante. A continuación, se realiza un lavado del *pellet* con etanol al 70%, a razón de 1ml por cada ml de Trizol utilizado, se mezcla invirtiendo y se centrifuga 5 minutos a 7500g a 4°C. Se decanta el sobrenadante y, una vez seco, el *pellet* de RNA se resuspende con agua RNAsa-free, pipeteando repetidamente la solución e incubando 10 minutos en hielo. Finalmente, se mide la concentración espectrofotométricamente con Nanodrop y se almacena a -80°C.

2.2.2. Retrotranscripción

La retrotranscripción de RNA para obtener el cDNA se llevó a cabo con el kit comercial *Omniscript Reverse Transcription cDNA Synthesis Kit* de Qiagen, siguiendo el protocolo facilitado por el fabricante.

2.3. Obtención y análisis de proteínas

En este trabajo se ha realizado la extracción de proteínas totales de cultivos celulares establecidos y primarios, así como de algunas muestras de tejido.

2.3.1. Extracción de proteínas

Reactivos: buffer lisis RIPA (50mM Tris-HCl (pH 7.4) (Sigma), 150mM NaCl (Panreac), 1mM EDTA (USB), 1% NP-40 (Panreac) and 0.25% deoxicolato sódico (Fluka), tableta con inhibidores de proteínas y fosfatasa (Roche), sonicador (Sonics).

Procedimiento: En el caso de los extractos celulares, las células se centrifugan 5 minutos a 200g, se descarta el sobrenadante y el *pellet* se resuspende en 100µl de buffer RIPA. Seguidamente se homogenizan mediante sonicación utilizando 3 pulsos de 10 a 20 segundos, manteniendo las células en hielo. En las muestras de colon se añade 400µl y se homogenizan utilizando unos 5-10 pulsos de 10 a 30 segundos, también manteniendo las células en hielo, para evitar que se calienten y posibles degradaciones proteicas. Una vez finalizada la homogenización se centrifugan durante 15 minutos a 12000g a 4°C para eliminar los restos, se recoge el sobrenadante y se guarda a -80°C hasta su cuantificación.

2.3.2. Cuantificación de proteínas

Todos los extractos proteicos se cuantifican con el método colorimétrico *BCATM Protein Assay Kit* (Pierce) que está basado en la reacción de Biuret. Esta reacción consiste en la capacidad quelante del ácido bicinconínico (BCA) con los iones Cu^+ resultantes de la reducción del Cu^{2+} a Cu^+ por los enlaces peptídicos de las proteínas en solución alcalina. Los iones Cu^+ son quelados por cada 2 moléculas de BCA, favoreciendo el viraje de la solución verdosa a lila, que absorbe a 562nm y que se puede medir por espectrofotometría.

Reactivos: Protein Assay Kit (Pierce), Nanodrop (NanoDrop Technologies).

Procedimiento: Se parte de una recta patrón que consiste en diluciones seriadas (desde 2mg/ml hasta 0,0625mg/ml) a partir de un stock de albúmina bovina sérica

(BSA) proporcionada por el kit. Se preparan también las diluciones de las muestras proteicas a cuantificar (normalmente 1/10, pero puede variar si los valores no entran en la recta). Previamente, se prepara la solución *working reagent* tal y como indica el fabricante, y ésta se mezcla con 2µl de recta patrón o de las muestras a cuantificar. A continuación, se deja la reacción incubando 30 minutos a 37°C. Posteriormente, se mide la absorbancia a 562nm con el Nanodrop, empezando por la recta patrón a partir de la cual se extrapolan las medidas de absorbancia de las muestras, obteniendo la concentración para cada una de ellas.

2.3.3. Electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE)

La electroforesis desnaturalizante SDS-PAGE se fundamenta en la capacidad de movilización de las partículas con carga tras la aplicación un campo eléctrico. La presencia de un detergente aniónico, como el SDS, provoca la desnaturalización de las proteínas por la rotura de los puentes disulfuros. De esta manera, las proteínas pueden migrar y separarse según su tamaño molecular.

Reactivos: Solución Acrilamida:Bisacrilamida (29:1) (Amresco), tampón SDS-TrisHCl a pH 8,8 (1,5M Tris, 0,4% SDS), tampón SDS-TrisHCl a pH 6,8 (0,5M Tris, 0,4% SDS), APS 10% (Amresco), tetrametil-etilen-diamina (TEMED) (Sigma), tampón de carga 5x (20% glicerol [Panreac], 10% SDS [USB], 0,32% 2-mercaptoetanol [Sigma], 0,02% bromofenol blue [Sigma]), marcador de peso molecular (PageRuler Pre-Stained, [Fermentas]), cubeta Mini Protean Tetra Cell (BioRad), tampón de electroforesis 1x (25mM Tris [Sigma], 192mM glicina [Serva], 1% SDS [USB]).

Procedimiento: Se prepara un gel separador de acrilamida. La concentración de acrilamida dependerá del rango de peso molecular de la proteína a detectar (en este trabajo se han utilizado concentraciones de 7 a 10%). Se prepara también un gel concentrador (*stacking*) a 3,9% de acrilamida con pocillos donde se cargarán las muestras. Para la polimerización se añade TEMED y APS. Dependiendo del grosor de los espaciadores de los cristales utilizados los geles serán de 0,75mm o 1,5mm, pudiéndose cargar el doble de muestra en los segundos. Para preparar las muestras, se diluye la cantidad de µg de proteína que se desee correr en agua, y se añade el tampón de carga 5x. Antes de cargarlas en el gel, se desnaturalizan durante 10 minutos a 99°C.

Una vez cargadas en el gel, se realiza la electroforesis a un voltaje inicial de 110V durante 20 minutos para que las proteínas se concentren antes de entrar en el gel separador, y posteriormente durante 1h-1h30min a 130-140V según las bandas a detectar.

2.3.3.1. Electrotransferencia

Reactivos: Transblot semidry transfer cell (BioRad), membranas PVDF (GE Healthcare), metanol (Panreac), tampón de transferencia 1x (25mM Tris [Sigma], 192mM Glicina [Serva]), papel Protean XL Size (BioRad), tampón Ponceau (5% en agua con ácido acético) (Sigma).

Procedimiento: Las proteínas presentes en el gel de acrilamida se transfieren a una membrana de PVDF previamente activada (sumersión en metanol 10 segundos, seguido de un lavado de 5 minutos en agua destilada y 15 minutos en tampón de transferencia). El gel de acrilamida con las proteínas también se equilibra durante 15 minutos en tampón de transferencia, igual que dos trozos de papel Protean. Tras esta preparación, se montan las capas necesarias para la transferencia, éstas son de abajo a arriba: papel, membrana, gel y otro papel. Es importante ir eliminando con un rodillo las burbujas entre las capas para que no interfieran en el proceso. Se realiza la transferencia durante 45 minutos a 25V. Posteriormente, y de forma opcional, pueden observarse las proteínas transferidas al papel mediante tinción con Ponceau (sumersión 5 minutos). Tras su visualización debe extraerse el Ponceau mediante lavados seriados con agua destilada.

2.3.3.2. Inmunodetección

Reactivos: TBS (50mM Tris [Sigma], 136mM NaCl [Panreac], 40mM KCl [Panreac], pH 7,5), leche en polvo (Central Lechera Asturiana), albúmina bovina sérica (BSA) (Sigma), Tween-20 (Sigma), anticuerpos primarios y secundarios, ECL Plus Western Blotting Detection (GE Healthcare), Hyperfilm ECL high performance chemiluminescence film (GE Healthcare), tampón de deshibridación (62,5mM Tris [Sigma], 100mM 2-mercaptoetanol [Sigma], 2% SDS [USB]).

Anticuerpo primario	Casa comercial	Referencia	Anticuerpo secundario
Anti-IL23R	R&D Systems	AF1686	Goat ¹
Anti-octaprobe	SantaCruz	Sc-807	Rabbit ²
Anti-Flag	Sigma	F1804	Mouse ³

Anticuerpos utilizados. ¹ Rabbit anti-goat Ig HRP (P0160, Dako). ² Swine anti-rabbit Ig HRP (P0399, Dako). ³ Rabbit anti-mouse Ig HRP (P0260, Dako).

Procedimiento: Tras la correcta transferencia de la membrana, se procede al bloqueo sumergiendo la membrana en solución de bloqueo durante 1h a temperatura ambiente para evitar uniones inespecíficas del anticuerpo primario. La solución utilizada de forma mayoritaria ha sido 5% de leche en TBST (TBS con 0,1% de Tween-20). Sin embargo, para la inmunodetección de proteínas fosforiladas se utiliza la solución de bloqueo 0,5% de BSA en TBST. Posteriormente, se incuba la membrana con 5-7ml de la dilución del anticuerpo en solución de bloqueo a la concentración que indica el fabricante, o/n a 4°C. Al día siguiente, se realizan 3 lavados de la membrana con TBST durante 10 minutos y se incuban con la dilución del anticuerpo secundario (tiene conjugada la peroxidasa de rábano) en solución de bloqueo durante 1h a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizan 3 lavados a la membrana de 10 minutos con TBST y se procede a la detección. Para ello, se mezclan los dos componentes del kit ECL Plus como indica el fabricante, se cubre la superficie de la membrana y se incuba durante 5 minutos. De esta manera, el luminol del kit reaccionará con la peroxidasa, emitiendo luz. Finalmente, se expone la membrana con una película fotográfica durante el tiempo necesario (variable) y se revela automáticamente con la máquina de revelado (suministrará a la película fotográfica una sustancia reveladora, otra fijadora y finalmente agua destilada). Se escanean las bandas obtenidas en los films y, si es requerido, se realiza una densitometría con el programa ImageJ.

2.3.4. Electroforesis no desnaturizante (one-dimensional native electrophoresis)

La electroforesis no desnaturizante, al igual que la desnaturizante, se fundamenta en la capacidad de movilización de las partículas con carga tras la aplicación de un

campo eléctrico. Sin embargo, la ausencia de un agente desnaturante hace que las proteínas migren por el gel en función de más factores además del peso molecular. La movilidad en este caso depende del tamaño, la forma que adopte la proteína y de las cargas intrínsecas, como el punto isoeléctrico. La electroforesis aniónica y catiónica es posible gracias a un amplio rango de pH en la preparación del gel.

2.3.4.1. Electrophoresis no desnaturante a pH7

Reactivos: Solución Acrilamida:Bisacrilamida (29:1) (Amresco), tampón 4x fosfato a pH7 (400mM fosfato sódico, 0,4% SDS), APS 10% (Amresco), tetrametil-etilen-diamina (TEMED) (Sigma), tampón de carga no desnaturante 5x (20% glicerol [Panreac], 70% tampón fosfato sódico, 0,02% bromofenol blue [Sigma]), marcador de peso molecular (PageRuler Pre-Stained, [Fermentas]), cubeta Mini Protean Tetra Cell (BioRad), tampón de electroforesis 1x no desnaturante (tampón 1x fosfato a pH7).

Procedimiento: Se prepara un gel separador de acrilamida al 10%, y se añade TEMED y APS para su polimerización. Dependiendo del grosor de los espaciadores de los cristales utilizados los geles serán de 0,75mm o 1,5mm, pudiéndose cargar el doble de muestra en los segundos. Para preparar las muestras, se diluye la cantidad de μg de proteína que se desee correr en agua, y se añade el tampón de carga 5x. Una vez cargadas en el gel, se realiza la electroforesis a un voltaje de 135V 0,05A durante 4-6 horas a una temperatura de 2-8°C.

Los pasos de electrotransferencia e inmunodetección son los mismos que para la electroforesis desnaturante.

2.3.5. Deshibridación de la membrana

En ocasiones es necesario volver a incubar una membrana con otro anticuerpo. En caso de que las nuevas bandas a detectar coincidan con las bandas ya establecidas será necesario deshibridar previamente la membrana. Ello consiste en la desunión de los anticuerpos mediante incubación de la membrana durante 1 hora a 55°C con el tampón de deshibridación (100 mM b-mercaptoethanol, 2% sodium dodecyl sulphate, 62.5 mM Tris-HCl, pH 6.7). Seguidamente será necesario activar nuevamente la

membrana con metanol e incubarla con solución de bloqueo. Tras este proceso, la membrana podrá ser incubada con el siguiente anticuerpo primario, tal como se ha descrito anteriormente.

2.3.6. Precipitación de proteínas Flag

Reactivos: FLAG® Immunoprecipitation Kit (Sigma), filtros Amicon Ultra-4, 10kDa (UFC801024, Millipore).

Procedimiento: Se infectan células jurkat con los vectores Ad5-Flag-IL23R o Ad5-Flag-IL23Rs. Como control negativo se utilizan células sin infectar. Tras 48 horas, se recogen los sobrenadantes y se concentran con filtros Amicon. A continuación se precipitan con el kit comercial FLAG® Immunoprecipitation Kit, siguiendo las instrucciones facilitadas por el fabricante. Finalmente, las muestras son almacenadas a -80°C hasta su análisis por Western-Blot.

2.3.7. Precipitación de proteínas GST

Reactivos: Glutathione-sepharose 4B®, buffer de lavado (50mM Tris-HCl, 2mM EDTA, 2mM EGTA, 0,5M NaCl, 1% Tritón X-100, pH 7,5), buffer de elución (50mM Tris-HCl, 0,1mM EGTA, 0,275M sacarosa, 0,1% β-mercaptoetanol, pH 8), buffer de elución con glutatión (buffer de elución + 40mM de glutatión reducido).

Procedimiento: Las células HEK293 se transfectan con el plásmido pGST-IL23Rs. Tras 48 horas, se realiza la extracción proteica. Las proteínas GST presentes en el extracto celular se purifican por afinidad a la Glutathione-sepharose 4B®, incubando 1-2 horas a 4°C en el agitador. Como control se utiliza el extracto proteico de células transfectadas con un plásmido irrelevante no GST. A continuación, se lava la resina 3 veces con buffer de lavado para eliminar las proteínas libres no unidas a la resina. Seguidamente, se realiza un lavado con buffer de elución. Y finalmente, se eluyen incubando la resina con buffer de elución con glutatión durante 25 minutos en el agitador, tras lo cual se recupera el sobrenadante y se almacena a -80°C hasta su análisis por Western-Blot.

2.4. Técnicas generales de cultivo celular

La manipulación de cultivos celulares fue realizada en las instalaciones de nivel de seguridad biológica 2 (NSB2) de la quinta planta del CBATEG, con el fin de mantener todo lo posible las condiciones de asepsia y esterilidad.

Equipamiento general: Campana de flujo laminar vertical con sistema de luz ultravioletada (Telstar). Incubador de células (Forma Scientific) de atmósfera controlada (5% CO₂, 95% O₂, 95% de humedad relativa y 37°C). Congelador de -80°C (Forma Scientific). Microscopio invertido (Nikon). Material fungible: pipetas de plástico estériles (ALP), placas de 10 y 15cm de diámetro, placas de 6, 12, 24, 48 y 96 pozos, tubos cónicos (Falcons) de 15 y de 50ml, criotubos, *scrappers* (Nunc).

2.4.1. Mantenimiento de cultivos celulares en monocapa

Reactivos: Medio de crecimiento: Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (PAA), contiene 4,5mg/ml glucosa y L-glutamina, se complementa con un 10% (v/v) de Suero Fetal Bovino (FBS) (PAA) y antibióticos penicilina/estreptomicina (P/S) 1x (100x) (PAA). Tampón fosfato salino (D-PBS): 137mM NaCl, 3mM KCl, 10mM Na₂HPO₄·7H₂O, 1,7mM KH₂PO₄, pH 7,4 (Panreac), Tripsina-EDTA (1x) (PAA). Solución salina 1x (1,4M KCl, 0,7M NaCl).

Procedimiento: El mantenimiento normalmente se realiza en placas de 15cm. Con las líneas celulares de 293 se aspira el medio y se hace un lavado con 5ml de D-PBS. Se elimina el D-PBS y se añaden 10ml de solución salina 1x. A continuación se resuspenden las células por acción mecánica de la pipeta y se traspasan a un Falcon. En el caso de algunas líneas celulares más adherentes es necesario añadir 3ml tripsina a la placa y dejar actuar 5 minutos a 37°C. Después se recogen las células saltadas y se traspasan a un Falcon, añadiendo medio de crecimiento para inhibir la acción de la tripsina. Se centrifuga durante 5 minutos a 1000g, se descarta por aspiración el sobrenadante y se añaden unos mililitros de medio. Se procede con una pipeta a la disgregación mecánica del *pellet* hasta obtener una suspensión homogénea. Se siembra en cada placa de 15cm una dilución variable dependiendo del día en que se quieran utilizar las células, o deban volver a pasarse. Se añade a la placa medio de

crecimiento hasta unos 17-18ml totales y se realizan movimientos suaves para dispersar las células por toda la placa. Finalmente, se incuba a 37°C y 5% CO₂ hasta su uso o nuevo *passage* de mantenimiento.

2.4.2. Criopreservación: congelación y descongelación de viales

Reactivos: Medio de congelación para líneas celulares 293: FBS con 10% de DMSO.

Procedimiento de congelación: De manera similar a lo descrito en el mantenimiento de la línea celular, las células de la placa se disgregan mecánicamente con solución salina, se traspasan a un Falcon y se centrifugan 5 minutos a 1000g. Se elimina el sobrenadante y se resuspende el *pellet* celular en 1ml de medio de congelación. Rápidamente, se traspasa la suspensión a un criotubo de congelación, se deposita en un depósito de congelación gradual y se congela a -80°C. Al día siguiente, pueden extraerse los tubos del depósito de congelación gradual y almacenarse en el congelador a -80°C.

Procedimiento de descongelación: Se descongela el vial de células en el baño a 37°C y rápidamente se pasa el contenido a un tubo cónico con 10ml de medio de cultivo. Las células se precipitan por centrifugación 5 minutos a 1000g, se elimina el sobrenadante y se resuspenden en 5ml de medio de crecimiento. Finalmente, se siembran en la placa de 10cm. Cuando las células lleguen al porcentaje deseado de confluencia se realiza el protocolo de mantenimiento.

2.4.3. Mantenimiento de cultivos de células Jurkat

Reactivos: Frascos de cultivo celular, medio de cultivo RPMI 5%FBS.

Procedimiento: Las células Jurkat crecen sin adherirse al fondo y en reposo, en medio RPMI 5%FBS. La dilución de los *passages* de mantenimiento es variable y depende de la velocidad de crecimiento del cultivo y de la concentración que deseemos.

2.4.4. Introducción de DNA plasmídico en células por transfección

Reactivos: Polietilenimina (PEI) 10mM (PolyScience), NaCl 0.9% (B.Braun). Medio de transfección: medio DMEM (PAA) sin FBS ni antibióticos.

Procedimiento: El día anterior a la transfección se siembran las células de manera que en el momento de la transfección se encuentren a una confluencia aproximada de 70%. Usualmente se realizan las transfecciones en placas de 6 pozos. Para la realización de la transfección en otro tipo de placa basta con adecuar proporcionalmente las cantidades. Para un pozo de placa de 6 pozos: se transfecta 3µg de plásmido, disolviendo el DNA en 200µl de NaCl 150mM. En un tubo aparte se mezcla 2,25µl de PEI 10mM por cada µg de DNA con NaCl 150mM, en un volumen final igual que la dilución del DNA. La dilución de PEI se añade poco a poco a la del DNA y se incuba durante 20 minutos a temperatura ambiente, con el fin de formar los complejos PEI-DNA. Posteriormente, se aspira el medio de cada pozo, se añade el medio de transfección y el volumen de DNA/PEI correspondiente a cada pozo, hasta tener 750µl/pozo. A continuación, las placas se incuban a 37°C y 5% de CO₂ durante 3 horas. Finalmente, se aspira el medio y se añaden 2ml de medio fresco (complementado con 10% de FBS y 1% de P/S) por pozo. Se incuba a 37°C y 5% CO₂ las horas necesarias según el experimento.

2.4.5. Cultivos primarios de células T CD4+ de ratón

Reactivos: Filtros 70µm, filtros 40µm, medio de bloqueo (IMDM 5% FBS + FcBlock [anti-CD16/CD32 monoclonal antibodies, BDBioscience]), mouse CD4 (L3T4) MicroBeads (Miltenyi Biotec), medio automacs (IMDM 2%FBS con 2mM EDTA), medio IMDM 2%FBS, Cytometry-autoMACS (Miltenyi Biotec), medio de cultivo (IMDM 5% FBS).

Procedimiento: Las células T CD4+ de ratón pueden obtenerse de los nódulos linfáticos o del bazo. En primer lugar se disgregan mecánicamente con un filtro de 70µm. Seguidamente, las células se incuban con medio de bloqueo en hielo durante 20 minutos. A continuación, se añaden las microbeads a razón de 1/20 en volumen y se deja incubar 30 minutos a 2-8°C. Transcurrido ese tiempo, se lava 2 veces con medio IMDM 2%FBS, y se filtra con un filtro de 40µm. Seguidamente, las células CD4+ se purifican con el Cytometry-autoMACS.

Para comprobar la eficiencia de la purificación se separan dos aliquotas de células purificadas, y una de ellas se incuba con anti-CD4. La otra servirá de control negativo.

Se incuban 30 minutos en hielo, se resuspenden en PBS y se analizan por citometría de flujo. Finalmente, las células CD4 purificadas se siembran con medio de cultivo en placas pre-tratadas con anti-CD3 (1µg/ml) y anti-CD28 (10µg/ml).

2.5. Vectores virales

Las producciones de vectores adenoasociados y adenovirales se han llevado a cabo en condiciones de bioseguridad de nivel 2 (NBS2), siguiendo el Reglamento de Seguridad de la Unidad de Producción de Vectores del CBATEG. Los residuos generados durante este trabajo han sido eliminados siguiendo el procedimiento correspondiente al NSB2.

2.5.1. Generación y purificación de vectores adenoasociados

2.5.1.1. Transfección, amplificación y purificación

La producción de AAV se ha llevado a cabo siguiendo el protocolo de la triple transfección (Xiao et al., 1998), que previene de la presencia de adenovirus contaminantes. En el proceso de la producción, cada plásmido guarda una función específica: pRep2CapX (X=1-10) codifica para las proteínas necesarias en la replicación viral y aporta las proteínas de la cápside, pXX6 proporciona los genes adenovirales necesarios para la replicación del AAV, y por último el plásmido pGV contiene un cassette de expresión flanqueado por las secuencias ITR virales (señal de empaquetamiento del virus). En la producción de vectores pseudotipados las ITRs y el gen *Rep* del AAV2 se mantienen, cambiando únicamente el gen *Cap* del AAV2 por el gen *Cap* de otro serotipo. De esta manera se consigue un AAV pseudotipado con el tropismo cambiado.

Reactivos y materiales: PEI (PolyScience), benzonasa (Novagen), PBSMK (PBS 1x, 1mM MgCl₂ [Panreac], 2,5mM KCl [Panreac]), iodixanol (Axis-Shield PoC AS), phenol red (Sigma), polietilenglicol (PEG)(Fluka), tampón de lisis (50mM Tris [Sigma], 20mM NaCl [Panreac], 2mM MgCl₂ [Panreac]).

Procedimiento: Se preparan 20 placas de 15cm con células 293-AAV (es necesaria una confluencia del 70% el día de la transfección). Se realiza la triple transfección con PEI

de las 20 placas utilizando: 500µg de pXX6, 250µg de pRep2CapX y 250µg del plásmido pGV. Los tres plásmidos son mezclados con DMEM y repartidos en cada placa hasta que queda un volumen final de 14ml/placa. Transcurridas 6h, se cambia el medio. Cuarenta y ocho horas post-transfección se recogen las células con la ayuda de un *scraper* y se centrifugan. A continuación, se resuspenden en tampón de lisis y realizan tres ciclos de congelación-descongelación. Seguidamente, se precipitan los restos celulares por centrifugación de 10 minutos a 2000g y se recupera el sobrenadante. Se le añade al sobrenadante la benzonasa (50U/ml) para degradar el DNA celular y se incuba 1h a 37°C. Posteriormente, se centrifuga 20 minutos a 3000g y se añade PEG al sobrenadante (1ml PEG/4ml de lisado) para facilitar la precipitación de las partículas virales y se deja actuar 3 horas a 4°C. Seguidamente, se centrifuga durante 15 minutos a 8000g a 4°C, se decanta el sobrenadante, se añade 15ml de Lysis Buffer por cada tubo de gradiente que se realiza y se incuba 48h a 4°C.

Preparación del gradiente de iodixanol: En primer lugar, se preparan las diferentes concentraciones de iodixanol que formarán las capas en el gradiente.

- Iodixanol al 15% en 1M de NaCl en PBSMK
- Iodixanol al 25% en PBSMK con 20µl de phenol red para proporcionar un color rojo.
- Iodixanol al 40% en PBSMK
- Iodixanol al 60% en PBSMK con 2µl de phenol red para proporcionar un color amarillo.

A continuación, se prepara el gradiente formando capas, para ello se deben ir añadiendo en el fondo de manera muy lenta las soluciones de iodixanol, de menos a más densa, atravesando las capas depositadas anteriormente. Así pues, se empieza poniendo 9ml de iodixanol al 15%, seguidamente 6ml de iodixanol al 25%, después 5ml de iodixanol al 40% y finalmente 5ml de iodixanol al 60%. Por último, se añade arriba muy lentamente los 15 ml del lisado. Se enrasan y se equilibran los tubos con PBSMK. Seguidamente, se sellan y se centrifugan a 69000g durante 1 hora. Finalmente, se perfora el fondo del tubo con un colector de fracciones y se recogen las fracciones del virus.

El método de purificación utilizado basado en el fraccionamiento del lisado crudo mediante un gradiente de densidad en un medio no iónico como el iodixanol tiene la ventaja, respecto a la purificación clásica con doble gradiente con cloruro de cesio, de que las partículas no se agregan y el iodixanol es inerte. Por lo tanto, este proceso no requiere purificación posterior (Zolotukhin *et al.* 1999).

2.5.1.2. Determinación del título de los vectores adenoasociados

La determinación del título de las preparaciones virales se realiza mediante la utilización de una molécula llamada *picogreen* que se intercala en las cadenas dsDNA, cuantificando el número de genomas virales presentes en la preparación. Este procedimiento fue puesto a punto por la Unidad de Producción de Vectores (UPV) del CBATEG.

Reactivos: Tampón de lisis (20mM Tris pH 7,4 [Sigma], 200mM NaCl [Panreac]), 0,2% SDS (USB), termociclador de PCR (Eppendorf), placa 96w de plástico negra (Nunc), fluorímetro (Wallac 1420 Victor³ TM) del Servicio de Análisis y Fotodocumentación del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias de la Universitat Autònoma de Barcelona, *picogreen* (Invitrogen).

Procedimiento: Se diluyen 2µl de cada muestra con 8µl de TE, y se añade 10µl de tampón de lisis. La lisis de las cápsides virales se realiza en el termociclador, realizando un calentamiento de 1 hora a 70°C seguida de enfriamientos de 5°C cada minuto. Una vez finalizado el programa del termociclador, se traspasan los 20µl de cada muestra a un pocillo de una placa de 96w negra. Seguidamente, se añade 180µl de *picogreen* a cada pocillo, se incuba 5 minutos a temperatura ambiente y se procede a la lectura de la fluorescencia de la placa con un fluorímetro. Además de las muestras analizadas, se realiza una recta patrón en la que se lee la fluorescencia de 40ng, 13,33ng, 4,44ng, 1,48ng, 0,49ng, 0,16ng, 0,12ng y 0ng de DNA. También se cargan muestras sin tampón de lisis que detectan el DNA exógeno presente, que se restará de los valores obtenidos. Interpolando la fluorescencia obtenida de las muestras con la de la recta patrón se obtienen los ng de DNA presentes en cada muestra y con la siguiente fórmula se calculan los genomas virales de cada preparación:

$$\frac{A \times 1.82 \cdot 10^{12}}{B}$$

Donde A son los ng/ml de DNA: ng/ml = ng en pozo x 1000 / C,
B es la longitud del genoma del AAV (distancia en bases entre las ITR)
y C es el número de μ l leídos

2.5.2. Generación y titulación de vectores adenovirales

2.5.2.1. Preparación del genoma viral para su transfección en células HEK-293

Antes de proceder a la transfección, el plásmido del genoma adenoviral se linealiza mediante digestión con *Pacl*, para así eliminar el origen de replicación plasmídico y el gen de resistencia a la Ampicilina. Para ello, 100 μ g de DNA se digieren con 50U de *Pacl* en un volumen final de 200 μ l o/n. A continuación, se precipitan con 20 μ l de acetato de potasio 3M (pH 5,2) y 550 μ l de etanol absoluto y se incuba a -80°C durante 30 minutos. Seguidamente, se centrifuga a 16000g a 4°C y se descarta el sobrenadante. El *pellet* de DNA se lava con etanol al 70% y se deja secar durante 15 minutos. Tras esto, el DNA se resuspende con agua milliQ o TE (10mM Tris-HCl/1mM EDTA, pH=8) y se incuba 1 hora a 37°C.

2.5.2.2. Transfección y amplificación de los vectores virales

La transfección de los vectores virales se lleva a cabo con células HEK-293QB en placa de 6 pozos siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 2.4.5. *Introducción de DNA plasmídico en células por transfección*. A las 72 horas se recolectan las células y se realizan 3 ciclos de congelación/descongelación para liberar el virus. Se centrifuga a 1400g durante 5 minutos y el sobrenadante (llamado lisado crudo) se utiliza para el siguiente paso de amplificación.

El lisado crudo procedente de la placa de 6 pozos se utiliza para infectar una placa de 10cm con HEK-293QB. Pasados unos días (variable en función del virus) se detecta el efecto citopático (las células dejan de estar adheridas al fondo de la placa). En este momento se recogen y se realizan 3 ciclos de congelación/descongelación.

Seguidamente, se centrifugan a 1400g 5 minutos y el sobrenadante (lisado crudo) se utiliza para el siguiente paso de amplificación. Del lisado crudo de la placa de 10cm, se infectan 3 placas de 15cm, y del lisado crudo obtenido de éstas, se infectan 20-40 placas de 15cm. El lisado crudo de estas placas se utiliza para la purificación del vector viral.

2.5.2.3. Purificación de los vectores adenovirales

Para la purificación de los adenovirus se realizan 2 centrifugaciones seriadas del lisado crudo en gradiente de CsCl. La primera centrifugación se realiza con un gradiente discontinuo de CsCl. Para su preparación se colocan en un tubo de centrifugación (Beckman, *Centrifuge tubes polyallomer*) 2,5ml de CsCl (concentración: 1,25g/ml) y 2,5ml de CsCl (concentración: 1,4g/ml). A continuación, se añade suavemente el lisado crudo sobre el gradiente hasta rellenar todo el tubo de centrifugación. La centrifugación se realiza con el rotor Beckman SW32 durante 1 hora y 42 minutos a 32000rpm y 18°C. La banda correspondiente al virus se extrae con una aguja hipodérmica (B.Braun 100 Sterican 1,20x40mm 18G 1,5’’). Para la segunda centrifugación, se deposita en el tubo de centrifugación 5ml de CsCl a 1,34g/ml. Sobre él se deposita con cuidado la muestra proveniente de la primera centrifugación. Se centrifuga en un rotor Beckman SW40 durante 18 horas a 35.000rpm y 18°C. La banda correspondiente al virus se extrae con una aguja hipodérmica. Finalmente, se utiliza una columna Sephadex (PD-10 *desalting columns*, Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) para eliminar los restos de CsCl (es tóxico para las células).

2.5.2.4. Titulación de los vectores adenovirales

La titulación de los vectores virales se lleva a cabo en células HEK-293 por dilución límite desde 10^{-3} hasta 10^{-10} en placa de 96 pozos. Se realizan triplicados para minimizar el error. En los vectores portadores del gen GFP, la titulación se realiza contabilizando las células que expresan GFP mediante microscopía de fluorescencia (NIKON *Inverted Microscope ECLIPSE TS100/TS100-F*). En los vectores no portadores de un gen reporter se utiliza el kit *AdEasyTM Viral Titer kit* (Stratagene, ref. 972500).

2.5.3. Producción del adenovirus quimera Ad5/40s

El protocolo de producción del vector quimera Ad5/40s ha sido desarrollado en esta tesis, por lo que se detalla extensamente en el apartado 1.2.1.1 de *Resultados* (página 63 de este trabajo) y en el *Anexo (Capítulo de libro: Production of chimeric adenovirus)*. Los procedimientos llevados a cabo en los experimentos con el virus Ad5/40s (determinación de su ciclo viral y condiciones óptimas de producción) se especifican en las páginas 71 y 72 de esta tesis.

2.5.4. Infección de células con vectores virales

Reactivos: medio de infección (medio de cultivo habitual con 2% de FBS).

Procedimiento: En el caso de células adherentes, el medio se aspira y se sustituye por medio de infección. Para las células en suspensión, éstas se recogen, se centrifugan, se descarta el medio y finalmente se resuspenden en medio de infección. A continuación, se añade el correspondiente volumen de vector viral. El cálculo depende de las partículas físicas o genomas virales por célula (PP/célula o vg/célula), o las unidades infecciosas por célula (IU/célula), más conocido como MOI, con el que se desee infectar las células.

2.5.5. Análisis de la expresión de GFP por citometría de flujo

Reactivos: Citómetro de flujo (BD FACSCanto, BD FACSDiva 5.0 software), D-PBS, PFA.

Procedimiento: Las células se centrifugan 5 minutos a 200g y se resuspenden con PFA al 2%. Se deja actuar 3-5 minutos. A continuación, se vuelven a centrifugar y se resuspenden con D-PBS. Las muestras celulares se mantienen a 2-8°C hasta su análisis por citometría de flujo, que analizará el porcentaje de células positivas para GFP en cada condición.

2.6. Ratones DSS

2.6.1. Inducción de colitis por DSS

Para la inducción de colitis se utilizaron ratones C57BL/6J de 5-6 meses. Se les administró 3% de DSS (*Dextran Sulphate Sodium* 36-50kD, Biomedicals) en el agua durante 5 días consecutivos. La solución de DSS se preparó cada dos días. Las características de este modelo son la pérdida de peso, mucosidad rectal, diarrea y heces sanguinolentas. Además se observan cambios en el comportamiento y el aspecto externo de los animales. Para su evaluación se realizó un seguimiento diario de la ingesta de agua y comida, así como del peso de los animales.

2.6.2. Análisis de citoquinas de colon de ratón

Reactivos: Buffer de lisis RIA (50mM Tris-HCl (pH 7,4) (Sigma), 150mM NaCl (Panreac), 1mM EDTA (USB), 1% NP-40 (Panreac) y 0,25% deoxicolato sódico (Fluka), inhibidores de proteínas), sonicador (Sonics), Citómetro de flujo (BD FACSCanto, BD FACSDiva 5.0 software), kit FlowCytomix Pro (Bender MedSystems).

Procedimiento: Las muestras de colon extraídas se sumergen en buffer de lisis RIA y se disgregan por sonicación (pulsos de 10 segundos a 30A), manteniendo las muestras en hielo para evitar la degradación proteica por calentamiento. A continuación, se centrifugan durante 15 minutos a 12000g a 4°C para eliminar los restos de tejido, se recupera el sobrenadante y se guarda a -80°C hasta su cuantificación.

Para la cuantificación se utilizó el kit FlowCytomix Pro, según las instrucciones del fabricante.

2.7. Estudios *in vivo* con ratones EAE

2.7.1. Inducción de la EAE en ratones y seguimiento clínico

Para la realización de estos experimentos se utilizaron ratones hembra de la cepa C57Bl6/J (Harlan, Italia) de entre 8-11 semanas de edad.

Inmunización: Los animales se anestesian con ketamina/xilacina (100/10mg/kg) (Bayer) por medio de inyección por la vía intraperitoneal (i.p.). Se prepara 200µg del péptido MOG₄₀₋₅₅ (sintetizado por la *Secció de Proteòmica, Serveis Científicotècnics de la Universitat Pompeu Fabra*) diluido en suero salino. Seguidamente, se emulsiona con IFA (*Freund Complete Adjuvant*) (Sigma) suplementado con 4mg/ml de *Mycobacterium tuberculosis* H37RA (Sigma). Para cada ratón se administran 200µl totales de la emulsión, repartidos en cuatro áreas próximas a los ganglios linfáticos axilares e inguinales. Además, en el momento de la inmunización y tras 48 horas de la misma se administra por la vía i.v. (vena de la cola) 500ng de toxina pertussis (Sigma) diluida en suero salino en un volumen final de 200µl. Los ratones control del proceso de inmunización sufren el mismo proceso pero en ausencia de MOG₄₀₋₅₅ (animales inmunizados con suero fisiológico). Tras la inmunización, los animales se pesan y evalúan clínicamente a diario. Para la evaluación de los síntomas clínicos se siguió la escala presentada en la **Tabla 8** (página 106 del presente trabajo).

2.7.2. Obtención y fijación del SNC

La médula espinal se extrae y se mantiene en paraformaldehído al 4% durante 48h a 4°C. A continuación, se realizan 5-7 lavados con PBS y se ponen en una solución de sacarosa al 30% a 4°C. En un primer lugar, los tejidos flotan en la solución de sacarosa, deben mantenerse hasta que el tejido se hunda completamente situándose en el fondo del tubo, momento en que ya habrá absorbido toda la sacarosa necesaria (actuará como crioprotector). Posteriormente, los tejidos se incluyen en O.C.T. (O.C.T. Compand, Tissue-Tek®, Sakura), y se congelan en nitrógeno líquido. Temporalmente se conservan congelados a -20°C. Más adelante, se cortan con el criostato (grosor de 20µm) y montan en portaobjetos. Las preparaciones se conservan congeladas a -20°C hasta el momento de su uso.

2.7.3. Estudios histopatológicos

2.7.3.1. Hematoxilina-eosina (HE)

Las médulas espinales fueron teñidas también con la técnica de Hematoxilina-Eosina. Para ello, una vez deshidratadas las muestras con diluciones decrecientes de etanol,

fueron sumergidas en solución de hematoxilina de Harris (Sigma) durante 5 minutos. A continuación, se realizó el viraje mediante 4 minutos en agua corriente. Seguidamente, se procedió a la tinción con eosina alcohólica durante 30 segundos. Finalmente, las muestras fueron deshidratadas con diluciones ascendentes de etanol, se aclararon con xilol, y se montaron con DPX.

Las tinciones de HE fueron analizadas en ciego por la Dra. Carme Costa del grupo de Neuroinmunología Clínica en el Hospital Universitari Vall d'Hebron, según la siguiente escala:

0. Sin lesiones.
1. Infiltración celular solo en las meninges.
2. Infiltración muy discreta y superficial en el parénquima.
3. Infiltración moderada (menos del 25%) en la sustancia blanca.
4. Infiltración severa (menos del 50%) en la sustancia blanca.
5. Infiltración más severa (más del 50%) en la sustancia blanca.

2.7.3.2. Klüver-barrera (KB)

Las médulas espinales se tiñeron con la técnica de Klüver-Barrera, que utiliza dos colorantes: el violeta de cresilo (tinción de gránulos de Nissl) y luxol fast blue (afinidad por los lípidos de la vaina de mielina). Una vez realizado el proceso de hidratación con diluciones decrecientes de etanol, las muestras fueron teñidas en solución de *luxol fast blue* al 0,1% o/n a 55°C. Posteriormente, se realizó la diferenciación utilizando alcohol al 95% y carbonato de litio al 0,05%. A continuación, se realizó la contratinción con solución de violeta de cresilo al 0,1% durante 5 minutos a 55°C. Finalmente, se realizó la diferenciación en alcohol 95%, se aclaró con xilol y se realizó el montaje con DPX.

Las tinciones de KB fueron analizadas en ciego por la Dra. Carme Costa del grupo de Neuroinmunología Clínica en el Hospital Universitari Vall d'Hebron, según la siguiente escala:

0. No desmielinización.
1. Discreta desmielinización, solo alrededor de los infiltrados e implicando menos del 25% de la sustancia blanca.

2. Desmielinización implicando menos del 50% de la sustancia blanca.
3. Desmielinización difusa y generalizada implicando más del 50% de la sustancia blanca.

2.7.3.3. Inmunohistoquímica

Se realizaron los siguientes marcajes inmunohistoquímicos:

Anticuerpo primario	Marcaje	Casa comercial	Referencia	Anticuerpo secundario
Anti-GFAP	Astroglía	Sigma	G3893	Mouse ¹
Anti-Iba1	Microglía	Wako	019-19741	Rabbit ²

Marcajes inmunohistoquímicos realizados. ¹Alexa Fluor Goat anti-mouse 568 (A11004, Molecular Probes). ²Alexa Fluor Goat anti-rabbit (A11011, Molecular Probes).

Reactivos: Tris 0,05M (Sigma), Tris 0,05M + 0,05% tween-20 (Sigma), Tris 0,05M + 0,05% tween-20 + 0,2% BSA (Sigma), anticuerpos primarios y secundarios, solución de montaje (Sigma). Solución de bloqueo (Tris 0.05M + 0.05% tween-20 + 0.2% BSA).

Procedimiento: Previo al inicio del protocolo, los portaobjetos con los tejidos se mantienen durante 10 minutos a 55°C para una mejor adhesión de las muestras y evitar en todo lo posible que los cortes se desprendan.

La inmunohistoquímica se inicia con un lavado con Tris 0,05M, seguido por dos lavados con Tris 0,05M + 0,05% tween-20 de 10 minutos cada uno. A continuación, se incuba 1 hora a temperatura ambiente con la solución de bloqueo. Seguidamente, se incuba con el anticuerpo primario diluido en solución de bloqueo, o/n a 4°C. Posteriormente, se realizan 3 lavados de 10 minutos con tris 0,05M + 0,05% tween-20 y se incuba con el anticuerpo secundario diluido en solución de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, se realizan 3 lavados con Tris 0,05M + 0,05% tween-20 y un lavado con Tris 0,05M de 10 minutos cada uno y se montan las muestras con la solución de montaje.

Las fotografías se tomaron con el microscopio confocal Leica TCS SP2 (láser 561nm, objetivo HCS PL APO CS40.0x1.25 Oil UV), y el análisis de fluorescencia se realizó utilizando el programa Metamorph Version 5.0r1. Todo ello se realizó en ciego.

2.7.4. Ensayos inmunológicos

2.7.4.1. Ensayos de proliferación celular y análisis de la producción de citoquinas

Reactivos: medio de proliferación (IMDM suplementado con 10% FCS Gold, 2mM de L-glutamina, 50 UI/ml de penicilina, 50 µg/ml de streptomina, 50 µM de 2-mercaptoetanol, 5µg/ml de péptido MOG₄₀₋₅₅), péptido MOG₄₀₋₅₅, fitohemaglutinina (PHA, Sigma), [³H]-timidina (PerkinElmer, Waltham, MA, USA). *MILLIPLEX MAP Mouse TH17 Magnetic Bead Panel-Immunology Multiplex Assay* (Merck-Millipore, Ref. MTH17MAG-47K). Luminex MagPix®, xPONENT®4.2, Milliplex® Analyst 5.1. Scintillation counter (Wallac, Turku, Finland).

Procedimiento: A día 14 post-inmunización se sacrificaron 3-5 animales de cada grupo y se les extrajo el bazo. Se purificaron los esplenocitos y se sembraron en medio de proliferación. El cultivo se puso en un incubador a 37°C y 5 % de CO₂. Los controles negativos fueron esplenocitos sembrados en ausencia de MOG₄₀₋₅₅, y los controles positivos fueron esplenocitos sembrados con 5µg/ml de PHA. Transcurridas 48 horas, se extrajeron 50µl del sobrenadante para el análisis de citoquinas con el kit comercial de Merck-Millipore, siguiendo las instrucciones facilitadas por el fabricante. Para la lectura de las muestras se utilizó el Luminex MagPix®, el *software* utilizado fue xPONENT®4.2 para la obtención de datos y Milliplex® Analyst 5.1 para el análisis de datos. Posteriormente, se añadió a los cultivos 1µCi/pocillo de [³H]-timidina. Tras 18 horas se midieron los niveles de incorporación de radioactividad. Se realizaron 5 réplicas por ratón y condición, tanto para las proliferaciones como el análisis de citoquinas.

2.7.5. Análisis estadístico

Los resultados para los experimentos *in vivo* en el modelo de EAE, se expresan como la media de los valores obtenidos ± el error estándar de la media (SEM = SD (desviación estándar)/√(n)). Las diferencias entre grupos se analizaron bien por T-student o bien

por ANOVA con un test posthoc de Tukey. En aquellos casos que no se superó la prueba de Levene para la igualdad de varianzas, se realizó un test Mann-Whitney (indicado en cada figura), considerando en todos los casos diferencias estadísticamente significativas para valores de $p < 0,05$. Los análisis fueron realizados con el programa IBM® SPSS® Statistics v.21.



VII. Bibliografía

A

Aarvak, T., Chabaud, M., Miossec, P., Natvig, J.B., 1999. IL-17 is produced by some proinflammatory Th1/Th0 cells but not by Th2 cells. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 162, 1246-1251.

Acosta-Rodriguez, E.V., Napolitani, G., Lanzavecchia, A., Sallusto, F., 2007. Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nat Immunol* 8, 942-949.

Adorini, L., Aloisi, F., Galbiati, F., Gately, M.K., Gregori, S., Penna, G., Ria, F., Smiroldo, S., Trembleau, S., 1997. Targeting IL-12, the key cytokine driving Th1-mediated autoimmune diseases. *Chem Immunol* 68, 175-197.

Akache, B., Grimm, D., Pandey, K., Yant, S.R., Xu, H., Kay, M.A., 2006. The 37/67-kilodalton laminin receptor is a receptor for adeno-associated virus serotypes 8, 2, 3, and 9. *Journal of virology* 80, 9831-9836.

Alex, P., Zchos, N.C., Nguyen, T., Gonzales, L., Chen, T.E., Conklin, L.S., Centola, M., Li, X., 2009. Distinct cytokine patterns identified from multiplex profiles of murine DSS and TNBS-induced colitis. *Inflammatory bowel diseases* 15, 341-352.

Alisky, J.M., Hughes, S.M., Sauter, S.L., Jolly, D., Dubensky, T.W., Jr., Staber, P.D., Chiorini, J.A., Davidson, B.L., 2000. Transduction of murine cerebellar neurons with recombinant FIV and AAV5 vectors. *Neuroreport* 11, 2669-2673.

Allen, J.M., Halbert, C.L., Miller, A.D., 2000. Improved adeno-associated virus vector production with transfection of a single helper adenovirus gene, E4orf6. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 1, 88-95.

Álvarez-Cermeño, J.C., Arroyo, R., Arbizu, T., de Andrés, C., Blasco, R., Casanova, B.,

Coret, F., Fernández, O., García-Merino, A., Hernández, M.A., Izquierdo, G., Matías-Guiu, J., Prieto, J.M., Rodríguez-Antigüedad, A., 2007. Guía oficial para el diagnóstico y tratamiento de la Esclerosis Múltiple. Grupo de Enfermedades Desmielinizantes de la Sociedad Española de Neurología. Prous Science, S.A.

Ambrosi, A., Espinosa, A., Wahren-Herlenius, M., 2012. IL-17: a new actor in IFN-driven systemic autoimmune diseases. *Eur J Immunol* 42, 2274-2284.

Anthony, R.M., Rutitzky, L.I., Urban, J.F., Jr., Stadecker, M.J., Gause, W.C., 2007. Protective immune mechanisms in helminth infection. *Nat Rev Immunol* 7, 975-987.

Arcasoy, S.M., Latoche, J.D., Gondor, M., Pitt, B.R., Pilewski, J.M., 1997. Polycations increase the efficiency of adenovirus-mediated gene transfer to epithelial and endothelial cells in vitro. *Gene therapy* 4, 32-38.

Arnason, B.G., 1996. Interferon beta in multiple sclerosis. *Clinical immunology and immunopathology* 81, 1-11.

Atchison, R.W., Casto, B.C., Hammon, W.M., 1965. ADENOVIRUS-ASSOCIATED DEFECTIVE VIRUS PARTICLES. *Science (New York, N.Y.)* 149, 754-756.

B

Banyai, K., Martella, V., Meleg, E., Kisfali, P., Peterfi, Z., Benko, M., Melegh, B., Szucs, G., 2009. Searching for HAdV-52, the putative gastroenteritis-associated human adenovirus serotype in Southern Hungary. *The new microbiologica* 32, 185-188.

Bartlett, J.S., Wilcher, R., Samulski, R.J., 2000. Infectious entry pathway of adeno-associated virus and adeno-associated virus vectors. *Journal of virology* 74, 2777-2785.

Baxter, A.G., 2007. The origin and application of experimental autoimmune

- encephalomyelitis. *Nature reviews. Immunology* 7, 904-912.
- Becher, B., Segal, B.M., 2011. T(H)17 cytokines in autoimmune neuro-inflammation. *Current opinion in immunology* 23, 707-712.
- Benko, M., Harrach, B., 2003. Molecular evolution of adenoviruses. *Current topics in microbiology and immunology* 272, 3-35.
- Bergelson, J.M., Cunningham, J.A., Droguett, G., Kurt-Jones, E.A., Krithivas, A., Hong, J.S., Horwitz, M.S., Crowell, R.L., Finberg, R.W., 1997. Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science (New York, N.Y.)* 275, 1320-1323.
- Bessis, N., GarciaCozar, F.J., Boissier, M.C., 2004. Immune responses to gene therapy vectors: influence on vector function and effector mechanisms. *Gene therapy* 11 Suppl 1, S10-17.
- Bettelli, E., Carrier, Y., Gao, W., Korn, T., Strom, T.B., Oukka, M., Weiner, H.L., Kuchroo, V.K., 2006. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 441, 235-238.
- Bettelli, E., Korn, T., Kuchroo, V.K., 2007. Th17: the third member of the effector T cell trilogy. *Curr opin immunol* 19, 652-657.
- Billiau, A., Heremans, H., Vandekerckhove, F., Dijkmans, R., Sobis, H., Meulepas, E., Carton, H., 1988. Enhancement of experimental allergic encephalomyelitis in mice by antibodies against IFN-gamma. *Journal of immunology* 140, 1506-1510.
- Blumberg, R.S., Saubermann, L.J., Strober, W., 1999. Animal models of mucosal inflammation and their relation to human inflammatory bowel disease. *Curr Opin Immunol* 11, 648-656.
- Bouma, G., Strober, W., 2003. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol* 3, 521-533.
- Bradley, R.R., Lynch, D.M., Iampietro, M.J., Borducchi, E.N., Barouch, D.H., 2012. Adenovirus serotype 5 neutralizing antibodies target both hexon and fiber following vaccination and natural infection. *Journal of virology* 86, 625-629.
- Brodkey, M.B., Ben-Zacharia, A.B., Reardon, J.D., 2011. Living well with multiple sclerosis, *Am J Nurs*, 2011/06/29 ed, pp. 40-48; quiz 49-50.
- Broekman, M.L., Comer, L.A., Hyman, B.T., Sena-Esteves, M., 2006. Adeno-associated virus vectors serotyped with AAV8 capsid are more efficient than AAV-1 or -2 serotypes for widespread gene delivery to the neonatal mouse brain. *Neuroscience* 138, 501-510.
- Brok, H.P., van Meurs, M., Blezer, E., Schantz, A., Peritt, D., Treacy, G., Laman, J.D., Bauer, J., 't Hart, B.A., 2002. Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis in common marmosets using an anti-IL-12p40 monoclonal antibody. *Journal of Immunology* 169, 6554-6563.
- Brown, P.O., Bowerman, B., Varmus, H.E., Bishop, J.M., 1989. Retroviral integration: structure of the initial covalent product and its precursor, and a role for the viral IN protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86, 2525-2529.
- Burger, C., Gorbatyuk, O.S., Velardo, M.J., Peden, C.S., Williams, P., Zolotukhin, S., Reier, P.J., Mandel, R.J., Muzyczka, N., 2004. Recombinant AAV viral vectors pseudotyped with viral capsids from serotypes 1, 2, and 5 display differential efficiency and cell tropism after delivery to different regions of the central nervous system. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 10, 302-317.

Button, T., Coles, A.J., 2010. Alemtuzumab for the Treatment of Multiple Sclerosis. *Future Neurology* 5, 177-188.

C

Cassinotti, P., Weitzand, M., Tratschin, J.D., 1988. Organization of the adeno-associated virus (AAV) capsid gene: mapping of a minor spliced mRNA coding for virus capsid protein. *Virology* 167, 176-184.

Cattaneo, C., Almici, C., Borlenghi, E., Motta, M., Rossi, G., 2003. A case of acute promyelocytic leukaemia following mitoxantrone treatment of multiple sclerosis. *Leukemia* 17, 985-986.

Chackerian, A.A., Chen, S.J., Brodie, S.J., Mattson, J.D., McClanahan, T.K., Kastelein, R.A., Bowman, E.P., 2006. Neutralization or absence of the interleukin-23 pathway does not compromise immunity to mycobacterial infection. *Infect Immun* 74, 6092-6099.

Chao, H., Liu, Y., Rabinowitz, J., Li, C., Samulski, R.J., Walsh, C.E., 2000. Several log increase in therapeutic transgene delivery by distinct adeno-associated viral serotype vectors. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 2, 619-623.

Chatterjee, P.K., Vayda, M.E., Flint, S.J., 1985. Interactions among the three adenovirus core proteins. *Journal of virology* 55, 379-386.

Chaudhuri, A., 2006. Lessons for clinical trials from natalizumab in multiple sclerosis. *BMJ (Clinical research ed.)* 332, 416-419.

Chen, Y., Langrish, C.L., McKenzie, B., Joyce-Shaikh, B., Stumhofer, J.S., McClanahan, T., Blumenschein, W., Churakova, T., Low, J., Presta, L., Hunter, C.A., Kastelein, R.A., Cua, D.J., 2006. Anti-IL-23 therapy inhibits multiple inflammatory pathways and ameliorates

autoimmune encephalomyelitis. *J Clin Invest* 116, 1317-1326.

Cheng, H., Wolfe, S.H., Valencia, V., Qian, K., Shen, L., Phillips, M.I., Chang, L.J., Zhang, Y.C., 2007. Efficient and persistent transduction of exocrine and endocrine pancreas by adeno-associated virus type 8. *Journal of biomedical science* 14, 585-594.

Cheung, A.K., Hoggan, M.D., Hauswirth, W.W., Berns, K.I., 1980. Integration of the adeno-associated virus genome into cellular DNA in latently infected human Detroit 6 cells. *Journal of virology* 33, 739-748.

Chirmule, N., Xiao, W., Truneh, A., Schnell, M., Hughes, J., Zoltick, P., Wilson, J., 2000. Humoral immunity to adeno-associated virus type 2 vectors following administration to murine and nonhuman primate muscle. *Journal of virology* 74, 2420-2425.

Cingoz, O., 2009. Ustekinumab. *MAbs* 1, 216-21.

Codarri, L., Gyulveszi, G., Tosevski, V., Hesske, L., Fontana, A., Magnenat, L., Suter, T., Becher, B., 2011. RORgammat drives production of the cytokine GM-CSF in helper T cells, which is essential for the effector phase of autoimmune neuroinflammation. *Nat Immunol* 12, 560-567.

Coffman, R.L., Carty, J., 1986. A T cell activity that enhances polyclonal IgE production and its inhibition by interferon-gamma. *J Immunol* 136, 949-954.

Constantinescu, C.S., Farooqi, N., O'Brien, K., Gran, B., 2011. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). *British journal of pharmacology* 164, 1079-1106.

Coura Rdos, S., Nardi, N.B., 2007. The state of the art of adeno-associated virus-based vectors in gene therapy. *Virology journal* 4, 99.

Couzin-Frankel, J., 2009. Genetics. The promise of a cure: 20 years and counting. *Science (New York, N.Y.)* 324, 1504-1507.

Cripe, T.P., Dunphy, E.J., Holub, A.D., Saini, A., Vasi, N.H., Mahller, Y.Y., Collins, M.H., Snyder, J.D., Krasnykh, V., Curiel, D.T., Wickham, T.J., DeGregori, J., Bergelson, J.M., Currier, M.A., 2001. Fiber knob modifications overcome low, heterogeneous expression of the coxsackievirus-adenovirus receptor that limits adenovirus gene transfer and oncolysis for human rhabdomyosarcoma cells. *Cancer research* 61, 2953-2960.

Croxford, A.L., Mair, F., Becher, B., 2012. IL-23: one cytokine in control of autoimmunity. *Eur J Immunol* 42, 2263-2273.

Cua, D.J., Sherlock, J., Chen, Y., Murphy, C.A., Joyce, B., Seymour, B., Lucian, L., To, W., Kwan, S., Churakova, T., Zurawski, S., Wiekowski, M., Lira, S.A., Gorman, D., Kastelein, R.A., Sedgwick, J.D., 2003. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature* 421, 744-748.

Cunliffe, N.A., Booth, J.A., Elliot, C., Lowe, S.J., Sopwith, W., Kitchin, N., Nakagomi, O., Nakagomi, T., Hart, C.A., Regan, M., 2010. Healthcare-associated viral gastroenteritis among children in a large pediatric hospital, United Kingdom. *Emerging infectious diseases* 16, 55-62.

D

Davidson, B.L., Stein, C.S., Heth, J.A., Martins, I., Kotin, R.M., Derksen, T.A., Zabner, J., Ghodsi, A., Chiorini, J.A., 2000. Recombinant adeno-associated virus type 2, 4, and 5 vectors: transduction of variant cell types and regions in the mammalian central nervous system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 3428-3432.

Davis, H.E., Rosinski, M., Morgan, J.R., Yarmush, M.L., 2004. Charged polymers modulate retrovirus transduction via membrane charge neutralization and virus aggregation. *Biophysical journal* 86, 1234-1242.

Davison, A.J., Benko, M., Harrach, B., 2003. Genetic content and evolution of adenoviruses. *The Journal of general virology* 84, 2895-2908.

De Jong, J.C., Wermenbol, A.G., Verweij-Uijterwaal, M.W., Slaterus, K.W., Wertheim-Van Dillen, P., Van Doornum, G.J., Khoo, S.H., Hierholzer, J.C., 1999. Adenoviruses from human immunodeficiency virus-infected individuals, including two strains that represent new candidate serotypes Ad50 and Ad51 of species B1 and D, respectively. *Journal of clinical microbiology* 37, 3940-3945.

Dean, G., 1967. Annual incidence, prevalence, and mortality of multiple sclerosis in white South-African-born and in white immigrants to South Africa. *Br Med J* 2, 724-730.

Diaz-Olavarrieta, C., Cummings, J.L., Velazquez, J., Garcia de la Cadena, C., 1999. Neuropsychiatric manifestations of multiple sclerosis. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 11, 51-57.

Domingues, H.S., Mues, M., Lassmann, H., Wekerle, H., Krishnamoorthy, G., 2010. Functional and pathogenic differences of Th1 and Th17 cells in experimental autoimmune encephalomyelitis. *PLoS One* 5, e15531.

Dong, B., Nakai, H., Xiao, W., 2010. Characterization of genome integrity for oversized recombinant AAV vector. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 18, 87-92.

Dong, C., 2011. Genetic controls of Th17 cell differentiation and plasticity. *Exp Mol Med* 43, 1-6.

Dong, J.Y., Fan, P.D., Frizzell, R.A., 1996. Quantitative analysis of the packaging capacity of recombinant adeno-associated virus. *Human gene therapy* 7, 2101-2112.

Druet, P., Sheela, R., Pelletier, L., 1995. Th1 and Th2 cells in autoimmunity. *Clin Exp Immunol* 101 Suppl 1, 9-12.

Duan, D., Sharma, P., Yang, J., Yue, Y., Dudus, L., Zhang, Y., Fisher, K.J., Engelhardt, J.F., 1998. Circular intermediates of recombinant adeno-associated virus have defined structural characteristics responsible for long-term episomal persistence in muscle tissue. *Journal of virology* 72, 8568-8577.

Duerr, R.H., Taylor, K.D., Brant, S.R., Rioux, J.D., Silverberg, M.S., Daly, M.J., Steinhart, A.H., Abraham, C., Regueiro, M., Griffiths, A., Dassopoulos, T., Bitton, A., Yang, H., Targan, S., Datta, L.W., Kistner, E.O., Schumm, L.P., Lee, A.T., Gregersen, P.K., Barmada, M.M., Rotter, J.I., Nicolae, D.L., Cho, J.H., 2006. A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science (New York, N.Y.)* 314, 1461-1463.

Dumasius, V., Jameel, M., Burhop, J., Meng, F.J., Welch, L.C., Mutlu, G. G.M., Factor, P., 2003. In vivo timing of onset of transgene expression following adenoviral-mediated gene transfer. *Virology* 308, 243-249.

Duque, S., Joussemet, B., Riviere, C., Marais, T., Dubreil, L., Douar, A.M., Fyfe, J., Moullier, P., Colle, M.A., Barkats, M., 2009. Intravenous administration of self-complementary AAV9 enables transgene delivery to adult motor neurons. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 17, 1187-1196.

E

Ebers, G.C., 2008. Environmental factors and multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 7, 268-277.

Edelstein, M.L., Abedi, M.R., Wixon, J., 2007. Gene therapy clinical trials worldwide to 2007--an update. *The journal of gene medicine* 9, 833-842.

El-Behi, M., Ciric, B., Dai, H., Yan, Y., Cullimore, M., Safavi, F., Zhang, G.X., Dittel, B.N., Rostami, A., 2011. The encephalitogenicity of T(H)17 cells is dependent on IL-1- and IL-23-induced production of the cytokine GM-CSF. *Nat Immunol* 12, 568-575.

Eslami, M.H., Gangadharan, S.P., Sui, X., Rhyhart, K.K., Snyder, R.O., Conte, M.S., 2000. Gene delivery to in situ veins: differential effects of adenovirus and adeno-associated viral vectors. *Journal of Vascular Surgery* 31, 1149-1159.

Everitt, E., Sundquist, B., Pettersson, U., Philipson, L., 1973. Structural proteins of adenoviruses. X. Isolation and topography of low molecular weight antigens from the virion of adenovirus type 2. *Virology* 52, 130-147.

F

Farlow, S.J., Jerusalmi, A., Sano, T., 2007. Enhanced transduction of colonic cell lines in vitro and the inflamed colon in mice by viral vectors, derived from adeno-associated virus serotype 2, using virus-microbead conjugates bearing lectin. *BMC Biotechnol* 28, 7-83.

FDA. Drug Safety Communication: New risk factor for Progressive Multifocal Leukoencephalopathy (PML) associated with Tysabri (natalizumab). [consultado 25-03-2014]. Disponible en: <http://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/ucm288186.htm>.

Feinstein, A., Roy, P., Lobaugh, N., Feinstein, K., O'Connor, P., Black, S., 2004. Structural brain abnormalities in multiple sclerosis patients with major depression. *Neurology* 62, 586-590.

Ferber, I.A., Brocke, S., Taylor-Edwards, C., Ridgway, W., Dinisco, C., Steinman, L., Dalton, D., Fathman, C.G., 1996. Mice with a disrupted IFN-gamma gene are susceptible to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *Journal of immunology* 156, 5-7.

Ferrari, F.K., Samulski, T., Shenk, T., Samulski, R.J., 1996. Second-strand synthesis is a rate-limiting step for efficient transduction by recombinant adeno-associated virus vectors. *Journal of virology* 70, 3227-3234.

Foreman, P.K., Wainwright, M.J., Alicke, B., Kovesdi, I., Wickham, T.J., Smith, J.G., Meier-Davis, S., Fix, J.A., Daddona, P., Gardner, P., Huang, M.T., 1998. Adenovirus-mediated transduction of intestinal cells in vivo. *Human gene therapy* 9, 1313-1321.

Foust, K.D., Kaspar, B.K., 2009. Over the barrier and through the blood: to CNS delivery we go. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 8, 4017-4018.

Foust, K.D., Nurre, E., Montgomery, C.L., Hernandez, A., Chan, C.M., Kaspar, B.K., 2009. Intravascular AAV9 preferentially targets neonatal neurons and adult astrocytes. *Nature biotechnology* 27, 59-65.

Friedmann, T., Roblin, R., 1972. Gene therapy for human genetic disease? *Science (New York, N.Y.)* 175, 949-955.

G

Gaffen, S.L., 2008. An overview of IL-17 function and signaling. *Cytokine* 43, 402-407.

Gajewski, T.F., Schell, S.R., Nau, G., Fitch, F.W., 1989. Regulation of T-cell activation: differences among T-cell subsets. *Immunol Rev* 111, 79-110.

Gall, J., Kass-Eisler, A., Leinwand, L., Falck-Pedersen, E., 1996. Adenovirus type 5 and 7 capsid chimera: fiber replacement alters receptor tropism without affecting primary immune neutralization epitopes. *Journal of virology* 70, 2116-2123.

Georg-Fries, B., Biederlack, S., Wolf, J., zur Hausen, H., 1984. Analysis of proteins, helper dependence, and seroepidemiology of a new human parvovirus. *Virology* 134, 64-71.

Ghalie, R.G., Edan, G., Laurent, M., Mauch, E., Eisenman, S., Hartung, H.P., Gonsette, R.E., Butine, M.D., Goodkin, D.E., 2002. Cardiac adverse effects associated with mitoxantrone (Novantrone) therapy in patients with MS. *Neurology* 59, 909-913.

Ghoreschi, K., Laurence, A., Yang, X.P., Tato, C.M., McGeachy, M.J., Konkel, J.E., Ramos, H.L., Wei, L., Davidson, T.S., Bouladoux, N., Grainger, J.R., Chen, Q., Kanno, Y., Watford, W.T., Sun, H.W., Eberl, G., Shevach, E.M., Belkaid, Y., Cua, D.J., Chen, W., O'Shea, J.J., 2010. Generation of pathogenic T(H)17 cells in the absence of TGF-beta signalling. *Nature* 467, 967-971.

Ginn, S.L., Alexander, I.E., Edelstein, M.L., Abedi, M.R., Wixon, J., 2013. Gene therapy clinical trials worldwide to 2012 - an update. *The journal of gene medicine* 15, 65-77.

Gray, S.J., Matagne, V., Bachaboina, L., Yadav, S., Ojeda, S.R., Samulski, R.J., 2011. Preclinical differences of intravascular AAV9 delivery to neurons and glia: a comparative study of adult mice and nonhuman primates. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 19, 1058-1069.

Grieger, J.C., Johnson, J.S., Gurda-Whitaker, B., Agbandje-McKenna, M.,

Samulski, R.J., 2007. Surface-exposed adeno-associated virus Vp1-NLS capsid fusion protein rescues infectivity of noninfectious wild-type Vp2/Vp3 and Vp3-only capsids but not that of fivefold pore mutant virions. *Journal of virology* 81, 7833-7843.

H

Halbert, C.L., Lam S.L., Miller, A.D., 2007. High-dependent transduction by adeno-associated virus type 6 vectors in mouse lung. *Human gene therapy* 18, 344-54.

Happel, K.I., Dubin, P.J., Zheng, M., Ghilardi, N., Lockhart, C., Quinton, L.J., Odden, A.R., Shellito, J.E., Bagby, G.J., Nelson, S., Kolls, J.K., 2005. Divergent roles of IL-23 and IL-12 in host defense against *Klebsiella pneumoniae*. *J Exp Med* 202, 761-769.

Happel, K.I., Zheng, M., Young, E., Quinton, L.J., Lockhart, E., Ramsay, A.J., Shellito, J.E., Schurr, J.R., Bagby, G.J., Nelson, S., Kolls, J.K., 2003. Cutting edge: roles of Toll-like receptor 4 and IL-23 in IL-17 expression in response to *Klebsiella pneumoniae* infection. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 170, 4432-4436.

Harrington, L.E., Hatton, R.D., Mangan, P.R., Turner, H., Murphy, T.L., Murphy, K.M., Weaver, C.T., 2005. Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* 6, 1123-1132.

Hauck, B., Xiao, W., 2003. Characterization of tissue tropism determinants of adeno-associated virus type 1. *Journal of virology* 77, 2768-2774.

Hausleiter, I.S., Brune, M., Juckel, G., 2009. Psychopathology in multiple sclerosis: diagnosis, prevalence and treatment. *Ther Adv Neurol Disord* 2, 13-29.

Hearing, P., Samulski, R.J., Wishart, W.L., Shenk, T., 1987. Identification of a

repeated sequence element required for efficient encapsidation of the adenovirus type 5 chromosome. *Journal of virology* 61, 2555-2558.

Heesen, C., Bruegmann, M., Gbdamosi, J., Koch, E., Monch, A., Buhmann, C., 2003. Therapy-related acute myelogenous leukaemia (t-AML) in a patient with multiple sclerosis treated with mitoxantrone. *Multiple sclerosis* (Houndmills, Basingstoke, England) 9, 213-214.

Hemmi, S., Geertsen, R., Mezzacasa, A., Peter, I., Dummer, R., 1998. The presence of human coxsackievirus and adenovirus receptor is associated with efficient adenovirus-mediated transgene expression in human melanoma cell cultures. *Human gene therapy* 9, 2363-2373.

Henry, L.J., Xia, D., Wilke, M.E., Deisenhofer, J., Gerard, R.D., 1994. Characterization of the knob domain of the adenovirus type 5 fiber protein expressed in *Escherichia coli*. *Journal of virology* 68, 5239-5246.

Heremans, H., Dillen, C., Groenen, M., Martens, E., Billiau, A., 1996. Chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis (CREAE) in mice: enhancement by monoclonal antibodies against interferon-gamma. *European journal of immunology* 26, 2393-2398.

Hirsch, M.L., Agbandje-McKenna, M., Samulski, R.J., 2010. Little vector, big gene transduction: fragmented genome reassembly of adeno-associated virus. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 18, 6-8.

Horga, A., Tintore, M., 2011. Natalizumab for relapsing-remitting multiple sclerosis. *Neurologia* (Barcelona, Spain) 26, 357-368.

Huang, W., Na, L., Fidel, P.L., Schwarzenberger, P., 2004. Requirement of interleukin-17A for systemic anti-Candida

albicans host defense in mice. *J Infect Dis* 190, 624-631.

Hugot, J.P., Chamailard, M., Zouali, H., Lesage, S., Cezard, J.P., Belaiche, J., Almer, S., Tysk, C., O'Morain, C.A., Gassull, M., Binder, V., Finkel, Y., Cortot, A., Modigliani, R., Laurent-Puig, P., Gower-Rousseau, C., Macry, J., Colombel, J.F., Sahbatou, M., Thomas, G., 2001. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 411, 599-603.

I

Im, D.S., Muzyczka, N., 1990. The AAV origin binding protein Rep68 is an ATP-dependent site-specific endonuclease with DNA helicase activity. *Cell* 61, 447-457.

Im, D.S., Muzyczka, N., 1992. Partial purification of adeno-associated virus Rep78, Rep52, and Rep40 and their biochemical characterization. *Journal of virology* 66, 1119-1128.

Infante-Duarte, C., Horton, H.F., Byrne, M.C., Kamradt, T., 2000. Microbial lipopeptides induce the production of IL-17 in Th cells. *J Immunol* 165, 6107-6115.

Ivanov, I.I., Zhou, L., Littman, D.R., 2007. Transcriptional regulation of Th17 cell differentiation. *Semin Immunol* 19, 409-417.

J

Jacobsen, F., Hirsch, T., Mittler, D., Schulte, M., Lehnhardt, M., Druelcke, D., Homann, H.H., Steinau, H.U., Steinstraesser, L., 2006. Polybrene improves transfection efficacy of recombinant replication-deficient adenovirus in cutaneous cells and burned skin. *Journal of gene medicine* 8, 138-146.

Jimenez, V., Ayuso, E., Mallol, C., Agudo, J., Casellas, A., Obach, M., Munoz, S., Salavert, A., Bosch, F., 2011. In vivo genetic engineering of murine pancreatic beta cells mediated by single-stranded adeno-

associated viral vectors of serotypes 6, 8 and 9. *Diabetologia* 54, 1075-1086.

Johnson, J.S., Samulski, R.J., 2009. Enhancement of adeno-associated virus infection by mobilizing capsids into and out of the nucleolus. *Journal of virology* 83, 2632-2644.

Jones, L.S., Rizzo, L.V., Agarwal, R.K., Tarrant, T.K., Chan, C.C., Wiggert, B., Caspi, R.R., 1997. IFN-gamma-deficient mice develop experimental autoimmune uveitis in the context of a deviant effector response. *Journal of Immunology* 158, 5997-6005.

Jones, M.S., 2nd, Harrach, B., Ganac, R.D., Gozum, M.M., Dela Cruz, W.P., Riedel, B., Pan, C., Delwart, E.L., Schnurr, D.P., 2007. New adenovirus species found in a patient presenting with gastroenteritis. *Journal of virology* 81, 5978-5984.

Jones, S.A., 2005. Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 175, 3463-3468.

K

Kaludov, N., Brown, K.E., Walters, R.W., Zabner, J., Chiorini, J.A., 2001. Adeno-associated virus serotype 4 (AAV4) and AAV5 both require sialic acid binding for hemagglutination and efficient transduction but differ in sialic acid linkage specificity. *Journal of virology* 75, 6884-6893.

Kaludov, N., Padron, E., Govindasamy, L., McKenna, R., Chiorini, J.A., Agbandje-McKenna, M., 2003. Production, purification and preliminary X-ray crystallographic studies of adeno-associated virus serotype 4. *Virology* 306, 1-6.

Kaner, R.J., Worgall, S., Leopold, P.L., Stolze, E., Milano, E., Hidaka, C., Ramalingam, R., Hackett, N.R., Singh, R., Bergelson, J., Finberg, R., Falck-Pedersen,

- E., Crystal, R.G., 1999. Modification of the genetic program of human alveolar macrophages by adenovirus vectors in vitro is feasible but inefficient, limited in part by the low level of expression of the coxsackie/adenovirus receptor. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 20, 361-370.
- Kanwar, J.R., Kamalapuram, S.K., Kanwar, R.K., 2011. Targeting survivin in cancer: the cell-signalling perspective. *Drug discovery today* 16, 485-494.
- Kaplan, J.M., Pennington, S.E., St George, J.A., Woodworth, L.A., Fasbender, A., Marshall, J., Cheng, S.H., Wadsworth, S.C., Gregory, R.J., Smith, A.E., 1998. Potentiation of gene transfer to the mouse lung by complexes of adenovirus vector and polycations improves therapeutic potential. *Human Gene Therapy* 9, 1469-1479.
- Kaplitt, M.G., Leone, P., Samulski, R.J., Xiao, X., Pfaff, D.W., O'Malley, K.L., During, M.J., 1994. Long-term gene expression and phenotypic correction using adeno-associated virus vectors in the mammalian brain. *Nature genetics* 8, 148-154.
- Katsikis, P.D., Chu, C.Q., Brennan, F.M., Maini, R.N., Feldmann, M., 1994. Immunoregulatory role of interleukin 10 in rheumatoid arthritis. *J Exp Med* 179, 1517-1527.
- Kebir, H., Kreymborg, K., Ifergan, I., Dodelet-Devillers, A., Cayrol, R., Bernard, M., Giuliani, F., Arbour, N., Becher, B., Prat, A., 2007. Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nat Med* 13, 1173-1175.
- Khader, S.A., Bell, G.K., Pearl, J.E., Fountain, J.J., Rangel-Moreno, J., Cilley, G.E., Shen, F., Eaton, S.M., Gaffen, S.L., Swain, S.L., Locksley, R.M., Haynes, L., Randall, T.D., Cooper, A.M., 2007. IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4+ T cell responses after vaccination and during *Mycobacterium tuberculosis* challenge. *Nat Immunol* 8, 369-377.
- Khader, S.A., Pearl, J.E., Sakamoto, K., Gilmartin, L., Bell, G.K., Jelley-Gibbs, D.M., Ghilardi, N., deSavauge, F., Cooper, A.M., 2005. IL-23 compensates for the absence of IL-12p70 and is essential for the IL-17 response during tuberculosis but is dispensable for protection and antigen-specific IFN-gamma responses if IL-12p70 is available. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 175, 788-795.
- Kim, Y.S., Lee, M.H., Ju, A.S., Rhee, K.J., 2011. Th17 responses are not induced in dextran sodium sulfate model of acute colitis. *Immune network* 11, 416-419.
- King, J.A., Dubielzig, R., Grimm, D., Kleinschmidt, J.A., 2001. DNA helicase-mediated packaging of adeno-associated virus type 2 genomes into preformed capsids. *The EMBO journal* 20, 3282-3291.
- Klein, R.L., Muir, D., King, M.A., Peel, A.L., Zolotukhin, S., Moller, J.C., Kruttgen, A., Heymach, J.V., Jr., Muzyczka, N., Meyer, E.M., 1999. Long-term actions of vector-derived nerve growth factor or brain-derived neurotrophic factor on choline acetyltransferase and Trk receptor levels in the adult rat basal forebrain. *Neuroscience* 90, 815-821.
- Kleinschmidt-DeMasters, B.K., Tyler, K.L., 2005. Progressive multifocal leukoencephalopathy complicating treatment with natalizumab and interferon beta-1a for multiple sclerosis. *The New England journal of medicine* 353, 369-374.
- Kojoaghlanian, T., Flomenberg, P., Horwitz, M.S., 2003. The impact of adenovirus infection on the immunocompromised host. *Reviews in medical virology* 13, 155-171.
- Komiyama, Y., Nakae, S., Matsuki, T., Nambu, A., Ishigame, H., Kakuta, S., Sudo, K., Iwakura, Y., 2006. IL-17 plays an important role in the development of

experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 177, 566-573.

Korn, T., Bettelli, E., Gao, W., Awasthi, A., Jager, A., Strom, T.B., Oukka, M., Kuchroo, V.K., 2007. IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells. *Nature* 448, 484-487.

Korn, T., Bettelli, E., Oukka, M., Kuchroo, V.K., 2009. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol* 27, 485-517.

Kotin, R.M., Siniscalco, M., Samulski, R.J., Zhu, X.D., Hunter, L., Laughlin, C.A., McLaughlin, S., Muzyczka, N., Rocchi, M., Berns, K.I., 1990. Site-specific integration by adeno-associated virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87, 2211-2215.

Krasnykh, V., Dmitriev, I., Navarro, J.G., Belousova, N., Kashentseva, E., Xiang, J., Douglas, J.T., Curiel, D.T., 2000. Advanced generation adenoviral vectors possess augmented gene transfer efficiency based upon coxsackie adenovirus receptor-independent cellular entry capacity. *Cancer research* 60, 6784-6787.

Krasnykh, V.N., Mikheeva, G.V., Douglas, J.T., Curiel, D.T., 1996. Generation of recombinant adenovirus vectors with modified fibers for altering viral tropism. *Journal of virology* 70, 6839-6846.

Kronenberg, S., Kleinschmidt, J.A., Bottcher, B., 2001. Electron cryo-microscopy and image reconstruction of adeno-associated virus type 2 empty capsids. *EMBO reports* 2, 997-1002.

Kurth, E.G., Peremyslov, V.V., Prokhnovsky, A.I., Kasschau, K.D., Miller, M., Carrington, J.C., Dolja, V.V., 2012. Virus-derived gene expression and RNA interference vector for grapevine. *Journal of virology* 86, 6002-6009.

L

Lai, Y., Yue, Y., Duan, D., 2010. Evidence for the failure of adeno-associated virus serotype 5 to package a viral genome > or = 8.2 kb. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 18, 75-79.

Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M.C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., Funke, R., Gage, D., Harris, K., Heaford, A., Howland, J., Kann, L., Lehoczky, J., LeVine, R., McEwan, P., McKernan, K., Meldrim, J., Mesirov, J.P., Miranda, C., Morris, W., Naylor, J., Raymond, C., Rosetti, M., Santos, R., Sheridan, A., Sougnez, C., Stange-Thomann, N., Stojanovic, N., Subramanian, A., Wyman, D., Rogers, J., Sulston, J., Ainscough, R., Beck, S., Bentley, D., Burton, J., Clee, C., Carter, N., Coulson, A., Deadman, R., Deloukas, P., Dunham, A., Dunham, I., Durbin, R., French, L., Grafham, D., Gregory, S., Hubbard, T., Humphray, S., Hunt, A., Jones, M., Lloyd, C., McMurray, A., Matthews, L., Mercer, S., Milne, S., Mullikin, J.C., Mungall, A., Plumb, R., Ross, M., Shownkeen, R., Sims, S., Waterston, R.H., Wilson, R.K., Hillier, L.W., McPherson, J.D., Marra, M.A., Mardis, E.R., Fulton, L.A., Chinwalla, A.T., Pepin, K.H., Gish, W.R., Chissole, S.L., Wendl, M.C., Delehaunty, K.D., Miner, T.L., Delehaunty, A., Kramer, J.B., Cook, L.L., Fulton, R.S., Johnson, D.L., Minx, P.J., Clifton, S.W., Hawkins, T., Branscomb, E., Predki, P., Richardson, P., Wenning, S., Slezak, T., Doggett, N., Cheng, J.F., Olsen, A., Lucas, S., Elkin, C., Uberbacher, E., Frazier, M., Gibbs, R.A., Muzny, D.M., Scherer, S.E., Bouck, J.B., Sodergren, E.J., Worley, K.C., Rives, C.M., Gorrell, J.H., Metzker, M.L., Naylor, S.L., Kucherlapati, R.S., Nelson, D.L., Weinstock, G.M., Sakaki, Y., Fujiyama, A., Hattori, M., Yada, T., Toyoda, A., Itoh, T., Kawagoe, C., Watanabe, H., Totoki, Y., Taylor, T., Weissbach, J., Heilig, R., Saurin, W., Artiguenave, F., Brottier, P., Bruls, T., Pelletier, E., Robert, C., Wincker, P., Smith, D.R., Doucette-Stamm, L., Rubenfield, M., Weinstock, K., Lee, H.M., Dubois, J.,

- Rosenthal, A., Platzer, M., Nyakatura, G., Taudien, S., Rump, A., Yang, H., Yu, J., Wang, J., Huang, G., Gu, J., Hood, L., Rowen, L., Madan, A., Qin, S., Davis, R.W., Federspiel, N.A., Abola, A.P., Proctor, M.J., Myers, R.M., Schmutz, J., Dickson, M., Grimwood, J., Cox, D.R., Olson, M.V., Kaul, R., Raymond, C., Shimizu, N., Kawasaki, K., Minoshima, S., Evans, G.A., Athanasiou, M., Schultz, R., Roe, B.A., Chen, F., Pan, H., Ramser, J., Lehrach, H., Reinhardt, R., McCombie, W.R., de la Bastide, M., Dedhia, N., Blocker, H., Hornischer, K., Nordsiek, G., Agarwala, R., Aravind, L., Bailey, J.A., Bateman, A., Batzoglu, S., Birney, E., Bork, P., Brown, D.G., Burge, C.B., Cerutti, L., Chen, H.C., Church, D., Clamp, M., Copley, R.R., Doerks, T., Eddy, S.R., Eichler, E.E., Furey, T.S., Galagan, J., Gilbert, J.G., Harmon, C., Hayashizaki, Y., Haussler, D., Hermjakob, H., Hokamp, K., Jang, W., Johnson, L.S., Jones, T.A., Kasif, S., Kasprzyk, A., Kennedy, S., Kent, W.J., Kitts, P., Koonin, E.V., Korf, I., Kulp, D., Lancet, D., Lowe, T.M., McLysaght, A., Mikkelsen, T., Moran, J.V., Mulder, N., Pollara, V.J., Ponting, C.P., Schuler, G., Schultz, J., Slater, G., Smit, A.F., Stupka, E., Szustakowski, J., Thierry-Mieg, D., Thierry-Mieg, J., Wagner, L., Wallis, J., Wheeler, R., Williams, A., Wolf, Y.I., Wolfe, K.H., Yang, S.P., Yeh, R.F., Collins, F., Guyer, M.S., Peterson, J., Felsenfeld, A., Wetterstrand, K.A., Patrinos, A., Morgan, M.J., de Jong, P., Catanese, J.J., Osoegawa, K., Shizuya, H., Choi, S., Chen, Y.J., 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409, 860-921.
- Landy, D.C., Hecht, E.M., 2014. Benefit of additional screening for progressive multifocal leukoencephalopathy in patients with multiple sclerosis taking natalizumab: a decision analysis. *Clin Neuropharmacol* 37, 45-51.
- Langer-Gould, A., Atlas, S.W., Green, A.J., Bollen, A.W., Pelletier, D., 2005. Progressive multifocal leukoencephalopathy in a patient treated with natalizumab. *The New England journal of medicine* 353, 375-381.
- Langowski, J.L., Zhang, X., Wu, L., Mattson, J.D., Chen, T., Smith, K., Basham, B., McClanahan, T., Kastelein, R.A., Oft, M., 2006. IL-23 promotes tumour incidence and growth. *Nature* 442, 461-465.
- Langrish, C.L., Chen, Y., Blumenschein, W.M., Mattson, J., Basham, B., Sedgwick, J.D., McClanahan, T., Kastelein, R.A., Cua, D.J., 2005. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med* 201, 233-240.
- Lassmann, H., 2007. Experimental models of multiple sclerosis. *Rev Neurol* 163, 651-655.
- Lassmann, H., Wisniewski, H.M., 1979. Chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis: clinicopathological comparison with multiple sclerosis. *Archives of neurology* 36, 490-497.
- Lawlor, P.A., Bland, R.J., Mouravlev, A., Young, D., Doring, M.J., 2009. Efficient gene delivery and selective transduction of glial cells in the mammalian brain by AAV serotypes isolated from nonhuman primates. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 17, 1692-1702.
- Lee, J.W., Lee, J.H., Cho, M.R., Kim, G.T., Baek, S.H., Kim, S.I., 2007. Blocking of IL-23 by anti-IL-23R monoclonal antibody decreased synovial expressions of IL-17, IL-1 β , IL-6 and TNF- α in collagen-induced arthritis [abstract]. *Arthritis Rheum* 46, s931.
- Lee, W.W., Kang, S.W., Choi, J., Lee, S.H., Shah, K., Eynon, E.E., Flavell, R.A., Kang, I., 2010. Regulating human Th17 cells via differential expression of IL-1 receptor. *Blood* 115, 530-540.
- Leonard, J.P., Waldburger, K.E., Goldman, S.J., 1995. Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against interleukin 12. *J Exp Med* 181, 381-386.

Li, J., Samulski, R.J., Xiao, X., 1997. Role for highly regulated rep gene expression in adeno-associated virus vector production. *Journal of virology* 71, 5236-5243.

Lieberman, L.A., Cardillo, F., Owyang, A.M., Rennick, D.M., Cua, D.J., Kastelein, R.A., Hunter, C.A., 2004. IL-23 provides a limited mechanism of resistance to acute toxoplasmosis in the absence of IL-12. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 173, 1887-1893.

Lock, C., Hermans, G., Pedotti, R., Brendolan, A., Schadt, E., Garren, H., Langer-Gould, A., Strober, S., Cannella, B., Allard, J., Klonowski, P., Austin, A., Lad, N., Kaminski, N., Galli, S.J., Oksenberg, J.R., Raine, C.S., Heller, R., Steinman, L., 2002. Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis. *Nature medicine* 8, 500-508.

Locksley, R.M., 2008. The Roaring Twenties. *Immunity* 28, 437-439.

Louis, N., Fender, P., Barge, A., Kitts, P., Chroboczek, J., 1994. Cell-binding domain of adenovirus serotype 2 fiber. *Journal of virology* 68, 4104-4106.

Lowes, M.A., Bowcock, A.M., Krueger, J.G., 2007. Pathogenesis and therapy of psoriasis. *Nature* 445, 866-873.

Lozier, J.N., Yankaskas, J.R., Ramsey, W.J., Chen, L., Berschneider, H., Morgan, R.A., 1997. Gut epithelial cells as targets for gene therapy of hemophilia. *Human gene therapy* 8, 1481-1490.

Lublin, F.D., Knobler, R.L., Kalman, B., Goldhaber, M., Marini, J., Perrault, M., D'Imperio, C., Joseph, J., Alkan, S.S., Korngold, R., 1993. Monoclonal anti-gamma interferon antibodies enhance experimental allergic encephalomyelitis. *Autoimmunity* 16, 267-274.

Lublin, F.D., Reingold, S.C., 1996. Defining the clinical course of multiple sclerosis:

results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurology* 46, 907-911.

Lusby, E., Fife, K.H., Berns, K.I., 1980. Nucleotide sequence of the inverted terminal repetition in adeno-associated virus DNA. *Journal of virology* 34, 402-409.

M

Mac Gabhann, F., Annex, B.H., Popel, A.S., 2010. Gene therapy from the perspective of systems biology. *Current opinion in molecular therapeutics* 12, 570-577.

Manel, N., Unutmaz, D., Littman, D.R., 2008. The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor RORgamma. *Nat Immunol* 9, 641-649.

Mangan, P.R., Harrington, L.E., O'Quinn, D.B., Helms, W.S., Bullard, D.C., Elson, C.O., Hatton, R.D., Wahl, S.M., Schoeb, T.R., Weaver, C.T., 2006. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature* 441, 231-234.

Manno, C.S., Pierce, G.F., Arruda, V.R., Glader, B., Ragni, M., Rasko, J.J., Ozelo, M.C., Hoots, K., Blatt, P., Konkle, B., Dake, M., Kaye, R., Razavi, M., Zajko, A., Zehnder, J., Rustagi, P.K., Nakai, H., Chew, A., Leonard, D., Wright, J.F., Lessard, R.R., Sommer, J.M., Tigges, M., Sabatino, D., Luk, A., Jiang, H., Mingozzi, F., Couto, L., Ertl, H.C., High, K.A., Kay, M.A., 2006. Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response. *Nature Medicine* 12, 342-347.

Martin, M.A., Knipe, D.M., Fields, B.N., Howley, P.M., Griffin, D., Lamb, R., 2007. *Fields' virology*. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins. pp. 2395.

- Martinelli, V., Radaelli, M., Straffi, L., Rodegher, M., Comi, G., 2009. Mitoxantrone: benefits and risks in multiple sclerosis patients. *Neurological sciences : official journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology* 30 Suppl 2, S167-170.
- Matusevicius, D., Kivisakk, P., He, B., Kostulas, N., Ozenci, V., Fredrikson, S., Link, H., 1999. Interleukin-17 mRNA expression in blood and CSF mononuclear cells is augmented in multiple sclerosis. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)* 5, 101-104.
- McCarty, D.M., Young, S.M., Jr., Samulski, R.J., 2004. Integration of adeno-associated virus (AAV) and recombinant AAV vectors. *Annual review of genetics* 38, 819-845.
- McDonald, W.I., Compston, A., Edan, G., Goodkin, D., Hartung, H.P., Lublin, F.D., McFarland, H.F., Paty, D.W., Polman, C.H., Reingold, S.C., Sandberg-Wollheim, M., Sibley, W., Thompson, A., van den Noort, S., Weinshenker, B.Y., Wolinsky, J.S., 2001. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Annals of neurology* 50, 121-127.
- McGeachy, M.J., Chen, Y., Tato, C.M., Laurence, A., Joyce-Shaikh, B., Blumenschein, W.M., McClanahan, T.K., O'Shea, J.J., Cua, D.J., 2009. The interleukin 23 receptor is essential for the terminal differentiation of interleukin 17-producing effector T helper cells in vivo. *Nat Immunol* 10, 314-324.
- McGeachy, M.J., Cua, D.J., 2008. Th17 cell differentiation: the long and winding road. *Immunity* 28, 445-453.
- Miao, C., Snyder, R., Schowalter, D., Patijn, G., Winther, B., Kay, M., 1998. The kinetics of rAAV integration in the liver. *Nature Genetics* 19, 13-15.
- Miller, E.B., Gurda-Whitaker, B., Govindasamy, L., McKenna, R., Zolotukhin, S., Muzyczka, N., Agbandje-McKenna, M., 2006. Production, purification and preliminary X-ray crystallographic studies of adeno-associated virus serotype 1. *Acta crystallographica. Section F, Structural biology and crystallization communications* 62, 1271-1274.
- Miossec, P., Kolls, J.K., 2012. Targeting IL-17 and TH17 cells in chronic inflammation. *Nat Rev Drug Discov* 11, 763-776.
- Mitchell, M., Nam, H.J., Carter, A., McCall, A., Rence, C., Bennett, A., Gurda, B., McKenna, R., Porter, M., Sakai, Y., Byrne, B.J., Muzyczka, N., Aslanidi, G., Zolotukhin, S., Agbandje-McKenna, M., 2009. Production, purification and preliminary X-ray crystallographic studies of adeno-associated virus serotype 9. *Acta crystallographica. Section F, Structural biology and crystallization communications* 65, 715-718.
- Mosmann, T.R., Cherwinski, H., Bond, M.W., Giedlin, M.A., Coffman, R.L., 1986. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 136, 2348-2357.
- Mueller, M.M., Herold-Mende, C.C., Riede, D., Lange, M., Steiner, H.H., Fusenig, N.E., 1999. Autocrine growth regulation by granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte macrophage colony-stimulating factor in human gliomas with tumor progression. *The American journal of pathology* 155, 1557-1567.
- Murphy, C.A., Langrish, C.L., Chen, Y., Blumenschein, W., McClanahan, T., Kastelein, R.A., Sedgwick, J.D., Cua, D.J., 2003. Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. *J Exp Med* 198, 1951-1957.

N

Nam, H.J., Lane, M.D., Padron, E., Gurda, B., McKenna, R., Kohlbrenner, E., Aslanidi, G., Byrne, B., Muzyczka, N., Zolotukhin, S., Agbandje-McKenna, M., 2007. Structure of adeno-associated virus serotype 8, a gene therapy vector. *Journal of virology* 81, 12260-12271.

Nanda, A., Lynch, D.M., Goudsmit, J., Lemckert, A.A., Ewald, B.A., Sumida, S.M., Truitt, D.M., Abbink, P., Kishko, M.G., Gorgone, D.A., Lifton, M.A., Shen, L., Carville, A., Mansfield, K.G., Havenga, M.J., Barouch, D.H., 2005. Immunogenicity of recombinant fiber-chimeric adenovirus serotype 35 vector-based vaccines in mice and rhesus monkeys. *Journal of virology* 79, 14161-14168.

Nash, K., Chen, W., Muzyczka, N., 2008. Complete in vitro reconstitution of adeno-associated virus DNA replication requires the minichromosome maintenance complex proteins. *Journal of virology* 82, 1458-1464.

Niemeyer, G.P., Herzog, R.W., Mount, J., Arruda, V.R., Tillson, D.M., Hathcock, J., van Ginkel, F.W., High, K.A., Lothrop, C.D., Jr., 2009. Long-term correction of inhibitor-prone hemophilia B dogs treated with liver-directed AAV2-mediated factor IX gene therapy. *Blood* 113, 797-806.

Nitta, Y., Kawamoto, S., Halbert, C., Iwata, A., Miller, A.D., Miyazaki, J., Allen, M.D., 2005. A CMV-actin-globin hybrid promoter improves adeno-associated viral vector gene expression in the arterial wall in vivo. *The journal of gene medicine* 7, 1348-55.

Numasaki, M., Fukushi, J., Ono, M., Narula, S.K., Zavodny, P.J., Kudo, T., Robbins, P.D., Tahara, H., Lotze, M.T., 2003. Interleukin-17 promotes angiogenesis and tumor growth. *Blood* 101, 2620-2627.

Nurieva, R., Yang, X.O., Martinez, G., Zhang, Y., Panopoulos, A.D., Ma, L., Schluns, K., Tian, Q., Watowich, S.S., Jetten,

A.M., Dong, C., 2007. Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells. *Nature* 448, 480-483.

O

Ogston, P., Raj, K., Beard, P., 2000. Productive replication of adeno-associated virus can occur in human papillomavirus type 16 (HPV-16) episome-containing keratinocytes and is augmented by the HPV-16 E2 protein. *Journal of virology* 74, 3494-3504.

Ogura, Y., Bonen, D.K., Inohara, N., Nicolae, D.L., Chen, F.F., Ramos, R., Britton, H., Moran, T., Karaliuskas, R., Duerr, R.H., Achkar, J.P., Brant, S.R., Bayless, T.M., Kirschner, B.S., Hanauer, S.B., Nunez, G., Cho, J.H., 2001. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 411, 603-606.

Okayasu, I., Hatakeyama, S., Yamada, M., Ohkusa, T., Inagaki, Y., Nakaya, R., 1990. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology* 98, 694-702.

Oppmann, B., Lesley, R., Blom, B., Timans, J.C., Xu, Y., Hunte, B., Vega, F., Yu, N., Wang, J., Singh, K., Zonin, F., Vaisberg, E., Churakova, T., Liu, M., Gorman, D., Wagner, J., Zurawski, S., Liu, Y., Abrams, J.S., Moore, K.W., Rennick, D., de Waal-Malefyt, R., Hannum, C., Bazan, J.F., Kastelein, R.A., 2000. Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity* 13, 715-725.

Ortolano, S., Spuch, C., Navarro, C., 2012. Present and future of adeno associated virus based gene therapy approaches. *Recent patents on endocrine, metabolic & immune drug discovery* 6, 47-66.

Ouyang, W., Kolls, J.K., Zheng, Y., 2008. The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. *Immunity* 28, 454-467.

P

Pai, V.B., Nahata, M.C., 2000. Cardiotoxicity of chemotherapeutic agents: incidence, treatment and prevention. *Druf Saf* 22, 263-302.

Panitch, H.S., Hirsch, R.L., Schindler, J., Johnson, K.P., 1987. Treatment of multiple sclerosis with gamma interferon: exacerbations associated with activation of the immune system. *Neurology* 37, 1097-1102.

Panitch, H.S., Hirsch, R.L., Haley, A.S., Johnson, K.P., 1987b. Exacerbations of multiple sclerosis in patients treated with gamma interferon. *Lancet* 1, 893-895.

Park, H., Li, Z., Yang, X.O., Chang, S.H., Nurieva, R., Wang, Y.H., Wang, Y., Hood, L., Zhu, Z., Tian, Q., Dong, C., 2005. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol* 6, 1133-1141.

Polman, C.H., O'Connor, P.W., Havrdova, E., Hutchinson, M., Kappos, L., Miller, D.H., Phillips, J.T., Lublin, F.D., Giovannoni, G., Wajgt, A., Toal, M., Lynn, F., Panzara, M.A., Sandrock, A.W., 2006. A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 354, 899-910.

Polman, C.H., Reingold, S.C., Banwell, B., Clanet, M., Cohen, J.A., Filippi, M., Fujihara, K., Havrdova, E., Hutchinson, M., Kappos, L., Lublin, F.D., Montalban, X., O'Connor, P., Sandberg-Wollheim, M., Thompson, A.J., Waubant, E., Weinshenker, B., Wolinsky, J.S., 2011. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Annals of neurology* 69, 292-302.

Polyak, S., Mah, C., Porvasnik, S., Herlihy, J.D., Campbell-Thompson, M., Byrne, B.J., Valentine, J.F., 2008. Gene delivery to intestinal epithelial cells in vitro and in vivo with recombinant adeno-associated virus types 1, 2 and 5. *Digestive diseases and sciences* 53, 1261-1270.

Poser, C.M., Paty, D.W., Scheinberg, L., McDonald, W.I., Davis, F.A., Ebers, G.C., Johnson, K.P., Sibley, W.A., Silberberg, D.H., Tourtellotte, W.W., 1983. New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols. *Annals of neurology* 13, 227-231.

Pugliatti, M., Sotgiu, S., Rosati, G., 2002. The worldwide prevalence of multiple sclerosis. *Clin Neurol Neurosurg* 104, 182-191.

Q

Qin, H., Wang, L., Feng, T., Elson, C.O., Niyongere, S.A., Lee, S.J., Reynolds, S.L., Weaver, C.T., Roarty, K., Serra, R., Benveniste, E.N., Cong, Y., 2009. TGF-beta promotes Th17 cell development through inhibition of SOCS3. *J Immunol* 183, 97-105.

Quesada, O., Gurda, B., Govindasamy, L., McKenna, R., Kohlbrenner, E., Aslanidi, G., Zolotukhin, S., Muzyczka, N., Agbandje-McKenna, M., 2007. Production, purification and preliminary X-ray crystallographic studies of adeno-associated virus serotype 7. *Acta crystallographica. Section F, Structural biology and crystallization communications* 63, 1073-1076.

R

Rabinowitz, J.E., Rolling, F., Li, C., Conrath, H., Xiao, W., Xiao, X., Samulski, R.J., 2002. Cross-packaging of a single adeno-associated virus (AAV) type 2 vector genome into multiple AAV serotypes enables transduction with broad specificity. *Journal of virology* 76, 791-801.

Rabinowitz, J.E., Samulski, R.J., 2000. Building a better vector: the manipulation of AAV virions. *Virology* 278, 301-308.

Ratsimandresy, R.A., Duvallet, E., Assier, E., Semerano, L., Delavallée, L., Bessis, N., Zagury, J.F., Boissier, M.C., 2011. Active immunization against IL-23p19 improves

experimental arthritis. *Vaccine* 29, 9329-9336.

Reddy, V.S., Natchiar, S.K., Stewart, P.L., Nemerow, G.R., 2010. Crystal structure of human adenovirus at 3.5 Å resolution. *Science (New York, N.Y.)* 329, 1071-1075.

Riera, J., 2002. Definiciones conceptuales de la enfermedad inflamatoria intestinal. Concepto de cronicidad., in: Gasull, M.A., Gomollón, F., Obrador, A., Hinojosa, J. (Eds.), *Enfermedad inflamatoria intestinal*. Ergón.

Rivera, V.M., Gao, G.P., Grant, R.L., Schnell, M.A., Zoltick, P.W., Rozamus, L.W., Clackson, T., Wilson, J.M., 2005. Long-term pharmacologically regulated expression of erythropoietin in primates following AAV-mediated gene transfer. *Blood* 105, 1424-1430.

Rodriguez, E., Romero, C., Rio, A., Miralles, M., Raventos, A., Planells, L., Burgueno, J.F., Hamada, H., Perales, J.C., Bosch, A., Gassull, M.A., Fernandez, E., Chillón, M., 2013. Short-fiber protein of ad40 confers enteric tropism and protection against acidic gastrointestinal conditions. *Human gene therapy methods* 24, 195-204.

Rollier, C.S., Reyes-Sandoval, A., Cottingham, M.G., Ewer, K., Hill, A.V., 2011. Viral vectors as vaccine platforms: deployment in sight. *Curr Opin Immunol* 23, 377-382.

Rose, J.A., Maizel, J.V., Jr., Inman, J.K., Shatkin, A.J., 1971. Structural proteins of adenovirus-associated viruses. *Journal of virology* 8, 766-770.

Rudner, X.L., Happel, K.I., Young, E.A., Shellito, J.E., 2007. Interleukin-23 (IL-23)-IL-17 cytokine axis in murine *Pneumocystis carinii* infection. *Infect Immun* 75, 3055-3061.

Russell, W.C., 2000. Update on adenovirus and its vectors. *The Journal of general virology* 81, 2573-2604.

S

Sacks, D., Noben-Trauth, N., 2002. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat Rev Immunol* 2, 845-858.

Samulski, R.J., Zhu, X., Xiao, X., Brook, J.D., Housman, D.E., Epstein, N., Hunter, L.A., 1991. Targeted integration of adeno-associated virus (AAV) into human chromosome 19. *The EMBO journal* 10, 3941-3950.

Sands, M.S., 2011. AAV-mediated liver-directed gene therapy. *Methods Mol Biol* 807, 141-157.

Santarasci, V., Maggi, L., Capone, M., Frosali, F., Querci, V., De Palma, R., Liotta, F., Cosmi, L., Maggi, E., Romagnani, S., Annunziato, F., 2009. TGF-beta indirectly favors the development of human Th17 cells by inhibiting Th1 cells. *Eur J Immunol* 39, 207-215.

Sarkioja, M., Pesonen, S., Raki, M., Hakkarainen, T., Salo, J., Ahonen, M.T., Kanerva, A., Hemminki, A., 2008. Changing the adenovirus fiber for retaining gene delivery efficacy in the presence of neutralizing antibodies. *Gene therapy* 15, 921-929.

Saro, C., Ruiz, V., 2002. Epidemiología y factores de riesgo de la enfermedad inflamatoria intestinal., in: Gasull, M.A., Gomollón, F., Obrador, A., Hinojosa, J. (Eds.), *Enfermedad inflamatoria intestinal*. Ergón.

Schattling, B., Steinbach, K., Thies, E., Kruse, M., Menigoz, A., Ufer, F., Flockerzi, V., Brück, W., Pongs, O., Vennekens, R., Kneussel, M., Freichel, M., Merkler, D., Friese, M.A., 2012. TRPM4 cation channel mediates axonal and neuronal degeneration in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Nature Medicine* 18, 1805-1811.

- Schlehofer, J.R., Ehrbar, M., zur Hausen, H., 1986. Vaccinia virus, herpes simplex virus, and carcinogens induce DNA amplification in a human cell line and support replication of a helpervirus dependent parvovirus. *Virology* 152, 110-117.
- Schmidt, C., 2008. Ustekinumab poised to enter the psoriasis market. *Nature biotechnology* 26, 1317-1318.
- Schnepp, B.C., Jensen, R.L., Chen, C.L., Johnson, P.R., Clark, K.R., 2005. Characterization of adeno-associated virus genomes isolated from human tissues. *Journal of virology* 79, 14793-14803.
- Schwarzenberger, P., Huang, W., Ye, P., Oliver, P., Manuel, M., Zhang, Z., Bagby, G., Nelson, S., Kolls, J.K., 2000. Requirement of endogenous stem cell factor and granulocyte-colony-stimulating factor for IL-17-mediated granulopoiesis. *J Immunol* 164, 4783-4789.
- Schwarzenberger, P., La Russa, V., Miller, A., Ye, P., Huang, W., Zieske, A., Nelson, S., Bagby, G.J., Stoltz, D., Mynatt, R.L., Spriggs, M., Kolls, J.K., 1998. IL-17 stimulates granulopoiesis in mice: use of an alternate, novel gene therapy-derived method for in vivo evaluation of cytokines. *J Immunol* 161, 6383-6389.
- Segerman, A., Arnberg, N., Erikson, A., Lindman, K., Wadell, G., 2003. There are two different species B adenovirus receptors: sBAR, common to species B1 and B2 adenoviruses, and sB2AR, exclusively used by species B2 adenoviruses. *Journal of virology* 77, 1157-1162.
- Seppen, J., Barry, S.C., Klinkspoor, J.H., Katen, L.J., Lee, S.P., Garcia, J.V., Osborne, W.R., 2000. Apical gene transfer into quiescent human and canine polarized intestinal epithelial cells by lentivirus vectors. *Journal of virology* 74, 7642-7645.
- Shao, G., Greathouse, K., Huang, Q., Wang, C.M., Sferra, T.J., 2006. Gene transfer to the gastrointestinal tract after peroral administration of recombinant adeno-associated virus type 2 vectors. *Journal pediatric gastroenterol nutr* 43, 168-179.
- Shapiro, S., Galboiz, Y., Lahat, N., Kinarty, A., Miller, A., 2003. The 'immunological-synapse' at its APC side in relapsing and secondary-progressive multiple sclerosis: modulation by interferon-beta. *Journal of neuroimmunology* 144, 116-124.
- Shen, S., Bryant, K.D., Brown, S.M., Randall, S.H., Asokan, A., 2011. Terminal N-linked galactose is the primary receptor for adeno-associated virus 9. *J Biol Chem* 286, 13532-13540.
- Sherwood, V., Burgert, H.G., Chen, Y.H., Sanghera, S., Katafigiotis, S., Randall, R.E., Connerton, I., Mellits, K.H., 2007. Improved growth of enteric adenovirus type 40 in a modified cell line that can no longer respond to interferon stimulation. *The Journal of general virology* 88, 71-76.
- Shinagawa, M., Iida, Y., Matsuda, A., Tsukiyama, T., Sato, G., 1987. Phylogenetic relationships between adenoviruses as inferred from nucleotide sequences of inverted terminal repeats. *Gene* 55, 85-93.
- Skurkovich, S., Boiko, A., Beliaeva, I., Buglak, A., Alekseeva, T., Smirnova, N., Kulakova, O., Tchechonin, V., Gurova, O., Deomina, T., Favorova, O.O., Skurkovic, B., Gusev, E., 2001. Randomized study of antibodies to IFN-gamma and TNF-alpha in secondary progressive multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis* 7, 277-284.
- Smith, R.H., 2008. Adeno-associated virus integration: virus versus vector. *Gene therapy* 15, 817-822.
- Snyder, R.O., Samulski, R.J., Muzyczka, N., 1990. In vitro resolution of covalently joined AAV chromosome ends. *Cell* 60, 105-113.
- Sonntag, F., Schmidt, K., Kleinschmidt, J.A., 2010. A viral assembly factor promotes AAV2 capsid formation in the nucleolus.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 107, 10220-10225.

Sotgiu, S., Pugliatti, M., Fois, M.L., Arru, G., Sanna, A., Sotgiu, M.A., Rosati, G., 2004. Genes, environment, and susceptibility to multiple sclerosis. *Neurobiol Dis* 17, 131-143.

Srivastava, A., Lusby, E.W., Berns, K.I., 1983. Nucleotide sequence and organization of the adeno-associated virus 2 genome. *Journal of virology* 45, 555-564.

Stark, M.A., Huo, Y., Burcin, T.L., Morris, M.A., Olson, T.S., Ley, K., 2005. Phagocytosis of apoptotic neutrophils regulates granulopoiesis via IL-23 and IL-17. *Immunity* 22, 285-294.

Stein, L.D., 2004. Human genome: end of the beginning. *Nature* 431, 915-916.

Steinman, L., 2005. Blocking adhesion molecules as therapy for multiple sclerosis: natalizumab. *Nat Rev Drug Discov* 4, 510-518.

Stevenson, S.C., Rollence, M., Marshall-Neff, J., McClelland, A., 1997. Selective targeting of human cells by a chimeric adenovirus vector containing a modified fiber protein. *Journal of virology* 71, 4782-4790.

Stieger, K., Schroeder, J., Provost, N., Mendes-Madeira, A., Belbellaa, B., Le Meur, G., Weber, M., Deschamps, J.Y., Lorenz, B., Moullier, P., Rolling, F., 2009. Detection of intact rAAV particles up to 6 years after successful gene transfer in the retina of dogs and primates. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 17, 516-523.

Stone, D., Liu, Y., Li, Z.Y., Tuve, S., Strauss, R., Lieber, A., 2007. Comparison of adenoviruses from species B, C, E, and F after intravenous delivery. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 15, 2146-2153.

Straus, S.E., Sebring, E.D., Rose, J.A., 1976. Concatemers of alternating plus and minus strands are intermediates in adenovirus-associated virus DNA synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 73, 742-746.

T

't Hart, B.A., Brok, H.P., Remarque, E., Benson, J., Treacy, G., Amor, S., Hintzen, R.Q., Laman, J.D., Bauer, J., Blezer, E.L., 2005. Suppression of ongoing disease in a nonhuman primate model of multiple sclerosis by a human-anti-human IL-12p40 antibody. *Journal of Immunology* 175, 4761-4768.

Tang, S.C., Sambanis, A., Sibley, E., 2005. Proteasome modulating agents induce rAAV2-mediated transgene expression in human intestinal epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 331, 1392-1400.

Tang, S.C., Sibley, E., 2006. Genetic modification of somatic gut mucosa: an adeno-associated virus approach. *Journal pediatric gastroenterol nutr* 43, 158-159.

Tattersall, P., Ward, D.C., 1976. Rolling hairpin model for replication of parvovirus and linear chromosomal DNA. *Nature* 263, 106-109.

Taymans, J.M., Vandenberghe, L.H., Haute, C.V., Thiry, I., Deroose, C.M., Mortelmans, L., Wilson, J.M., Debyser, Z., Baekelandt, V., 2007. Comparative analysis of adeno-associated viral vector serotypes 1, 2, 5, 7, and 8 in mouse brain. *Human gene therapy* 18, 195-206.

Teunissen, M.B., Koomen, C.W., de Waal Malefyt, R., Wierenga, E.A., Bos, J.D., 1998. Interleukin-17 and interferon-gamma synergize in the enhancement of proinflammatory cytokine production by human keratinocytes. *The Journal of investigative dermatology* 111, 645-649.

Thomas, C.E., Ehrhardt, A., Kay, M.A., 2003. Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nature reviews. Genetics* 4, 346-358.

Tiemessen, C.T., Kidd, A.H., 1994. Adenovirus type 40 and 41 growth in vitro: host range diversity reflected by differences in patterns of DNA replication. *Journal of virology* 68, 1239-1244.

Tomko, R.P., Xu, R., Philipson, L., 1997. HCAR and MCAR: the human and mouse cellular receptors for subgroup C adenoviruses and group B coxsackieviruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 3352-3356.

Toussiot, E., Bereau, M., 2014. The Risk of Progressive Multifocal Leukoencephalopathy Under Biological Agents Used in the Treatment of Chronic Inflammatory Diseases. *Inflamm allergy drug targets*.

Trinchieri, G., 2003. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nature reviews. Immunology* 3, 133-146.

U

Uhnoo, I., Wadell, G., Svensson, L., Johansson, M.E., 1984. Importance of enteric adenoviruses 40 and 41 in acute gastroenteritis in infants and young children. *Journal of clinical microbiology* 20, 365-372.

V

Van der Perren, A., Toelen, J., Carlon, M., Van den Haute, C., Coun, F., Heeman, B., Reumers, V., Vandenberghe, L.H., Wilson, J.M., Debyser, Z., Baekelandt, V., 2011. Efficient and stable transduction of dopaminergic neurons in rat substantia nigra by rAAV 2/1, 2/2, 2/5, 2/6.2, 2/7, 2/8 and 2/9. *Gene therapy* 18, 517-527.

van Oostrum, J., Burnett, R.M., 1985. Molecular composition of the adenovirus type 2 virion. *Journal of virology* 56, 439-448.

Van Vliet, K.M., Blouin, V., Brument, N., Agbandje-McKenna, M., Snyder, R.O., 2008. The role of the adeno-associated virus capsid in gene transfer. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 437, 51-91.

Vandenberghe, L.H., Wang, L., Somanathan, S., Zhi, Y., Figueredo, J., Calcedo, R., Sanmiguel, J., Desai, R.A., Chen, C.S., Johnston, J., Grant, R.L., Gao, G., Wilson, J.M., 2006. Heparin binding directs activation of T cells against adeno-associated virus serotype 2 capsid. *Nat Med* 12, 967-971.

Vartanian, T.K., Zamvil, S.S., Fox, E., Sorensen, P.S., 2004. Neutralizing antibodies to disease-modifying agents in the treatment of multiple sclerosis. *Neurology* 63, S42-49.

Veldhoen, M., Hocking, R.J., Atkins, C.J., Locksley, R.M., Stockinger, B., 2006a. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* 24, 179-189.

Veldhoen, M., Hocking, R.J., Flavell, R.A., Stockinger, B., 2006b. Signals mediated by transforming growth factor-beta initiate autoimmune encephalomyelitis, but chronic inflammation is needed to sustain disease. *Nat Immunol* 7, 1151-1156.

Venter, J.C., Adams, M.D., Myers, E.W., Li, P.W., Mural, R.J., Sutton, G.G., Smith, H.O., Yandell, M., Evans, C.A., Holt, R.A., Gocayne, J.D., Amanatides, P., Ballew, R.M., Huson, D.H., Wortman, J.R., Zhang, Q., Kodira, C.D., Zheng, X.H., Chen, L., Skupski, M., Subramanian, G., Thomas, P.D., Zhang, J., Gabor Miklos, G.L., Nelson, C., Broder, S., Clark, A.G., Nadeau, J., McKusick, V.A., Zinder, N., Levine, A.J., Roberts, R.J., Simon, M., Slayman, C., Hunkapiller, M., Bolanos, R., Delcher, A.,

- Dew, I., Fasulo, D., Flanigan, M., Florea, L., Halpern, A., Hannenhalli, S., Kravitz, S., Levy, S., Mobarry, C., Reinert, K., Remington, K., Abu-Threideh, J., Beasley, E., Biddick, K., Bonazzi, V., Brandon, R., Cargill, M., Chandramouliswaran, I., Charlab, R., Chaturvedi, K., Deng, Z., Di Francesco, V., Dunn, P., Eilbeck, K., Evangelista, C., Gabrielian, A.E., Gan, W., Ge, W., Gong, F., Gu, Z., Guan, P., Heiman, T.J., Higgins, M.E., Ji, R.R., Ke, Z., Ketchum, K.A., Lai, Z., Lei, Y., Li, Z., Li, J., Liang, Y., Lin, X., Lu, F., Merkulov, G.V., Milshina, N., Moore, H.M., Naik, A.K., Narayan, V.A., Neelam, B., Nusskern, D., Rusch, D.B., Salzberg, S., Shao, W., Shue, B., Sun, J., Wang, Z., Wang, A., Wang, X., Wang, J., Wei, M., Wides, R., Xiao, C., Yan, C., Yao, A., Ye, J., Zhan, M., Zhang, W., Zhang, H., Zhao, Q., Zheng, L., Zhong, F., Zhong, W., Zhu, S., Zhao, S., Gilbert, D., Baumhueter, S., Spier, G., Carter, C., Cravchik, A., Woodage, T., Ali, F., An, H., Awe, A., Baldwin, D., Baden, H., Barnstead, M., Barrow, I., Beeson, K., Busam, D., Carver, A., Center, A., Cheng, M.L., Curry, L., Danaher, S., Davenport, L., Desilets, R., Dietz, S., Dodson, K., Doup, L., Ferreira, S., Garg, N., Gluecksmann, A., Hart, B., Haynes, J., Haynes, C., Heiner, C., Hladun, S., Hostin, D., Houck, J., Howland, T., Ibegwam, C., Johnson, J., Kalush, F., Kline, L., Koduru, S., Love, A., Mann, F., May, D., McCawley, S., McIntosh, T., McMullen, I., Moy, M., Moy, L., Murphy, B., Nelson, K., Pfannkoch, C., Pratts, E., Puri, V., Qureshi, H., Reardon, M., Rodriguez, R., Rogers, Y.H., Romblad, D., Ruhfel, B., Scott, R., Sitter, C., Smallwood, M., Stewart, E., Strong, R., Suh, E., Thomas, R., Tint, N.N., Tse, S., Vech, C., Wang, G., Wetter, J., Williams, S., Williams, M., Windsor, S., Winn-Deen, E., Wolfe, K., Zaveri, J., Zaveri, K., Abril, J.F., Guigo, R., Campbell, M.J., Sjolander, K.V., Karlak, B., Kejariwal, A., Mi, H., Lazareva, B., Hatton, T., Narechania, A., Diemer, K., Muruganujan, A., Guo, N., Sato, S., Bafna, V., Istrail, S., Lippert, R., Schwartz, R., Walenz, B., Yooseph, S., Allen, D., Basu, A., Baxendale, J., Blick, L., Caminha, M., Carnes-Stine, J., Caulk, P., Chiang, Y.H., Coyne, M., Dahlke, C., Mays, A., Dombroski, M., Donnelly, M., Ely, D., Esparham, S., Fosler, C., Gire, H., Glanowski, S., Glasser, K., Glodek, A., Gorokhov, M., Graham, K., Gropman, B., Harris, M., Heil, J., Henderson, S., Hoover, J., Jennings, D., Jordan, C., Jordan, J., Kasha, J., Kagan, L., Kraft, C., Levitsky, A., Lewis, M., Liu, X., Lopez, J., Ma, D., Majoros, W., McDaniel, J., Murphy, S., Newman, M., Nguyen, T., Nguyen, N., Nodell, M., Pan, S., Peck, J., Peterson, M., Rowe, W., Sanders, R., Scott, J., Simpson, M., Smith, T., Sprague, A., Stockwell, T., Turner, R., Venter, E., Wang, M., Wen, M., Wu, D., Wu, M., Xia, A., Zandieh, A., Zhu, X., 2001. The sequence of the human genome. *Science (New York, N.Y.)* 291, 1304-1351.
- Volpe, E., Servant, N., Zollinger, R., Bogiatzi, S.I., Hupe, P., Barillot, E., Soumelis, V., 2008. A critical function for transforming growth factor-beta, interleukin 23 and proinflammatory cytokines in driving and modulating human T(H)-17 responses. *Nat Immunol* 9, 650-657.
- Von Seggern, D.J., Kehler, J., Endo, R.I., Nemerow, G.R., 1998. Complementation of a fibre mutant adenovirus by packaging cell lines stably expressing the adenovirus type 5 fibre protein. *The Journal of general virology* 79, 1461-1468.
- Von Seggern, D.J., Huang, S., Fleck, S.K., Stevenson, S.C., Nemerow, G.R., 2000. Adenovirus vector pseudotyping in fiber-expressing cell lines: improved transduction of Epstein-Barr virus-transformed B cells. *Journal of virology* 74, 354-362.

W

Wadell, G., Hammarskjold, M.L., Winberg, G., Varsanyi, T.M., Sundell, G., 1980. Genetic variability of adenoviruses. *Annals of the New York Academy of Sciences* 354, 16-42.

Walters, R.W., Agbandje-McKenna, M., Bowman, V.D., Moninger, T.O., Olson, N.H., Seiler, M., Chiorini, J.A., Baker, T.S., Zabner,

- J., 2004. Structure of adeno-associated virus serotype 5. *Journal of virology* 78, 3361-3371.
- Walz, C., Deprez, A., Dupressoir, T., Durst, M., Rabreau, M., Schlehofer, J.R., 1997. Interaction of human papillomavirus type 16 and adeno-associated virus type 2 co-infecting human cervical epithelium. *The Journal of general virology* 78 (Pt 6), 1441-1452.
- Wang, C., Pham, P.T., 2008. Polymers for viral gene delivery. *Expert Opin Drug Deliv* 5, 385-401.
- Wang, C., Wang, C.M., Clark, K.R., Sferra, T.J., 2003. Recombinant AAV serotype 1 transduction efficiency and tropism in the murine brain. *Gene therapy* 10, 1528-1534.
- Weber, M., Rabinowitz, J., Provost, N., Conrath, H., Folliot, S., Briot, D., Cherel, Y., Chenuaud, P., Samulski, J., Moullier, P., Rolling, F., 2003. Recombinant adeno-associated virus serotype 4 mediates unique and exclusive long-term transduction of retinal pigmented epithelium in rat, dog, and nonhuman primate after subretinal delivery. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 7, 774-781.
- Wei, L., Laurence, A., Elias, K.M., O'Shea, J.J., 2007. IL-21 is produced by Th17 cells and drives IL-17 production in a STAT3-dependent manner. *J Biol Chem* 282, 34605-34610.
- Wekerle, H., Kojima, K., Lannes-Vieira, J., Lassmann, H., Linington, C., 1994. Animal models. *Annals of neurology* 36 Suppl, S47-53.
- Wenning, W., Haghikia, A., Laubenberger, J., Clifford, D.B., Behrens, P.F., Chan, A., Gold, R., 2009. Treatment of progressive multifocal leukoencephalopathy associated with natalizumab. *The New England journal of medicine* 361, 1075-1080.
- Wilhelmi, I., Roman, E., Sanchez-Fauquier, A., 2003. Viruses causing gastroenteritis. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 9, 247-262.
- Willenborg, D.O., Fordham, S., Bernard, C.C., Cowden, W.B., Ramshaw, I.A., 1996. IFN-gamma plays a critical down-regulatory role in the induction and effector phase of myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced autoimmune encephalomyelitis. *Journal of immunology* 157, 3223-3227.
- Wilson, N.J., Boniface, K., Chan, J.R., McKenzie, B.S., Blumenschein, W.M., Mattson, J.D., Basham, B., Smith, K., Chen, T., Morel, F., Lecron, J.C., Kastelein, R.A., Cua, D.J., McClanahan, T.K., Bowman, E.P., de Waal Malefyt, R., 2007. Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat Immunol* 8, 950-957.
- Witkowska, A.M., 2005. On the role of sIL-2R measurements in rheumatoid arthritis and cancers. *Mediators of inflammation* 2005, 121-130.
- Wu, H., Dmitriev, I., Kashentseva, E., Seki, T., Wang, M., Curiel, D.T., 2002. Construction and characterization of adenovirus serotype 5 packaged by serotype 3 hexon. *Journal of virology* 76, 12775-12782.
- Wu, Y., Liu, J., Woo, S., Finegold, M.J., Brandt, M.L., 1999. Prenatal orogastric gene delivery results in transduction of the small bowel in the fetal rabbit. *Fetal diagnostic therapy* 14, 323-327.
- Wu, Z., Asokan, A., Samulski, R.J., 2006a. Adeno-associated virus serotypes: vector toolkit for human gene therapy. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 14, 316-327.
- Wu, Z., Miller, E., Agbandje-McKenna, M., Samulski, R.J., 2006b. Alpha2,3 and alpha2,6 N-linked sialic acids facilitate

efficient binding and transduction by adeno-associated virus types 1 and 6. *Journal of virology* 80, 9093-9103.

Wu, Z., Yang, H., Colosi, P., 2010. Effect of genome size on AAV vector packaging. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 18, 80-86.

X

Xiao, W., Berta, S.C., Lu, M., Moscioni, D., Tazelaar, J., Wilson, J., 1998. Adeno-associated virus as a vector for liver directed gene therapy. *Journal of virology* 72, 10222-10226.

Xiao, W., Chirmule, N., Berta, S.C., McCullough, B., Gao, G., Wilson, J.M., 1999. Gene therapy vectors based on adeno-associated virus type 1. *Journal of virology* 73, 3994-4003.

Xiao, X., Li, J., Samulski, R.J., 1998. Production of high-titer recombinant adeno-associated virus vectors in the absence of helper adenovirus. *Journal of virology* 72, 2224-2232.

Xie, Q., Bu, W., Bhatia, S., Hare, J., Somasundaram, T., Azzi, A., Chapman, M.S., 2002. The atomic structure of adeno-associated virus (AAV-2), a vector for human gene therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 10405-10410.

Xie, Q., Ongley, H.M., Hare, J., Chapman, M.S., 2008. Crystallization and preliminary X-ray structural studies of adeno-associated virus serotype 6. *Acta crystallographica. Section F, Structural biology and crystallization communications* 64, 1074-1078.

Y

Yago, T., Nanke, Y., Kawamoto, M., Furuya, T., Kobashigawa, T., Kamatani, N., Kotake, S., 2007. IL-23 induces human osteoclastogenesis via IL-17 in vitro, and

anti-IL-23 antibody attenuates collagen-induced arthritis in rats. *Arthritis Res Ther* 9, R96.

Yamamoto, K.R., Gehring, U., Stampfer, M.R., Sibley, C.H., 1976. Genetic approaches to steroid hormone action. *Recent progress in hormone research* 32, 3-32.

Yang, L., Anderson, D.E., Baecher-Allan, C., Hastings, W.D., Bettelli, E., Oukka, M., Kuchroo, V.K., Hafler, D.A., 2008. IL-21 and TGF-beta are required for differentiation of human T(H)17 cells. *Nature* 454, 350-352.

Yang, X.O., Panopoulos, A.D., Nurieva, R., Chang, S.H., Wang, D., Watowich, S.S., Dong, C., 2007. STAT3 regulates cytokine-mediated generation of inflammatory helper T cells. *J Biol Chem* 282, 9358-9363.

Ye, P., Rodriguez, F.H., Kanaly, S., Stocking, K.L., Schurr, J., Schwarzenberger, P., Oliver, P., Huang, W., Zhang, P., Zhang, J., Shellito, J.E., Bagby, G.J., Nelson, S., Charrier, K., Peschon, J.J., Kolls, J.K., 2001. Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. *J Exp Med* 194, 519-527.

Yousry, T.A., Major, E.O., Ryschkewitsch, C., Fahle, G., Fischer, S., Hou, J., Curfman, B., Miszkiel, K., Mueller-Lenke, N., Sanchez, E., Barkhof, F., Radue, E.W., Jager, H.R., Clifford, D.B., 2006. Evaluation of patients treated with natalizumab for progressive multifocal leukoencephalopathy. *N Engl J Med* 354, 924-933.

Yu, R.Y., Gallagher, G., 2010. A naturally occurring, soluble antagonist of human IL-23 inhibits the development and in vitro function of human Th17 cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 185, 7302-7308.

Z

- Zabner, J., Chillon, M., Grunst, T., Moninger, T.O., Davidson, B.L., Gregory, R., Armentano, D., 1999. A chimeric type 2 adenovirus vector with a type 17 fiber enhances gene transfer to human airway epithelia. *Journal of virology* 73, 8689-8695.
- Zang, Y., Hong, J., Robinson, R., Li, S., Rivera, V.M., Zhang, J.Z., 2003. Immune regulatory properties and interactions of copolymer-I and beta-interferon 1a in multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology* 137, 144-153.
- Zhang, G.X., Gran, B., Yu, S., Li, J., Siglienti, I., Chen, X., Kamoun, M., Rostami, A., 2003. Induction of experimental autoimmune encephalomyelitis in IL-12 receptor-beta 2-deficient mice: IL-12 responsiveness is not required in the pathogenesis of inflammatory demyelination in the central nervous system. *J Immunol* 170, 2153-2160.
- Zhang, J., Markovic-Plese, S., Lacet, B., Raus, J., Weiner, H.L., Hafler, D.A., 1994. Increased frequency of interleukin 2-responsive T cells specific for myelin basic protein and proteolipid protein in peripheral blood and cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *J Exp Med* 179, 973-984.
- Zhang, Y., Ma, X., 2010. Triptolide inhibits IL-12/IL-23 expression in APCs via CCAAT/enhancer-binding protein alpha. *Journal of immunology* 184, 3866-3877.
- Zhang, X.Y., Zhang, H.J., Zhang, Y., Fu, Y.J., He, J., Zhu, L.P., Wang, S.H., Liu, L., 2006. Identification and expression analysis of alternatively spliced isoforms of human interleukin-23 receptor gene in normal lymphoid cells and selected tumor cells. *Immunogenetics* 57, 934-943.
- Zhou, L., Ivanov, I., Spolski, R., Min, R., Shenderov, K., Egawa, T., Levy, D.E., Leonard, W.J., Littman, D.R., 2007. IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nat Immunol* 8, 967-974.
- Zincarelli, C., Soltys, S., Rengo, G., Rabinowitz, J.E., 2008. Analysis of AAV serotypes 1-9 mediated gene expression and tropism in mice after systemic injection. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 16, 1073-1080.
- Zolotukhin, S., Byrne, B.J., Mason, E., Zolotukhin, I., Potter, M., Chesnut, K., Summerford, C., Samulski, R.J., Muzyczka, N., 1999. Recombinant adeno-associated virus purification using novel methods improves infectious titer and yield. *Gene Therapy* 6, 973-985.

A close-up photograph of a white, curved metal railing, likely part of a staircase or balcony. The railing is made of thick, rounded bars. The background is a blurred, light-colored wall with faint, repeating patterns. A semi-transparent blue rectangular box is overlaid on the lower right portion of the image, containing the text "VIII. Anexo" in a bold, dark blue font.

VIII. Anexo

Vectores virales generados y producidos

Vectores adenovirales
Ad5-CMV-Cre
Ad5-CMV-IL23R1
Ad5-CMV-IL23R4
Ad5-CMV-IL23Rs
Ad5-CMV-IL23R
Ad5-CMV-IL23Rs-Flag
Ad5-CMV-IL23R-Flag
Ad5/40S-CMV-GFP ⁽¹⁾
Ad5/40S-CMV-GFP ⁽²⁾
Ad5/40S-CMV-GFP mosaico ⁽³⁾

Vectores adenoasociados
AAV1-CMV-Cre
AAV2-CMV-Cre
AAV4-CMV-Cre
AAV6-CMV-Cre
AAV7-CMV-Cre
AAV8-CMV-Cre
AAV9-CMV-Cre
AAV10-CMV-Cre
AAV9-CMV-IL23R1 ^(*)
AAV9-CMV-IL23R4
AAV9-CMV-IL23Rs
AAV9-CMV-IL23R
AAV9-CMV-IL23Rs-Flag
AAV9-CMV-IL23R-Flag
AAV8-CAG-IL23Rs

⁽¹⁾ Producido con el método clásico en adherencia.

⁽²⁾ Producido con el protocolo optimizado en suspensión. Se realizaron varias producciones para su estudio y caracterización.

⁽³⁾ Toda su producción realizada con células 211Bs, contiene F5 y F40S.

^(*) IL23R1: IL23R humano transmembrana
 IL23R4: IL23R humano soluble
 IL23R: IL23R murino transmembrana
 IL23Rs: IL23R murino soluble

Plásmidos generados

Plásmidos
pEBG2t-IL23Rs-Flag ⁽¹⁾
pGV-CMV-IL23R1 ⁽²⁾
pGV-CMV-IL23R4
pGV-CMV-IL23R
pGV-CMV-IL23Rs
pGV-CMV-Cre
pGV-CMV-IL23R-Flag
pGV-CMV-IL23Rs-Flag
pAAV-CAG-PLK-WPRE-IL23Rs-Flag ⁽³⁾
p6600-CMV-Cre ⁽⁴⁾
p6600-CMV-IL23R1
p6600-CMV-IL23R4
p6600-CMV-IL23Rs
p6600-CMV-IL23R
p6600-CMV-IL23Rs-Flag
p6600-CMV-IL23R-Flag
pKP1.3-CMV-Cre ⁽⁵⁾
pKP1.3-CMV-IL23R1
pKP1.3-CMV-IL23R4
pKP1.3-CMV-IL23Rs
pKP1.3-CMV-IL23R
pKP1.3-CMV-IL23Rs-Flag
pKP1.3-CMV-IL23R-Flag

⁽¹⁾ Plásmido portador del GST-tag.

⁽²⁾ pGV: plásmido para la producción de AAV.

⁽³⁾ Plásmido para la producción de AAV con el promotor CAG.

⁽⁴⁾ p6600: plásmido lanzadera para la producción de Ad5.

⁽⁵⁾ pKp1.3: plásmido que contiene el genoma del Ad5, para su producción.

Capítulo de libro: Production of Chimeric Adenovirus

Production of Chimeric Adenovirus. Adenovirus: Methods and Protocols, Third Edition, New York, USA. Humana Press.

Marta Miralles, Marc García, Marcos Tejero, Assumpció Bosch, Miguel Chillón

Methods in Molecular Biology, 2014.

Resumen:

El uso de vectores quiméricos pseudotipados es una forma común de modificar el tropismo adenoviral mediante el reemplazo de la proteína *fiber*. En este capítulo se describe el proceso de generación de un pre-stock de adenovirus quimérico a partir de un plásmido que contiene el genoma adenoviral. Además, se ha determinado el ciclo replicativo del adenovirus quimérico para aumentar el rendimiento en las producciones. Por último, también se detallan dos protocolos diferentes, en placas de cultivo y en cultivos en suspensión para producir el virus a gran escala.

Chapter 16

Production of Chimeric Adenovirus

Marta Miralles, Marc Garcia, Marcos Tejero, Assumpció Bosch,
and Miguel Chillón

Abstract

The use of chimeric pseudotyped vectors is a common way to modify the adenoviral tropism by replacing the fiber protein. In this chapter the procedure to generate a chimeric adenovirus pre-stock from a plasmid containing the adenoviral genome is described. Also, the chimeric adenovirus replicative cycle to increase the yield in further productions is determined. Finally, two different protocols, in culture plates and in suspension cultures, to produce the virus at large scale are also detailed.

Key words Adenoviral vector, Chimeric vectors, Adenovirus production

1 Introduction

Although more than 50 serotypes of HAdVs have been described [1], group C (HAdV-2 and HAdV-5) is still the most studied group [2]. Thus, vectors based on human adenovirus serotype 5 (HAdV-5) have been widely employed as vehicles for many strategies because they have several advantages over other gene delivery systems. These vectors can be amplified to very high titers, which is critical for in vivo assays and clinical applications [3]. Moreover, HAdV-5 vectors are relatively safe because HAdV genome does not integrate into the host genome [4, 5]. For these reasons, HAdV-5 and chimeric HAdV-5 derived vectors have been preferably used among other serotypes.

The term “chimeric virus” is generally used for a recombinant virus generated by the combination of two different viral genomes. Thus, the new chimeric virus may display a combination of the biological properties of both parent viruses. Usually, chimeric adenoviruses have been generated by fiber replacement, involving the HAdV-5 backbone and the fiber protein of a different serotype to thus modify the transduction efficiency and/or the transduction

specificity [6, 7]. Combination of other components may also allow to evade the host immune response [8] or to induce different gene expression or gene regulation profiles.

As chimeric adenoviruses maintain most of their original genes, their replication and assembling mechanisms should be maintained. Therefore, chimeric HAdV-5-derived vectors must be produced in permissible HEK-293 cells. However, since chimerism can alter infectivity, efficiency, virion intracellular trafficking, viral genome replication, and viral assembly, the standard production protocols have to be adjusted for every new chimeric vector. Indeed, as other adenoviral-derived vectors, chimeric adenoviruses are genetically modified organisms (GMO) and have to be produced on a Biosafety Level 2 laboratory.

2 Materials

2.1 Generation of Viral Pre-stock

1. Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 10 % or 2 % Fetal Bovine Serum (FBS).
2. HEK-293 cells.
3. *PacI* restriction enzyme.
4. 150 mM NaCl.
5. Polyethylenimine (PEI).

2.2 Purification of Viral Pre-stock

1. Ultracentrifuge: Beckman Coulter Optima L90K o L100XP with rotors SW32 and SW40Ti.
2. Polyallomer centrifuge tubes for SW32 and SW40 rotor.
3. CsCl solutions: 1.4 g/mL, 1.34 g/mL, and 1.25 g/mL in 1× PBS.
4. 18G needles, 2 mL syringes, pipette-aid, 10 mL pipettes.
5. PD-10 columns Sephadex G-25.
6. 1× PBS Ca²⁺/Mg²⁺.
7. Glycerol, anhydrid.

2.3 Titering and Analysis of Adenoviral Replicative Cycle

1. A viral pre-stock (fully characterized). It is recommended to use vectors carrying a reporter gene.
2. HEK-293 cells.
3. Growing medium: DMEM supplemented with 10 % FBS and 1 % Penicillin–Streptomycin.
4. Infection medium: DMEM supplemented with 2 % FBS and 1 % Penicillin–Streptomycin.
5. 24-well and 96-well plates.

2.4 Chimeric Adenoviral Production from a Pre-stock

1. 150-mm petri dishes (20 plates).
2. HEK-293 cells.
3. Growing and infection medium as described in Subheading 2.3.
4. CsCl solutions: 1.4 g/mL, 1.34 g/mL, and 1.25 g/mL in 1× D-PBS.
5. Ultracentrifuge and rotors: Beckman Coulter Optima L90K or L100XP. Swinging bucket rotors SW32 and SW40ti.
6. Centrifuge tubes for SW32 and SW40ti rotors.
7. 2 and 10 mL syringes, and 18G needles.
8. Glycerol, anhydride.
9. PD-10 columns Sephadex G-25.
10. 1× D-PBS Ca²⁺/Mg²⁺.
11. 96-Well plates.
12. Optional: Polybrene.

2.5 Production in Suspension 211BS Cell Cultures

1. Polycarbonate shake flasks, 125 mL and 1 L.
2. Infection Medium for suspension cells: Freestyle serum-free medium (12338-018, Invitrogen) supplemented with 100 U/mL Penicillin, 0.1 mg/mL Streptomycin, and 1 % Pluronic.
3. 211BS cells [9].
4. Polybrene.
5. Growing medium for suspension cells: SFMII medium (11686-029, GIBCO) supplemented with 4 mM Glutamine, 100 U/mL Penicillin, 0.1 mg/mL Streptomycin, and 1 % Pluronic.
6. Midjet System (GE Healthcare).

3 Methods

3.1 Generation of Viral Pre-stock

It is highly recommended to perform a small pre-stock to generate enough viruses for the following amplification steps. As general trend, for each amplification step it is recommended to wait for cytopathic effect (CPE) to harvest the infected cells. Finally, viral infectivity, viral productivity, and viral cycle must be analyzed to characterize the viral production.

1. Digest 100 µg of the recombinant adenoviral plasmid with 30 Units of *PacI* restriction enzyme in a total volume of 100 µL to remove the plasmid backbone of bacterial origin sequences. Digest for 4 h at 37 °C (*see Note 1*).
2. Add another 30 Units of *PacI* to guarantee a complete digestion. Digest 4 h at 37 °C.
3. Precipitate the digested DNA with 2 volumes of ethanol and resuspend in 50 µL of sterile ddH₂O.

4. Transfect 10^6 HEK-293 cells plated at 60–70 % of confluency with 6 μg of *PacI*-digested plasmid (*see Note 2*).
5. After 3 days, scrape the cells. Freeze/thaw three times the crude lysate to release adenoviral particles from the cells.
6. Centrifuge at $4,500\times g$ for 5 min. Save the supernatant and discard the pellet to remove the cell debris.
7. Seed one 10-cm plate with HEK-293 cells at 60–70 % of confluency. Add 3 mL of DMEM 2 % FBS on the cells as well as all the supernatant from the previous step (*see Note 3*).
8. Check the cells during a period of 5–20 days until a 50 % of CPE is observed. Harvest medium and cells and freeze/thaw three times to release adenoviral particles from the cells.
9. Centrifuge at $4,500\times g$ for 5 min. Save the supernatant and discard the pellet to remove the cell debris.
10. Seed one 150-mm plate with HEK-293 cells at 60–70 % of confluence (15×10^6 HEK-293 cells). Use DMEM 2 % FBS as medium.
11. Add the supernatant from **step 9** to the cells.
12. Follow the cytopathic effect during the first 2–4 days. Unlike the previous amplification step, the CPE should appear in a period of 30–48 h post-infection. Nevertheless, if vector's productivity or infectivity is poor, check the cells during a period of 5–20 days until a 50 % of CPE is observed. Harvest medium and cells, and freeze/thaw three times to release the adenovirus from the cells.
13. Centrifuge at $4,500\times g$ for 5 min. Keep the supernatant and discard the pellet to remove the cell debris.
14. Seed 10×150 -mm cell plate with HEK-293 cells at 60–70 % of confluency. Use infection medium.
15. Distribute the supernatant from **step 13** among the ten plates.
16. Check the cells during a period of 2–4 days until a 50 % of CPE is observed as previously describe. Harvest medium and cells.
17. Harvest the cells and resuspend the cell pellet in 18 mL of supernatant. Freeze/thaw three times to release the adenovirus from the cells.
18. Titrate the viral pre-stock (*see Subheading 3.3*).

3.2 Purification of Viral Pre-stock

1. Add 10 mL of 1.25 g/mL CsCl solution in two SW32 centrifuge tubes.
2. Add carefully 10 mL of 1.40 g/mL CsCl solution at the bottom of each SW32 centrifuge tubes to generate two density phases. Take care to not disturb the gradient when removing the pipette.

3. Add the total volume of the cell pellet (18 mL) in one SW32 tube and the precipitated solution from the supernatant in another SW32 tube on the top of the gradient and equilibrate tubes with 1×-PBS.
4. Centrifuge for 1 h 42 min at 125,500×*g* at 18 °C in a Beckman SW32 rotor with maximum brake.
5. Vector appears as an opaque band at the interface between 1.25 g/mL and 1.4 g/mL CsCl. Collect the band by piercing the SW32 tube about 1 cm below the band using a 2 mL syringe loaded with a 18G needle.
6. Add 5 mL of 1.32 g/mL CsCl solution in one SW40 centrifuge tube and fill a second SW40 tube with 5 mL of the 1.32 g/mL CsCl solution.
7. Add the recovered vector band from the previous step on the top of the 1.32 g/mL CsCl solution. Equilibrate with 1×-PBS.
8. Centrifuge for 22 h at 155,000×*g* 18 °C in a Beckman SW40 rotor with maximum brake.
9. Vector appears as opaque band in the middle of the tube. Collect the band as above in less than 2 mL of volume.
10. For each band, prepare ten eppendorf tubes to collect the viral fractions.
11. Pass through PD-10 column, 25 mL of 1× PBS Ca²⁺/Mg²⁺ to remove the preservation solution and equilibrate the column. Discard the flow-through.
12. Add the total volume of the collected band from **step 9**. Discard the flow-through.
13. Add 500 µL of 1× PBS Ca²⁺/Mg²⁺ to the PD-10 column and collect the flow-through in an eppendorf tube.
14. Repeat the previous step until 10 fractions per band are collected.
15. Add glycerol to a final concentration of 10 % to each fraction (approx. 55 µL per fraction).
16. Store the purified viral fractions at -80 °C.

3.3 Measurement of Viral Infectivity

The infectivity of a viral particle is the capability to enter into a cell and express its genome. The infectivity depends on multiple factors such as the cell line, its passage, or the properties of the viral particle by itself, and it can be altered in a new chimeric adenovirus. Usually, the infectivity of the Human Adenovirus type 5 in HEK-293 cells ranges between 1/10 and 1/100 (IU/vg; Infection Units per viral genomes). Although the viral backbone may be almost identical, the infectivity of chimeric adenoviruses may differ significantly from HAdV-5. Thus, HAdV-5/40 has a poor IU/vg ratio (between 1/100 and 1/600) [9].

236 Marta Miralles et al.

3.3.1 First Titer of the Viral Fractions

1. Seed HEK-293 cells in a 96-well plate at 60–70 % of confluency in a total volume of 100 μL /well of infection medium.
2. Twenty-four hours later, prepare serial dilutions of the ten viral fractions from **step 16** in Subheading 3.2. Prepare each dilution in a final volume of 500 μL . Use DMEM supplemented with 2 % FBS for the dilutions. Typically, start with a $1/10^6$ dilution and make $1/10$ serial dilutions. Perform 6 dilutions ($n=2$ per dilution).
3. Carefully, remove the media from the HEK-293 cells and infect with 100 μL of each dilution (*see Note 4*).
4. Two days after infection, count the number of infected cells using your reporter gene (i.e., GFP or β -galactosidase) or by immunocytochemistry using the anti-hexon-antibody-based system as described in Chapter 12. For calculations, consider only dilutions for wells with less than 10 % of positive cells.
5. Calculate the titer expressed in Infection Units/mL (IU/mL) using the following equation:

$$\text{Titer (IU / mL)} = \frac{\text{Positive cells} \times \text{Dilution factor} \times \text{infection volume}}{10^3} \quad (1)$$

6. Pool the three or four most concentrated fractions (usually fractions 4–7) and aliquot the viral pre-stock (*see Note 5*) in 0.5 mL tubes and store at -80°C as quickly as possible.

3.3.2 Final Titer of the Viral Pre-stock

1. Repeat **steps 1–5** from procedure in Subheading 3.3.1, but start with a $1/10^9$ viral dilution and make $1/2$ serial dilutions as previously explain. Make 12 dilutions.
2. Calculate the titer applying Eq. 1. When working with a fluorescent reporter gene and using cells in which the vector is replicative, select for calculations the most diluted condition showing positive cells 5–7 days after the infection and consider the number of positive cells as “1” (*see Note 6*).
3. Prepare a $1/20$, $1/10$, and $1/5$ viral dilutions in a total volume of 100 μL . Use $1 \times \text{PBS Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ plus 0.1 % SDS for the dilutions (*see Note 7*).
4. Incubate at 56°C for 10 min to disrupt viral capsids and release viral genomes.
5. Centrifuge the tubes at $4,500 \times g$ for 5 min.
6. Measure the optical density of the supernatants at 260 nm (OD_{260}) (*see Note 8*).
7. Calculate the titer expressed in viral genomes/mL (vg/mL) using the following equation:

$$\text{Titer (vg / mL)} = \text{OD}_{260} \times \text{Dilution factor} \times 1.1 \times 10^{12} \quad (2)$$

3.4 Measurement of Viral Productivity

It is important to analyze viral productivity when a new virus is used. Good productivity of HAdV-5 can be obtained in HEK-293 cells as they express high levels of integrins and CAR receptor. However, chimeric vectors lacking the HAdV-5 fiber protein may not efficiently infect permissive HEK-293 cells, making vector amplification inefficient and viral productivity per cell very low, as it happens for chimeric HAdV-5/40 vectors [9].

$$\text{Productivity (vg / cell)} = \frac{\text{Titer (vg / mL)} \times \text{Total viral volume (mL)}}{\text{Number of cells used}} \quad (3)$$

$$\text{Productivity (IU / cell)} = \frac{\text{Titer (IU / mL)} \times \text{Total viral volume (mL)}}{\text{Number of cells used}} \quad (4)$$

3.5 Analysis of Adenoviral Replicative Cycle

Adenoviral replicative cycle represents the time elapsing between the adenovirus entry and the progeny release from the cell. Since a premature harvest leads to a poor production due to the insufficient virion encapsidation and maturation, it is crucial to know the viral cycle to achieve a high production yield. Similarly, in a late harvest most of the particles may have been released to the culture medium, leading to a harder purification and bigger material expenditure. Therefore, to optimize the adenovirus production is important to determine the optimal harvest time in which the viral particles are mostly mature and still are inside the cells.

Interestingly, as a consequence of the role of the fiber in the entry and trafficking of the virus particle towards the nucleus, replacement of the fiber protein is enough to alter the length of the virus life cycle [9]. For example, the cycle of the chimeric adenovirus HAdV-5/40s is delayed 20–24 h compared to the HAdV-5 cycle. Therefore, before performing a large-scale production, the harvest time for a new chimeric adenovirus should be empirically optimized to maximize the yield.

1. Seed 150,000 HEK-293 cells per well of a 24-well plate. Add 500 μL of growing medium. Samples must be harvested at 24, 36, 40, 44, 48, 52, 56, and 60 h post-infection, with a minimum of $n = 3$ wells per time point (*see Note 9*).
2. Add 3.75×10^6 Infection Units (IU) from your pre-stock to 12.5 mL of infection medium. Mix by inversion. These values allow to infect 25 wells at an MOI of 5 in a volume of 500 μL /well.
3. Replace the growing medium with 500 μL of the medium-virus mix generated in the previous step (*see Note 10*).
4. Fifteen hours later, replace the medium with fresh infection medium to remove the excess of virus used in the infection.

5. Harvest the samples at the indicated times. Collect both supernatant and cells in a tube and store it at -80°C . Repeat for all the sampling times.
6. Freeze/thaw three times.
7. Thaw the samples and centrifuge for 5 min at $4,500\times g$. Transfer the supernatant into a new tube and discard the pellet.
8. Plate new HEK-293 cells in a 96-well plate at a 70 % of confluence to titrate the samples (*see Note 11*).
9. From each sample in **step 7** save volumes of 10, 1, 0.1, or 0.01 μL and dilute to a total volume of 100 μL of infection medium.
10. Forty-eight hours after the infection count the infected cells by using the reporter gene or the hexon-antibody immunocytochemistry-based protocol. Calculate the IU/mL per sample, as described in Subheading 3.3.1. The time point with the highest value is the optimal time for harvesting the vector. As observed in Fig. 1, 56 h is the recommended harvesting time for the chimeric HAdV5-40s vector (*see Note 12*).

3.6 Chimeric Adenoviral Production from a Pre-stock

1. Plate twenty 150-mm petri dishes with HEK-293 cells at a confluency of 70 %. Add growing medium up to a final volume of 18 mL.
2. Twenty-four hours later, replace the growing medium with 12 mL of infection medium.
3. Calculate the amount of virus to infect twenty 150-mm plates with an MOI of 5, and dilute in 20 mL of infection medium. Add 1 mL of the mix per plate.

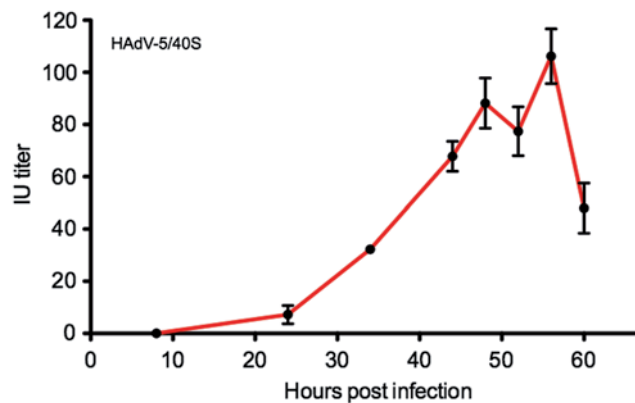


Fig. 1 Replicative cell cycle of the chimeric HAdV-5/40S vector in HEK-293 cells. According to this, the replicative cycle is between 48 and 56 h post-infection. The values are represented as percentage of the highest titer obtained

4. Optional: Add polybrene to a final concentration of 9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ to facilitate the interaction between cells and adenoviral particles. It is highly recommended when the IU/PP ratio of your pre-stock is worse than 1/100.
5. At the optimal harvest time collect cells and supernatant in 50-mL tubes.
6. Centrifuge for 5 min at $300 \times g$. Pool the pellets and resuspend it in 15-18 mL of supernatant.
7. Perform three freeze/thaw rounds ($-80\text{ }^\circ\text{C}/37\text{ }^\circ\text{C}$).
8. After the last thaw, centrifuge the cell lysate for 5 min at $4,500 \times g$ and recover the supernatant.
9. Purify the virus as described in Subheading 3.2.

3.7 Production in Suspension 211BS Cell Cultures

There are some adenoviral serotypes whose productivity per cell is very inefficient [10, 11]. Therefore classical standard amplification procedures must be avoided and more efficient systems like large-scale production in cell suspension are highly recommended. This is the case of the enteric adenoviruses as the Human Adenovirus 40 serotype (HAdV-40), which due to their inefficient productivity are also known as *fastidious virus*. Interestingly, chimeric Adenovirus 5/40S (HAdV-5/40S) carrying the HAdV-40 short fiber on the HAdV-5 capsid preserves the enteric tropism of the HAdV-5/40S [12] but also the inefficient productivity.

To address this issue we have developed a protocol (*see* Fig. 2) based on the addition of polybrene during the amplification steps in combination with the use of 211BS cells (expressing constitutively HAdV-5 fiber) as producer cells [9]. First, polybrene interacts with negatively charged adenoviral capsids facilitating their interaction with the cell membrane [13, 14], which increases virus transduction. Second, 211BS cells allow to generate mosaic virions containing both F5 and F40S fiber proteins. The fiber mosaicism improves the infectivity of the chimeric virions during the amplification cycles by facilitating an efficient cell entry mediated by the CAR-F5 interaction, which together with the addition of polybrene reduces the number of amplification cycles and the duration of the process. Finally, to further facilitate production of the chimeric vectors, 211B cells are grown in suspension, thus allowing to easily up-scale the production process in bioreactors.

3.7.1 First Viral Amplification Step in 211BS from Pre-stock with Polybrene

The procedure described here has been designed to use a single amplification step in a single flask of 211BS. However, variations in the number of flasks, or the number of amplification steps can be adapted easily.

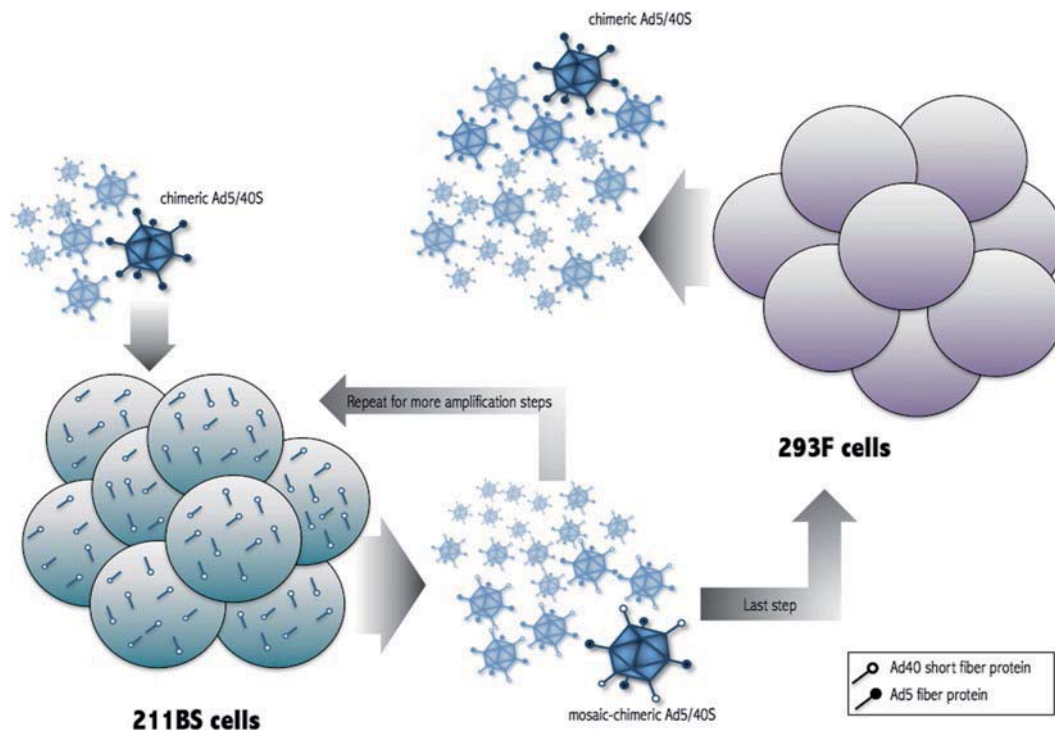


Fig. 2 Amplification strategy of chimeric HA5V-5/40S vectors. The first amplification and intermediate steps are performed in 211BS cells. Last step is carried out in 293F cells to obtain pure chimeric HA5V-5/40S vectors

1. Seed 10^6 211BS cells/mL in one 125 mL shake flask (25 mL working volume) in Infection Medium. Keep the culture in suspension by agitation in an orbital shaker at a speed of 110 rpm, 37 °C and 5 % CO₂.
2. Add polybrene to a final concentration of 9 µg/mL (*see Note 13*).
3. Infect cells with the vector pre-stock at an MOI of 1 (*see Note 14*).
4. Four hours post-infection, supplement the cell culture with 0.5 % FBS.
5. Optional step: if vector expresses a fluorescent marker protein, such as GFP, the infection efficiency can be estimated by fluorescent microscopy at 30 h post-infection (*see Note 15*).
6. Harvest cell cultures at 56 h post-infection and store at -80 °C.
7. Lyse cells by three freeze/thaw cycles in order to release the virus from cells.
8. Centrifuge at $1,620 \times g$ for 5 min to remove cell debris.
9. Store at -80 °C.

3.7.2 Last Viral Amplification Step in 293S Cells

Last amplification step of the chimeric adenovirus should be performed in 293F cells (*see* **Note 16**).

1. Seed 10^6 293F cells/mL in 1 L shake flasks (400 mL working volume) in Infection Medium.
2. Add polybrene to a final concentration of 9 $\mu\text{g}/\text{mL}$.
3. Infect cell cultures by adding the cell lysate from **step 9** of the previous amplification procedure.
4. Change the cell culture media to fresh media at 4–6 h post-infection by centrifugation at $180\times g$ for 5 min (*see* **Note 17**).
5. Harvest cells at the optimal harvest time found in Subheading 3.5 (56 h post-infection for HAdV-5/40S) and centrifuge for 5 min at $180\times g$.
6. Resuspend the cell pellet in 20 mL of supernatant and store at -80°C .
7. Optional step: If the virus genome carries the Death Protein (ADP) gene, the supernatant should be concentrated down to 20 mL using a Midjet system.
8. Lyse the cell pellet by three freeze/thaw cycles. Remove cell debris by centrifugation for 5 min at $1,150\times g$.
9. Purify the crude viral stock following Subheading 3.2.

4 Notes

1. Before digesting, check if the adenoviral sequence has internal *PacI* cleavage sites. If this is not the case, use another restriction enzyme to digest the bacterial sequences.
2. It is recommended to use a control plate transfected with an irrelevant plasmid to test the PEI's toxicity.
3. Use a control plate to compare the cytopathic effect.
4. It is recommended to use a noninfected plate as control.
5. As freeze/thaw cycles affect the stability of the vectors, we recommend to aliquot vectors in small volumes (e.g., 10, 50, and 100 μL aliquots).
6. To calculate the titer by "end point dilution" do not count the number of infected cells because in the positive wells is possible to find a high number of infected cells if waiting for more than one replicative cycle.
7. When using a different resuspension buffer, add SDS to a final concentration of 0.1 % to disrupt the capsids.
8. The OD_{260} must be within the lineal range of your spectrophotometer. If not, repeat the previous steps with different viral dilutions.

9. The indicated time points are only a suggestion. Different time points may also be used. In addition, it is also recommended to seed three extra noninfected wells as negative controls.
10. HEK-293 cells are poorly attached to the plate surface, especially after being infected by an adenovirus. All media replacements must be done very gently.
11. Avoid working with confluences higher than 80 % because highly confluent cells are poorly infected by the adenovirus, and leads to underestimation.
12. It's recommended to discard the values when the percentage of positive cells is higher than a 10 %. In higher percentages probably some of the positive cells are infected by more than one infectious particle, which will lead to underestimation of the titer. If most of the time points have percentages of infection higher than 10 % adjust the dilutions properly from **step 9** and repeat the experiment.
13. Polybrene-mediated enhancing effects on adenovirus infection are observed only when using Freestyle serum-free medium, whereas SFMII medium completely blocks the effect of polybrene. This has also been described for other cationic molecules such as polyethylenimine (PEI) [15].
14. MOI is the number of viral infection units per cell and it depends on the cell type and the environmental conditions during infections.
15. The time at which the marker protein is visible at the fluorescent microscopy depends on the viral cycle of each vector. For example, 30 h post-infection for Ad5 or 48 h post-infection for Ad5/40.
16. HAdV-5/40S produced by 211BS cells are expected to have both, F5 and F40S proteins (mosaic-chimeric HAdV-5/40S), whereas HAdV-5/40 produced by 293F cells should only display F40S on their surface (chimeric HAdV-5/40S). In order to maximize the amplification of HAdV-5/40S, these vectors should be grown in 211BS. However, to obtain pure chimeric (not mosaic) HAdV-5/40S particles, the last step of amplification has to be performed in 293F cells.
17. Most viral particles infect the cells during the first 4–6 h post-infection. After this time, it is important to change the medium to clear the viral particles that have not entered into the cells and thus, remove the contaminating chimeric-mosaic particles used in the infection from the final step.

References

1. Kojaoghlanian T, Flomenberg P, Horwitz MS (2003) The impact of adenovirus infection on the immunocompromised host. *Rev Med Virol* 13:155–171
2. Haddada H, Cordier L, Perricaudet M (1995) Gene therapy using adenovirus vectors. *Curr Top Microbiol Immunol* 199(Pt 3):297–306
3. Wivel NA, Gao G, Wilson JM (1999) Adenovirus vectors. The development of human gene therapy. Cold Spring Harbor monograph series, pp 87–110
4. Thomas CE, Ehrhardt A, Kay MA (2003) Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nat Rev Genet* 4:346–358
5. Verma IM, Weitzman MD (2005) Gene therapy: twenty-first century medicine. *Annu Rev Biochem* 74:711–738
6. Gall J, Kass-Eisler A, Leinwand L, Falck-Pedersen E (1996) Adenovirus type 5 and 7 capsid chimera: fiber replacement alters receptor tropism without affecting primary immune neutralization epitopes. *J Virol* 70:2116–2123
7. Nakamura T, Sato K, Hamada H (2003) Reduction of natural adenovirus tropism to the liver by both ablation of fiber-coxsackievirus and adenovirus receptor interaction and use of replaceable short fiber. *J Virol* 77:2512–2521
8. Roberts DM, Nanda A, Havenga MJ, Abbink P, Lynch DM, Ewald BA et al (2006) Hexon-chimaeric adenovirus serotype 5 vectors circumvent pre-existing anti-vector immunity. *Nature* 441:239–243
9. Miralles M, Segura MM, Puig M, Bosch A, Chillon M (2012) Efficient amplification of chimeric adenovirus 5/40S vectors carrying the short fiber protein of Ad40 in suspension cell cultures. *PLoS One* 7:e42073
10. Sherwood V, Burgert HG, Chen YH, Sanghera S, Katafigiotis S, Randall RE et al (2007) Improved growth of enteric adenovirus type 40 in a modified cell line that can no longer respond to interferon stimulation. *J Gen Virol* 88:71–76
11. Tiemessen CT, Kidd AH (1994) Adenovirus type 40 and 41 growth in vitro: host range diversity reflected by differences in patterns of DNA replication. *J Virol* 68:1239–1244
12. Rodriguez E, Romero C, Ferrer M, Burgueño JF, Rio A, Gil E, Hamada H, Bosch A, Gasull MA, Fernandez E, Chillon M (2006) Therapeutic potential of the Chimeric Adenovirus 5/40 as a vector for intestine directed gene therapy. *Mol Ther* 13:S5
13. Arcasoy SM, Latoche JD, Gondor M, Pitt BR, Pilewski JM (1997) Polycations increase the efficiency of adenovirus-mediated gene transfer to epithelial and endothelial cells in vitro. *Gene Ther* 4:32–38
14. Jacobsen F, Hirsch T, Mittler D, Schulte M, Lehnhardt M, Druecke D et al (2006) Polybrene improves transfection efficacy of recombinant replication-deficient adenovirus in cutaneous cells and burned skin. *J Gene Med* 8:138–146
15. Geisse S, Di Maiuta N, Ten Buren B, Henke M (2005) The secrets of transfection in serum-free suspension culture. In: Godia F, Fussenegger M (eds) *Animal cell technology meets genomics*. ESACT Proceedings. Springer, Netherlands, pp 373–376