



Universitat Autònoma de Barcelona

CENTRE DE BIOTECNOLOGIA ANIMAL I TERÀPIA GÈNICA

DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR

PROGRAMA DE DOCTORAT EN BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR

**Caracterització i anàlisi del potencial terapèutic de
l'Adenovirus 5/40 quimèric de tropisme específic
intestinal com a vector de teràpia gènica per al
tractament de la Malaltia Inflamatòria Intestinal**

TESIS DOCTORAL

ESTER RODRÍGUEZ AGUILAR

Desembre, 2015



Universitat Autònoma de Barcelona

**Caracterització i anàlisi del potencial terapèutic de l'Adenovirus
5/40 quimèric de tropisme específic intestinal com a vector de
teràpia gènica per al tractament de la Malaltia Inflamatòria Intestinal**

Memoria presentada per

Ester Rodríguez Aguilar

Beneficiària d'una beca predoctoral de formació de personal investigador 2004FI 00970
de la Generalitat de Catalunya

Per a optar al grau de

Doctor en Bioquímica i Biologia Molecular

Tesis realitzada sota la direcció del Dr. Miguel Chillón, del Centre de Biotecnologia
Animal i Teràpia Gènica i del Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la
Universitat Autònoma de Barcelona

El director

Doctoranda

Miguel Chillón Rodríguez

Ester Rodríguez Aguilar

Desembre 2015

A la meva mare i al meu pare

*“Detrás de tus miedos se encuentran tu gran felicidad,
tras lo que temes está lo que deseas”*

ABREVIATURES.....	1
RESUM.....	7
INTRODUCCIÓ.....	11
1. MALALTIA INFLAMATORIA INTESTINAL.....	13
1.1. Factors genètics i ambientals de la IBD.....	14
1.1.1. Factors genètics de la IBD.....	14
1.1.2. Factors ambientals de la IBD.....	15
1.2. Aspectes immunològics de la IBD.....	16
1.3. Tractaments actuals de la Malaltia Inflammatory Intestinal.....	17
1.4. Arquitectura de l'intestí.....	20
2. MODEL EXPERIMENTAL DE IBD EN ROSEGADORS.....	22
2.1. Models induïts químicament.....	23
2.2. Models de colitis induïts genèticament.....	24
2.3. Models de colitis espontània.....	25
2.4. Models de transferència cel·lular.....	26
3. TERÀPIA GÈNICA.....	26
3.1. Teràpia gènica.....	26
3.2. Tipus de teràpia gènica.....	28
3.3. Mètodes d'administració gènica.....	29
4. ADENOVIRUS.....	31
4.1. Estructura i genoma de l'adenovirus.....	31
4.2. Cicle de l'adenovirus.....	34
4.3. Construcció de vectors adenovirals.....	38
4.4. Adenovirus de 1a i 2a generació (clàssics).....	39
4.5. Adenovirus 40 i 41 del subgrup F.....	40
4.6. Adenovirus Quimèrics.....	42
5. TERÀPIA GÈNICA DE TRASTORNS INTESTINALS.....	43
5.1. Retrovirus i lentivirus.....	44
5.2. Vectors de virus adeno-associats.....	45
5.3. Vectors adenovirals.....	45
OBJECTIUS.....	49
RESULTATS.....	53
1. CARACTERITZACIÓ DEL FIBER DELS ADENOVIRUS QUIMÈRICS.....	56
1.1. Verificació de la presència del fiber en els adenovirus quimèrics 5/40.....	56
1.2. Amplificació d'adenovirus quimèrics 5/40 amb gens marcadors.....	58

1.3.	Caracterització del cicle viral dels adenovirus quimèrics	61
1.4.	Anàlisi de la inestabilitat de la càpsida dels adenovirus quimèrics	62
1.5.	Anàlisi de l'entrada dels vectors quimèrics a la cèl·lula (trafficking)	63
1.6.	Anàlisi del tropisme in vitro dels adenovirus quimèrics	65
2.	CARACTERITZACIÓ DELS ADENOVIRUS QUIMÈRICS 5/40 COM A VECTORS DE TERÀPIA GÈNICA	70
2.1.	Resistència a pH àcid	70
2.2.	Resistència a proteases	73
2.3.	Tropisme dels adenovirus quimèrics 5/40 en cultius primaris d'intestí i explants	73
2.4.	Biodistribució dels adenovirus quimèrics 5/40 en animals sans	75
2.5.	Biodistribució dels adenovirus quimèrics 5/40 en el model murí DSS	82
3.	GENERACIÓ ADENOVIRUS QUIMÈRICS 5/40 AMB GENS MARCADORS PER A TERÀPIA GÈNICA DIRIGIDA A L'INTESTI	84
3.1.	Generació de nous adenovirus amb fiber quimèric	84
	DISCUSSIÓ	89
	CONCLUSIONS	99
	MATERIAL I MÈTODES	103
1.	MATERIALS	105
1.1.	Vectors plasmídics i soques bacterianes	105
1.2.	Vectors virals	105
1.3.	Cultius in vitro	106
1.4.	Animals	106
2.	MÈTODES	108
2.1.	Obtenció i anàlisi de DNA	108
2.1.1.	<i>Minipreparacions de DNA plasmídic</i>	108
2.1.2.	<i>Maxipreparacions de DNA plasmídic</i>	108
2.1.3.	<i>Preparació de bacteries quimiocompetents</i>	109
2.1.4.	<i>Transformació bacteriana</i>	110
2.1.5.	<i>Electroforesis de DNA en gel d'agarosa</i>	110
2.1.6.	<i>Purificació de fragments de DNA</i>	111
2.1.7.	<i>Quantificació del DNA</i>	111
2.1.8.	<i>Digestió mitjançant enzims de restricció</i>	111
2.1.9.	<i>Clonació</i>	111
2.1.9.1.	<i>Clonació per lligació</i>	111
2.1.9.2.	<i>Clonació per recombinació homòloga en bacteris</i>	112
2.1.10.	<i>Amplificació de fragments de DNA mitjançant PCR</i>	112
2.1.11.	<i>Mutagènesis dirigida</i>	113
2.1.12.	<i>Seqüenciació</i>	114

2.2. Obtenció i anàlisi de proteïnes	115
2.2.1. <i>Extracció de proteïnes a partir de partícules virals</i>	115
2.2.2. <i>Extracció de proteïnes a partir d'extractes cel·lulars</i>	115
2.2.3. <i>Quantificació de proteïnes</i>	115
2.2.4. <i>Electroforesis desnaturalitzant (SDS-PAGE)</i>	116
2.2.4.1. <i>Electrotransferència</i>	116
2.2.4.2. <i>Immunodetecció</i>	117
2.3. Tècniques generals de cultius cel·lulars	118
2.3.1. <i>Manteniment de cultius cel·lulars en monocapa</i>	118
2.3.2. <i>Criopreservació: congelació i descongelació de vials</i>	119
2.3.3. <i>Introducció de DNA plasmídic en cèl·lules per transfecció</i>	119
2.3.4. <i>Cultius primaris de cèl·lules de colon de ratolí</i>	120
2.4. Vectors virals	121
2.4.1. <i>Generació i titulació de vectors adenovirals</i>	121
2.4.1.1. <i>Preparació del genoma viral per a la seva transfecció en cèl·lules HEK-293</i>	121
2.4.1.2. <i>Transfecció i ampliació dels vectors adenovirals</i>	121
2.4.1.3. <i>Purificació dels vectors adenovirals</i>	122
2.4.1.4. <i>Titulació dels vectors adenovirals</i>	122
2.4.2. <i>Producció dels adenovirus quimera Ad5/40</i>	123
2.4.3. <i>Infecció de cèl·lules amb vectors virals</i>	123
2.4.4. <i>Extracció de DNA viral desde virus purificat</i>	123
2.4.5. <i>Electroforesis no desnaturalitzant en gel d'agarosa</i>	124
2.4.6. <i>Microscòpia electrònica de partícules adenovirals</i>	124
2.4.7. <i>Anàlisi de tropisme in vitro dels vectors quimèrics</i>	124
2.4.8. <i>Anàlisi de la cinètica d'unió del virus a la membrana cel·lular (Binding)</i>	125
2.4.9. <i>Producció d'adenovirus marcats radioactivament</i>	125
2.4.10. <i>Determinació del cicle viral</i>	125
2.4.11. <i>Anàlisi de la resistència a pH àcid</i>	126
2.4.12. <i>Anàlisi de la resistència a proteases</i>	126
2.4.13. <i>Infecció de cèl·lules SKOV-3 amb adenovirus incubats amb Factor X</i>	127
2.4.14. <i>Anàlisi de l'expressió de GFP per citometria de flux</i>	127
2.5. Tècniques d'experimentació animal	127
2.5.1. <i>Estudis de biodistribució d'adenovirus en ratolins sans</i>	127
2.5.2. <i>Estudis de biodistribució d'adeno-associats en ratolins sans</i>	128
2.5.3. <i>Estudis de biodistribució d'adenovirus en model murí de colitis induïda</i>	129
2.5.4. <i>Extracció del material cel·lular i anàlisi per luminometria</i>	129
2.5.5. <i>Estudis histopatològics</i>	130

2.5.5.1. <i>Hematoxilina-eosina (HE)</i>	130
2.5.5.2. <i>Immunohistoquímica</i>	130
2.5.6. <i>Anàlisi fluorescència</i>	131
2.5.7. <i>Anàlisi estadístic</i>	131
BIBLIOGRAFIA	133
ANNEXES	153
1. Article: Short-fiber protein of ad40 confers enteric tropism and protection against acidic gastrointestinal conditions	
2. Patent: Método para la producción de adenovirus mosaico	

ABREVIATURES

A: Aguda

AAV: virus adenoassociat

Ad: Adenovirus

ADP: Adenoviral Death Protein

ANOVA: anàlisi de variances

β-gal: β-galactosidasa

BSA: Albúmina bovina sèrica

°C: graus centígrads

C: Crònica

CAR: Receptor de Coxsackievirus B i d'Adenovirus

CD: Malaltia de Crohn

CD3: Grup de diferenciació 3

CD4: Grup de diferenciació 4

cm: centímetres

Ci: Curie

CMV: citomegalovirus (i el seu promotor)

CO₂: Diòxid de carboni

CPE: Efecte citopàtic

CsCl: clorur de cesi

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DNA: àcid desoxiribonucleic (de l'anglès *DesoxiriboNucleic Acid*)

DO: Densitat òptica

dsDNA: DNA de doble cadena

DSS: dextrà sulfat de sodi

ECM: Medi de cèl·lules endotelials

E.coli: *Escherichia coli*

EDTA: àcid etilen-diamino-tetraacètic

EGF: factor de creixement endotelial

FBS: sèrum fetal boví (de l'anglès *Fetal Bovine Serum*)

F/T: congelació/descongelació

G: unitat de gravetat

GFP: proteïna verd fluorescent

h: Hora

HCl: àcid clorhídric

HSV: Herpes virus

IBD: Malaltia inflamatòria intestinal

IFN: Interferó

Ig: Immunoglobulina

IGF: factor de creixement similar a la insulina (de l'anglès *Insulin-like Growth Factor*)

IL: Interleuquina

ip: intraperitoneal

ITR: Inverted terminal repeat

IU: Unitats infeccioses

Kb: kilobase

KDa: kiloDalton

KO: *knock-out*

L: litre

LB: Medi Luria Broth

LacZ: lac operon

M: molar

mg: mil·ligram

min: minut

µg: micrograms

MgCl₂: Clorur de magnesi

MHC: Complex d'histocompatibilitat principal

mL: Mil·lilitre

mM: milimolar

mm: mil·limetre

µL: microlitre

MOI: Multiplicitat d'infecció

mRNA: microRNA
NaCl: Clorur de sodi
NaOH: Hidròxid sòdic
NK: natural killer
Nm: Nanòmetre
NOD: Domini d'oligomerització d'unió de nucleòtids
nM: Nanomolar
NTP: trifosfats de nucleòtids amb desoxiribosa
o/n: durant tota la nit (overnight)
PAGE: Electroforesi en gel de poliacrilamida
pb: parell de bases
PBS: solució salina amb fosfat
PCR: reacció en cadena de la Polimerasa
PEI: polietilenimina
pl: punt isoelèctric
PM: pes molecular
PP: Partícules físiques
RbCl: Clorur de Rubidi
RCA: Partícules competents en replicació
RLU: Unitat de llum relativa
RNA: Àcid ribonucleic
RNAi: RNA de interferència
SDS: dodecil-sulfat de sodi
SGF: fluid gàstric artificial
shRNAi: short harpins RNA de interferència
ssDNA: DNA de cadena senzilla
TAE: Tris-acetato-EDTA
TEMED: tetrametilendiamina
Th: Cèl·lules T helper
TLR: Receptors toll-like

TNBS: Àcid trinitrobenzenesulfonic

TNF: Factors de necrosi tumoral

Treg: Cèl·lules T reguladores

Tris: Tris (hidroximetil)aminometà

U: Unitat

UC: Colitis ulcerosa

vg: genomes virals

RESUM

La Malaltia Inflamatòria Intestinal (IBD) engloba un grup de malalties (entre les quals la malaltia de Crohn i la colitis ulcerosa) que es caracteritzen per una inflamació crònica del tub digestiu. La IBD requereix un tractament mèdic i farmacològic a la mida, ja que no tots els pacients responen a les teràpies establertes i sovint aquests medicaments poden causar efectes secundaris greus. Per això, la IBD és la patologia crònica més important que afecta al tracte gastrointestinal en humans. Actualment existeixen diferents tipus de teràpies per a la IBD que permeten millorar la qualitat de vida dels pacients, però tot i que totes representen avanços significatius, cap d'aquestes teràpies aconsegueix eliminar totalment la malaltia.

La teràpia gènica és una de les disciplines de la biomedicina amb més futur pel tractament de malalties d'origen genètic, però també en malalties en que la patologia no està determinada per un sol gen sinó que hi ha una alteració de la homeòstasis del sistema, com en el cas del càncer, les malalties cardiovasculars o les malalties neurològiques. Per tant la teràpia gènica sembla una alternativa prometedora per administrar localment a l'intestí una teràpia per a la IBD. Dintre de la família dels adenovirus, els vectors més utilitzats en teràpia gènica, hi ha el subgrup F (Ad40 i Ad41) que tenen tropisme intestinal. Aquests adenovirus però, es caracteritzen per la presència de dos *fibers* de diferent mida enlloc d'un i pel seu pobre creixement en condicions de laboratori. La majoria de vectors adenovirals utilitzats en teràpia gènica estan basats en els serotips 2 i 5 del subgrup C, però mitjançant el pseudotipatge, es pot substituir els gens que codifiquen la proteïna *fiber* de l'Ad5 per gens que codifiquen per la proteïna *fiber* curta de l'Ad40. D'aquesta manera, a més de canviar el tropisme natural de l'Ad5 pel tropisme del nou *fiber*, es millora la seva producció i es facilita molt significativament la clonació de gens terapèutics. Així doncs, ens vam proposar caracteritzar i analitzar el potencial terapèutic d'adenovirus quimèrics 5/40 de tropisme específic intestinal per a la futura aplicació com vectors de teràpia gènica per a la Malaltia Inflamatòria Intestinal.

En la primera part d'aquest treball ens vam centrar en caracteritzar els vectors quimèrics per tal de determinar les possibilitats reals per convertir-se en vectors de teràpia gènica. En primer lloc es va optimitzar el protocol de producció dels vectors, augmentant l'eficiència de 2-4 vegades a 20 i 25 vegades per cada cicle, i es va estudiar quines noves característiques conferia el *fiber* curt de l'Ad40 a les partícules de l'Ad5.

En la segona part es va avaluar la capacitat dels vectors quimèrics com a vectors de teràpia gènica a l'intestí. Es va comprovar que la presència del *fiber* augmentava la resistència a pH àcid dels vectors (tot i que no a proteases) i es va estudiar la biodistribució i bioseguretat d'aquests vectors

en ratolins per tres vies diferents: oral, rectal i intravenosa mitjançant la quantificació de l'expressió de β -gal per luminometria i l'anàlisi histològic i immunohistoquímic de la transfecció adenoviral. Els resultats van mostrar que els adenovirus quimèrics administrats per la via rectal eren més eficients que l'Ad5, transfectant cèl·lules epitelials en vellositats i criptes intestinals, cèl·lules enteroendocrines i macròfags locals de la mucosa intestinal. Un cop avaluada la capacitat dels adenovirus quimèrics d'infectar l'intestí de ratolins sans, es va procedir a avaluar si mantenia la seva infectivitat en un model murí de MMI, escollint el model de colitis induïda per DSS. Malauradament en aquest model, la translocació bacteriana emmascara l'activitat β -gal procedent dels vectors quimèrics.

En la tercera part d'aquest treball es van generar nous vectors quimèrics que permetessin la clonació fàcil i ràpida de qualsevol gen terapèutic.

En resum, en aquest treball demostrem que amb el pseudotipatge del *fiber* curt de l'Ad40 es transfereixen moltes de les característiques singulars dels Adenovirus entèrics, i es proposa un protocol optimitzat per a la seva producció a nivells equivalents als de l'Ad5. Els nostres resultats també suggereixen que l'adenovirus quimèric F/40S es un excel·lent candidat com a vector estratègia de teràpia gènica per a l'administració de gens terapèutics a l'intestí de manera local.

INTRODUCCIÓ

1. MALALTIA INFLAMATORIA INTESTINAL

La malaltia inflamatòria intestinal (IBD) engloba un grup de malalties (entre les quals la malaltia de Crohn i la colitis ulcerosa) d'etiologia complexa, multifactorial i desconeguda, que es caracteritzen per una inflamació crònica del tub digestiu (Taula 1).

Taula 1. Característiques diferencials entre la Malaltia de Crohn i la Colitis Ulcerosa

MALALTIA DE CROHN	COLITIS ULCEROSA
Afecta TOT TUB DIGESTIU	Afecta el RECTE i/o COLON
Afecta 3 capes	Afecta la capa mucosa
Poques diarrees i no hemorràgiques	Diarrees freqüents, intenses i hemorràgiques
Malabsorció	No hi ha malabsorció
Dolor Abdominal	No és freqüent dolor abdominal
Transmural	Superficial
Granulomatosa	Presenta Pseudopòlips

La incidència i prevalença de la malaltia inflamatòria intestinal (IBD) varien en funció de l'àrea geogràfica, sent més comú en països industrialitzats (Amèrica i Europa), i del moment en el qual es realitza l'estudi (Farrokhyar et al., 2001). Aquestes diferències en els estudis epidemiològics realitzats anteriorment es poden explicar per la dificultat del diagnòstic associada a aquestes malalties, però també a que actualment la població té més accés a la sanitat i a que s'han incorporat noves eines diagnòstiques. La incidència anual de la colitis ulcerosa (UC) i de la malaltia de Crohn (CD) a Europa es de 10:100.000 i 6:100.000, respectivament (Shivananda et al., 1996). La prevalença de CD a Europa varia des 1,5-2,13 casos per cada 100.000 persones, mentre que la prevalença de la UC a Europa varia des 2,4-2,94 casos per cada 100.000 persones. Extrapolant aquestes xifres per a la població total europea (aproximadament 731 milions en 2006 (Nations, 2007)), s'obtenen unes estimacions màximes de 1,1 milions de persones amb CD i 1,5 milions de persones amb UC a Europa, és a dir, un total combinat de 2,6 milions de persones amb IBD (Burisch et al., 2013). En el futur, es mantindrà la tendència a l'alça de la incidència de la IBD gràcies a la millora del diagnòstic i l'increment del coneixement de la malaltia, el que converteix la IBD en un problema de salut creixent a Europa, sobretot perquè la IBD està associada a una baixa letalitat, però a una elevada morbiditat. Així, la qualitat de vida del pacient es deteriora dia a dia per l'eficàcia limitada de les teràpies actuals, i la IBD incrementa el risc de patir càncer colorectal (Bansal and Sonnenberg, 1996). Per això, la IBD és la patologia crònica més important que afecta al tracte gastrointestinal en humans.

Malgrat el limitat coneixement que es té de l'etiopatogènia, s'han assenyalat una sèrie d'alteracions com són la pèrdua de tolerància a la flora bacteriana, l'activació d'immunòcits, la infiltració leucocitària i la producció de quantitats elevades de citoquines pro inflamàtores (TNF- α , IL-1 β , IL-6 i IL-8) tant per part d'immunòcits associats a l'intestí com per part de les pròpies cèl·lules de la mucosa. Aquestes citocines recluten al seu torn cèl·lules immunocompetents i provoquen l'amplificació de la resposta inflamatòria (Jung et al., 1995) que alterna períodes d'activitat, de severitat variable, amb períodes d'inactivitat (Dombal FT, M.J., Bouchier IAD, Watkinson G, 1993). En resum, es creu que un factor iniciador com un antigen microbià, provocaria en la mucosa del tub digestiu una resposta inflamatòria prolongada, greu i inapropiada en individus predisposats de forma genèticament (Hugot et al., 2001a; Ogura et al., 2001a).

1.1. Factors genètics i ambientals de la IBD

En l'actualitat es creu que existeix una interacció entre factors extrínsecs (mediambientals) i intrínsecs (induïts genèticament), que fan que la malaltia es desenvolupi (Sartor, 2006).

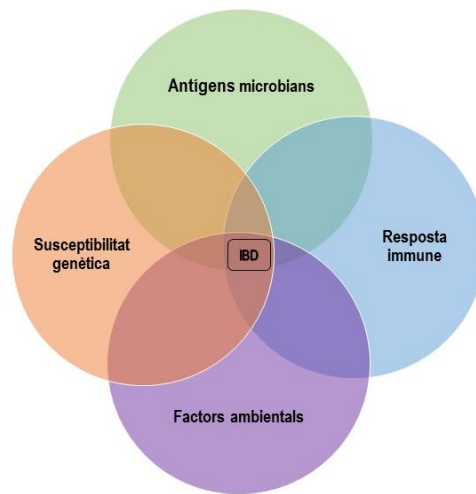


Fig. 1. Factors que contribueixen a la inflamació intestinal crònica. La susceptibilitat genètica està influenciada per la microbiota luminal, que proporciona antigens i adjuvants que estimulen la resposta immune. Els desencadenants ambientals són necessaris per iniciar o reactivar l'expressió de la malaltia. Abreviatura: IBD, malaltia inflamatòria intestinal. Adaptat de Sartor, *Nature Clinical Practice Gastroenterology & Hepatology*, 2006

1.1.1. Factors genètics de la IBD

Tant la CD com la UC es consideren malalties poligèniques complexes, és a dir, es troben implicats diferents gens amb factors ambientals, i interaccionen entre ells donant el fenotip final de la malaltia. La metodologia actual ha permès trobar associacions entre diferents gens i la

susceptibilitat de la malaltia, el fenotip i fins i tot la resposta a diversos tractaments. Mitjançant els estudis de clonació posicional i estudis d'associació amb gens candidats es van identificar els primers locus IBD6, IBD3, IBD1, IBD2, IBD4, i IBD5 (Cavanaugh, 2001; Cho et al., 1998; Hampe et al., 1999; Hugot et al., 1996; Parkes et al., 1996; Satsangi et al., 1996) i NOD2/CARD15 (Ogura et al., 2001b), i el polimorfisme en receptors toll-like (TLR) (Franchimont, 2004). En els últims 10 anys, amb la introducció dels meta-anàlisis i la col·laboració internacional s'han analitzat aproximadament 40.000 mostres de DNA de pacients amb IBD i 20.000 controls sans, descobrint 99 loci de susceptibilitat en IBD (Fig. 2). En total, s'han descrit associacions de 71 loci amb la CD i de 47 loci amb la UC 47, amb una heretabilitat de la malaltia del 23% i 16%, respectivament. L'anàlisi genètic ha aportat informació clau en la biologia de la malaltia, com per exemple l'autofàgia en la malaltia de Crohn, els defectes en la funció de barrera en la UC i el paper de la IL23 en la IBD, i el que permetrà la millora de diagnòstics, i teràpies, mitjançant la teràpia personalitzada (Anderson et al., 2011; Franke et al., 2010).

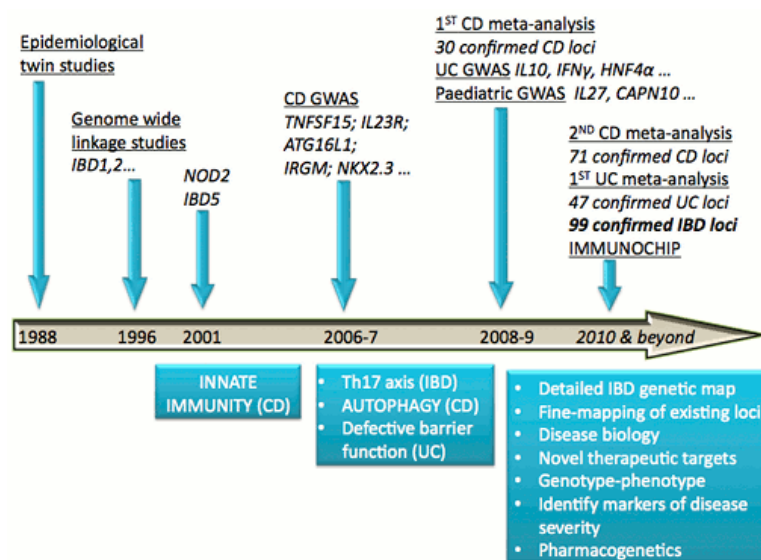


Fig. 2. Estudis genètics en IBD. Cronologia històrica dels estudis genètics en IBD. www.ibdgenetics.org/

1.1.2. Factors ambientals de la IBD

Entre les peces del complex trencaclosques que és la IBD, cal considerar la importància de determinats factors ambientals. La quantitat de factors ambientals amb els quals s'ha pretès establir una relació és llarga, però actualment, es consideren factors de risc acceptats: hàbit de fumar tabac (Rubin and Hanauer, 2000), la dieta (Reif et al., 1997), infeccions perinatales, l'ús d'anticonceptius orals, el nivell d'higiene (Gent et al., 1994) i els factors psicosocials (Levenstein et al., 2000).

1.2. Aspectes immunològics de la IBD

En condicions normals a l'intestí, existeix una inflamació controlada en resposta a qualsevol antigen extern o intern. La immunohomeòstasi a l'intestí està regulada per les interaccions cel·lulars i l'alliberació de citoquines. En la IBD es produeix una alteració d'aquest equilibri entre les citoquines proinflamàtores i les reguladores. Les evidències actuals suggereixen que en la patogènia de la IBD està implicada una alteració de la regulació de la resposta immune, genèticament determinada, davant diversos antígens intraluminals, inclosa la flora intestinal resident normal (Hugot et al., 2001b; Ogura et al., 2001a). Els diferents tipus cel·lulars implicats en la resposta immune intestinal alliberen al medi molècules immunoreguladores que juguen un paper clau en el manteniment d'una resposta adequada davant els antígens intraluminals (Fig. 3).

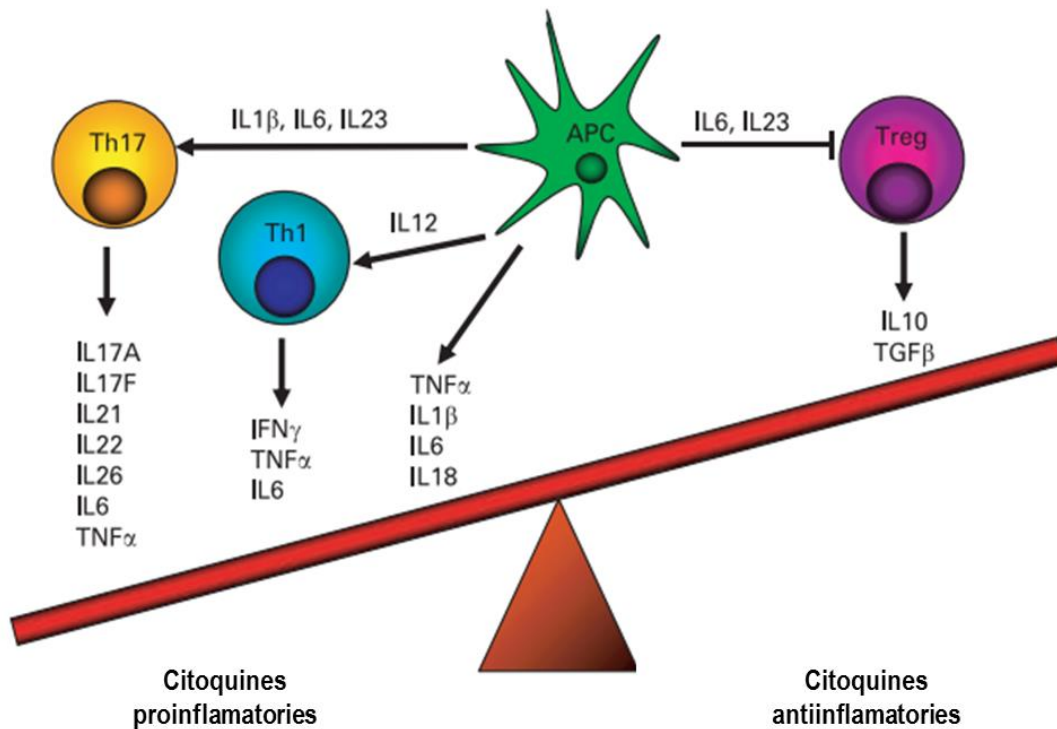


Fig. 3. Desequilibri de citoquines pro- i anti-inflamatòries en CD. Adaptat de Brand, Gut, 2009

Durant molts anys es va assumir que la inflamació en CD estava dirigida principalment per cèl·lules Th1, mentre que la UC era una inflamació tipus Th2. Les cèl·lules Th1 estan relacionades amb la protecció contra els microbis intracel·lulars, i les Th2 estan relacionades amb les al·lèrgies i la protecció contra patògens extracel·lulars. Aquesta hipòtesis estava recolzada per l'augment dels nivells de citoquines Th1 tals com interferó γ (IFN-γ) i la interleuquina 12 (IL12) en la malaltia de Crohn i per l'augment de l'expressió de determinades citocines Th2, com ara IL13 en colitis ulcerosa (Berrebi et al., 1998; Heller et al., 2005; Parronchi et al., 1997). Però en la dècada anterior

es va descobrir una nova població de cèl·lules T, de les quals destaquem les Treg i les Th17. Les cèl·lules Treg són importants en el control de la resposta immune als antígens propis, per evitar la autoimmunitat i mantenir la auto-tolerància, i les Th17 són essencials en autoimmunitat. Diversos estudis indiquen que, a més de les cèl·lules Th1, les Th17 juguen un paper molt important en la patogènesis de la CD (Gálvez, 2014) i la UC (Feng et al., 2011). Les cèl·lules Th17 expressen el receptor de la IL23 (IL23R), un heterodimer que comparteix subunitat amb la IL12, una de les citokines Th1 més potents. La majoria d'estudis es van fer amb un anticòs que reconeixia aquesta subunitat comuna, i per aquesta raó el paper de les cèl·lules Th17 va modificar completament el paradigma de Th1 i Th2 establert anteriorment.

En els últims anys s'han desenvolupat diferents models experimentals de inflamació intestinal (Veure secció 2). Aquests models han demostrat clarament que diferents tipus d'alteracions genètiques i immunològiques que afecten a diferents funcions immunes són capaces d'induir una inflamació intestinal incontrolada similar a la de la IBD humana (Kühn et al., 1993; Veltkamp et al., 2001).

1.3. Tractaments actuals de la Malaltia Inflamatòria Intestinal

La IBD és una patologia molt àmplia que requereix un tractament mèdic i farmacològic a la mida de cada pacient. La història clínica, els resultats de les proves i els símptomes són els que serveixen de guia als especialistes en aparell digestiu a l'hora de seguir un tractament.

Els principals objectius de la teràpia són aconseguir la remissió dels brots i prevenir les recidives, així com millorar la qualitat de vida dels pacients i aconseguir la curació de la mucosa, amb el menor risc possible. Això només s'aconsegueix actuant sobre la resposta immune alterada, atacant sobre diferents fronts o bé sobre els que tenen més rellevància (Gassull et al., 2007).

Avui dia existeixen diferents tipus de teràpies per a la IBD, tot i que malauradament, encara no es disposa d'un tractament curatiu a causa del limitat coneixement de la etiologia, així com la difícil predicció del curs clínic. La teràpia farmacològica és la més utilitzada, i quan la malaltia es complica es recorre a la cirurgia. En els últims anys també ha augmentat l'ús de probiòtics.

Actualment existeixen al mercat diferents tipus de fàrmacs basats en les investigacions que s'han fet de la malaltia. Aquests fàrmacs actuen sobre la resposta immune alterada i els podem classificar en:

a) Antiinflamatoris (aminosalicilats i corticoides):

Els aminosalicilats (sulfasalazina, mesalazina, olsalazina, etc.) són un grup de fàrmacs que constitueixen un dels principals agents en el tractament de la IBD (Loftus, 2006). La seva activitat es deu al seu efecte antiinflamatori local sobre la mucosa intestinal, tant quan s'administra per via oral com per via tòpica intrarectal, limitant la producció de radicals lliures i citoquines proinflamatòries com el TNF- α (Nikolaus et al.). Estan indicats com a teràpia de manteniment, en casos de corticodependències, en brots lleus de CD y UC (Klotz, 2000) refractaris a esteroides i en la prevenció de la reactivació de la UC (Sutherland et al., 2002), però la seva efectivitat es qüestionable en la CD (Sutherland, 2000).

Els corticoides (prednisona, metilprednisolona, prednisolona, etc.) constitueixen el primer agent terapèutic, ja sigui de forma oral o parenteral, en el tractament de brots moderats i greus de CD i UC (Truelove and Witts, 1955) i en els casos de falta de resposta a salicilats (Hanauer and Sandborn, 2001). Els corticoides però, tenen múltiples efectes en el sistema immunitari i disminueixen la inflamació al reduir la vasodilatació, la permeabilitat vascular, la infiltració i la proliferació leucocitària, així com la producció de diverses citoquines proinflamatòries (Zimmerman and Jewell, 1996).

b) Immunosupressors:

Aquests medicaments també redueixen la inflamació, però es dirigeixen al sistema immunològic en lloc de tractar directament la inflamació. L'objectiu es suprimir la resposta immune que indueix la inflamació en el revestiment intestinal. Per a algunes persones, una combinació d'aquests medicaments funciona millor que un fàrmac sol. En els medicaments immunosupressors s'inclouen la azatioprina, la 6-mercaptopurina, el metotrexato i la ciclosporina A. Tots ells actuen inhibint la inflamació a diferents nivells i estan aprovats per al seu ús tant en CD com en UC. El problema es que també desencadenen múltiples efectes secundaris (pancreatitis per azatioprina, toxicitat hepàtica per metotrexat, toxicitat renal i neurològica per ciclosporina) i comporten una major vulnerabilitat del pacient en front a infeccions oportunistes (Gassull et al., 2007).

c) Teràpies biològiques:

Aquest terme engloba una sèrie de tractaments basats en diferents conceptes, des de l'administració de probiòtics, proteïnes recombinants (hormones), fins a l'ús d'àcids nucleics (oligonucleòtids antisentit) o anticossos monoclonals. Dins d'aquesta última categoria existeixen

diverses estratègies: per un banda, el bloqueig de citoquines proinflamatòries com TNF- α , IFN- γ , etc. i, per un altra, la interferència en el reclutament de cèl·lules inflamatòries (Gassull et al., 2007).

Donat l'important paper que desenvolupa el TNF- α en la patogènia de la IBD, s'han generat diversos anticossos monoclonals (infiximab, adalimumab, etc.) que redueixen selectivament els efectes d'aquesta citoquina. L'infiximab es un anticòs monoclonal quimèric murí/humà, que s'uneix tant a les formes solubles com transmembrana de TNF- α , inhibint el seu efecte proinflamatori immediat (Kirman et al., 2004). Aquests fàrmacs resulten relativament eficaços tant en la remissió de la malaltia activa (sobretot en CD) com en el manteniment, al ser capaços d'induir apoptosi en monòcits i limfòcits activats (Lügering and Kucharzik, 2006; Rutgeerts et al., 2005; Sandborn et al., 2007a, 2007b). No obstant, la principal limitació de l'infiximab es la generació d'anticossos antiqumèrics (Kuhbacher and Fölsch, 2007), a més del desenvolupament d'infeccions e inclús tumors sòlids o limfomes a llarg termini (Bongartz et al., 2006). L'adalimumab, un anticòs monoclonal humà, és actualment el fàrmac anti-TNF- α més utilitzat per al tractament de CD, al mostrar importants avantatges respecte el infiximab (administració subcutània, menys efectes adversos). La relativa eficàcia dels diferents tractaments anti-TNF- α ha demostrat la implicació d'aquesta citoquina en la patogènia de la IBD.

En l'actualitat cada vegada existeixen més teràpies biològiques emergents ja que el nombre de dianes terapèutiques potencials es cada vegada més gran. Així s'han desenvolupat anticossos anti citoquines proinflamatòries com el IFN- γ (fontolizumab, anticòs monoclonal humanitzat) (Hommes et al., 2006), IL-12/IL-23 p40 (J695 anticòs monoclonal humà) (Mannon et al., 2004) i IL-18 (Monteleone et al., 1999; Pizarro et al., 1999) i la majoria d'ells han resultat efectius en CD. Així mateix, existeixen anticossos anti-CD3 (visilizumab) (Plevy et al., 2007), anti-CD4 (cMT412) (Ardizzone and Bianchi Porro, 2002), anti-receptor de la IL-2 (daclizumab) (Bosani et al., 2014), inhibidors de molècules d'adhesió, com l'anticòs monoclonal de ratolí humanitzat anti-integrines $\alpha 4\beta 1$ i $\alpha 4\beta 7$ (natalizumab), anti-IL-17A (secukinumab) (Hueber et al., 2012), amb resultats dispars en la remissió de la CD i la UC (Hueber et al., 2012; Peyrin-Biroulet et al., 2008; Sandborn et al., 2003)

L'administració de citoquines antiinflamatòries recombinants humanes com la IL-10, IL-22, IL-35 ha estat també provada en pacients IBD amb resultats controvertits, ja que tot i que alguns pacients mostren una millora de l'epiteli intestinal, la eficàcia encara és limitada (Li and He, 2004; Sands, 2001). Tot i això, la administració local de IL-10 podria ser la alternativa més prometedora, encara

que s'han de millorar i/o desenvolupar noves tècniques per produir aquesta IL-10 a nivell local (Stokkers and Hommes, 2004).

Dintre de les teràpies biològiques també trobem els probiòtics, els quals són microorganismes vius (fongs, bacteris, etc.) que administrats en la quantitat i forma adequada són beneficiosos per a la malaltia, estabilitzant la flora intestinal, augmentant la resistència a agents patògens i reforçant el sistema immunològic. Tot i això encara són necessaris més estudis per caracteritzar millor el seu paper exacte i els seus mecanismes d'acció específics en la IBD (Scaldeferri et al., 2013).

En resum, la IBD és una patologia molt àmplia que requereix un tractament mèdic i farmacològic a mida, ja que no tots els pacients responen a les teràpies establertes i sovint aquests medicaments poden causar efectes secundaris greus. Per aquesta raó és necessari definir nous fàrmacs que bloquegin les vies de senyalització específiques activades en la IBD.

1.4. Arquitectura de l'intestí

L'intestí és l'òrgan de l'aparell digestiu on s'absorbeixen els nutrients en el torrent sanguini. L'intestí prim es divideix en 3 seccions: duodè, jejú i íleum (Fig. 4.). La paret de l'intestí prim està coberta per milions de projeccions microscòpiques anomenades vellositats o villi, per on l'organisme absorbeix els nutrients. Des de l'intestí prim els aliments passen a l'intestí gruixut. Quan els aliments passen de l'intestí prim a l'intestí gruixut, el treball d'absorció ja està casi finalitzat. La principal funció de l'intestí gros és eliminar l'aigua de la matèria no digerida i formar els residus sòlids per poder excretar-los. L'intestí gros té tres parts:

- el cec (uneix l'intestí prim i l'intestí gros),
- el colon, que també es divideix en tres parts ascendent, transvers (absorbeix líquids i sals) i descendent, que reté les restes resultants
- el recte

L'epiteli intestinal és, en mamífers adults, el teixit amb més renovació (Heath, 1996). Les cèl·lules en divisió es troben confinades a les criptes de Lieberkühn, que són unes invaginacions de l'epiteli en teixit connectiu subjacent. En l'intestí prim, la descendència d'aquestes cèl·lules migra des del fons de la cripta fins a la superfície de les vellositats o villi (extensions de l'epiteli en el lumen intestinal). Les divisions d'aquestes cèl·lules en trànsit des de la regió de les cèl·lules mare fins al villi, amplifiquen el nombre de la descendència que resulta de cada divisió de les cèl·lules mare. Aquestes cèl·lules s'anomenen cèl·lules d'amplificació en trànsit i no són cèl·lules mare, perquè la

descendència es diferenciarà i morirà. En el villi s'atura la divisió i totes les cèl·lules semblen haver-se diferenciat completament. En aquest punt les cèl·lules s'exposen als continguts de l'intestí i finalment es descarten des de les puntes de les vellositats (Hall et al., 1994). El procés de renovació és continu i dura entre 2 i 7 dies. D'altra banda, en el colon no hi ha vellositats, però la organització és similar: les cèl·lules avancen cap al lumen de l'intestí i després emergeixen a la superfície al voltant de la boca de la cripta.

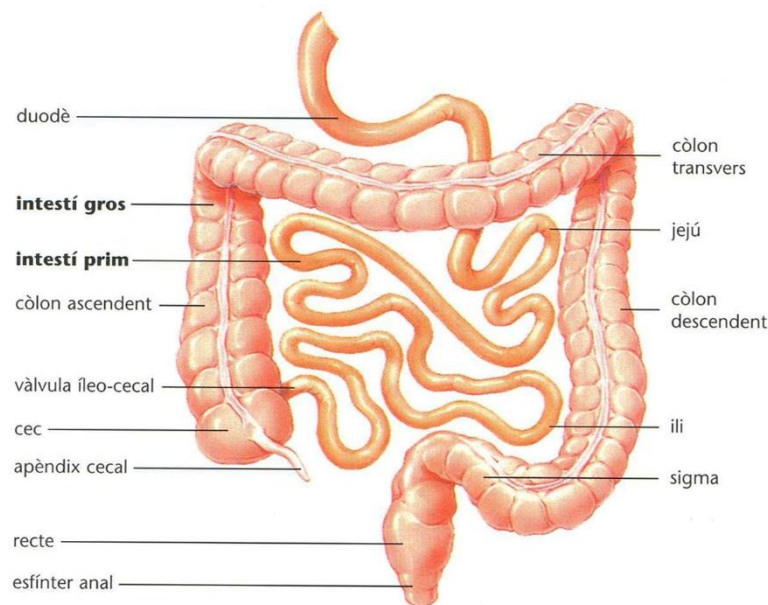


Fig. 4. Diagrama de l'intestí humà

En el procés de diferenciació es produeixen 4 tipus cel·lulars diferents (Fig. 5): cèl·lules absorbives, cèl·lules goblet, cèl·lules enteroendocrines i cèl·lules de Paneth (Cheng and Leblond, 1974):

- Les cèl·lules absorbives, també conegudes com cèl·lules columnars o enteròcits, són el tipus cel·lular majoritari. Tenen la superfície apical plena de microvil·li.
- Les cèl·lules de goblet (copa) secreten mucos, i a la zona apical del citoplasma s'hi acumulen grànuls plens de mucos
- Les cèl·lules enteroendocrines (de les quals hi han molts subtipus) són més petites i secreten hormones intestinals (pèptids i catecolamines)
- Les cèl·lules de Paneth secreten proteïnes antibacterianes (lisozim i criptidines o defensines). Les cèl·lules de Paneth es diferencien de les altres cèl·lules diferenciades en que es situen al fons de la cripta i no estan presents a l'intestí gros (Crosnier et al., 2006).

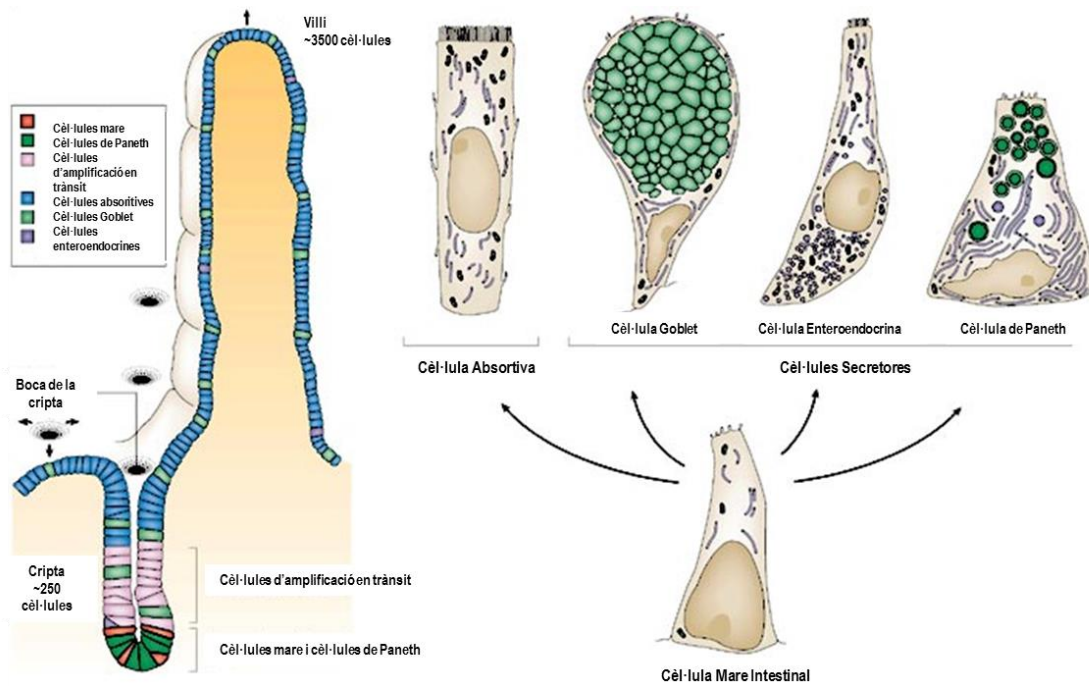


Fig. 5. Tipus cel·lulars de l'intestí i organització. Hi ha quatre classes de cèl·lules diferenciades: les cèl·lules absortives, les cèl·lules goblet, les cèl·lules enteroendocrines i les cèl·lules de Paneth. *Adaptat de Crosnier et al. Nature Reviews Genetics, 2006.*

2. MODEL EXPERIMENTAL DE IBD EN ROSEGADORS

En el moment d'iniciar aquest treball, s'havien desenvolupat aproximadament uns 20 tipus de models experimentals, amb diverses manifestacions clíniques similars a les observades en IBD. Tot i que aquests models no representen totalment la complexitat de la malaltia en humans, han estat indispensables per avançar en la comprensió dels mecanismes i dels tractaments d'aquesta malaltia i per això és important conèixer les seves característiques i limitacions.

En el model ideal de colitis, l'intestí hauria de mostrar alteracions morfològiques, inflamació, símptomes, patofisiologia similars o idèntiques a les de IBD en humans. L'animal hauria de tenir un perfil genètic molt ben definit, així com un sistema immune molt ben caracteritzat, i ser reproduïble.

Els models animals de IBD en rosegadors es poden classificar en 4 categories, de les quals hem escollit els models més representatius i/o utilitzats (veure taules 2-5). En general, els models espontanis, o genèticament modificats són dependents de factors ambientals, i la seva manifestació i severitat poden variar molt (Wirtz and Neurath, 2007). Per aquesta raó el models

animals induïbles són els que s'utilitzen habitualment, ja que tot i les seves limitacions, són assequibles i reproduïbles, i resulten molt adequats per provar noves estratègies terapèutiques.

2.1. Models induïts químicament

Aquesta categoria engloba aquells models on la inflamació del tracte intestinal s'indueix mitjançant l'administració d'agents externs, ja sigui directament en la dieta o mitjançant un enema (Taula 2). En general són models altament reproduïbles, però la microbiota i el tipus d'alimentació els pot influenciar (Kwon et al., 2005).

Taula 2. Models de colitis induïda químicament en rosegadors

MODEL	ÀREA AFECTADA	INFLAMACIÓ	MALATIA	ADMINISTRACIÓ	REFERÈNCIES
Àcid Acètic	Colon distal	A	UC/CD	Enema	MacPherson and Pfeiffer, 1978
Iodacetamida	Colon	A,C	UC/CD	Enema	Satoh et al., 1997
Indometacina	Intestí prim, Colon	A,C	CD	Dieta	Yamada et al., 1993
TNBS/Etanol	Colon	A,C	CD	Enema	Morris et al., 1989
Oxazolona	Colon distal	A,C	UC	Enema	Boirivant et al., 1998
DSS	Colon	A,C	UC	Dieta	Okayasu et al., 1990

A: aguda; C: crònica

El model més comú en l'estudi de la IBD es el model de Colitis induïda per sodi dextran sulfat (DSS), el qual detallarem a continuació, ja que es el que es va utilitzar per a realitzar els experiments *in vivo* d'aquesta tesis.

El DSS es un polisacàrid sulfatat que s'administra dissolt en l'aigua. En un únic cicle de 5-7 dies es produeix una inflamació aguda en ratolins i rates, però si es repeteixen varis cicles (alternats amb dies de descans, es produeix una inflamació crònica. Durant el procés inflamatori es produeix una pèrdua de pes, escurçament de l'intestí, úlceres a la mucosa i infiltració de neutròfils. És un model més pròxim a UC, tot i que en fases tardanes cròniques s'aproxima a CD. Inicialment va ser descrit per Okayasu (Okayasu et al., 1990) i es un model molt reproduïble.

El tipus de colitis que es produeix es considera adequat per estudiar la inflamació intestinal i per provar noves teràpies (Melgar et al., 2008; Pizarro et al., 2003). Es desconeix el mecanisme exacte pel qual es produeix la inflamació, però els estudis suggereixen una acció citotòxica directa sobre l'epiteli del colon, alterant la funció dels macròfags per fagocitosis de DSS, i un augment de l'exposició a antígens per destrucció de la barrera mucosa i la barrera epitelial (Johansson et al., 2014). Aquest fet augmenta la translocació de bacteries intraluminals i la infiltració de neutròfils i

demés cèl·lules immunitàries que, junt amb el desgast de la barrera intestinal i la resposta alterada dels macròfags, intensifica les lesions intestinals (Elson et al., 1995).

En 1998, Shintani (Shintani et al., 1998) va utilitzar el model per obtenir més evidències del paper de les cèl·lules T en el desenvolupament de la colitis induïda per DSS, demostrant el paper de les cèl·lules T CD4+ i suggerint el paper de IgG per modular el desenvolupament de la colitis. Altres treballs (Hartmann et al., 2000; Loher et al., 2003), van utilitzar el model en ratolins BALB/c i van demostrar la eficàcia de rolipram i mesopram, dos potents supressors de la síntesis de TNF- α , en la prevenció i tractament de la colitis similar a CD. També s'ha estudiat l'efecte d'oligonucleòtids antisentit NF- κ B per a disminuir la inflamació (Murano et al., 2000), que ja s'havia aconseguit amb èxit amb el model TNBS (Neurath et al., 1996). Tanmateix aquest tractament només tenia efecte si s'administrava en la fase primerenca de la inflamació, però no en fases més tardanes.

2.2. Models de colitis induïts genèticament

Aquesta categoria engloba aquells models als quals mitjançant l'ablació (Knock-out, KO) o la sobreexpressió (Transgènic, TG) d'un gen es produeix la inflamació del tracte intestinal (Taula 3). Aquests models s'utilitzen per avaluar el paper dels diferents agents involucrats en la resposta immune.

Taula 3. Models de colitis induïda genèticament en rosegadors

MODEL	ÀREA AFFECTADA	INFLAMACIÓ	MALATIA	TIPUS	REFERÈNCIES
IL-2 / IL-2R	Colon	A, C	UC	KO	Sadlack et al., 1993
IL-10	Intestí prim, Colon	C	CD	KO	Kühn et al., 1993
TCR	Colon	C	UC	KO	Mombaerts et al., 1993
IL-7	Colon	A,C	UC	TG	Watanabe et al., 1998
DN N-Cadherina	Intestí prim, Colon	C	CD	TG	Hermiston and Gordon, 1995

A: aguda; C: crònica; KO: knock-out; TG: transgènic

Un altre model important en l'estudi de la IBD es el model murí IL-10 KO. La IL-10 es produïda per les cèl·lules T, les cèl·lules B, els macròfags, les cèl·lules del timus i els queratinòcits. Té la funció de disminuir l'acció de les cèl·lules Th1, les cèl·lules NK i els macròfags. En 1993, Kuhn (Kühn et al., 1993) van observar que en ratolins IL-10 $-/-$ es produïa inflamació en tot l'intestí. Les lesions es produïen principalment en el duodè, el jejú proximal, i el colon ascendent. En el duodè i el jejú es va observar un aprimament de la paret intestinal, i en el colon es va observar pèrdua de cèl·lules de Goblet, degeneració de l'epiteli, infiltració de cèl·lules del plasma productores de IgA, i un augment en l'expressió de MHC de classe II. Com en el model IL-2 KO, segurament l'activació de

cèl·lules Th1 CD4+ i la disminució del seu inhibidor, les cèl·lules T, causen la inflamació. Aquest model es va utilitzar posteriorment com a model per avaluar el paper de la polimerasa poli (ADP ribosa) en la permeabilitat intestinal (Jijon et al., 2000) i per estudiar el paper de la vitamina D en IBD (Cantorna et al., 2000). Posteriorment es va analitzar el potencial terapèutic de anticossos anti-TNF- α (Gratz et al., 2002). Però el valor d'aquest model es va mostrar amb Lindsay (Lindsay et al., 2004), que van induir la producció de IL-10 en ratolins deficients per aquesta proteïna. Coneixent que les injeccions diàries de IL-10 són incapaces d'induir remissió quan la malaltia està establerta, van demostrar que l'administració rectal de vectors adenovirals codificant per la IL-10 (AdvmulL-10) induïa l'alliberament de IL-10 d'origen hepàtic i conduïa a una supressió de la malaltia a llarg termini, conjuntament amb canvis profunds immunoregulatoris a nivell sistèmic. Aquest tipus de teràpia gènica local era capaç de revertir la colitis i evitar els efectes sistèmics que s'observen després de l'administració intravenosa (Lindsay et al., 2004). A més a més, es va mostrar que l'administració rectal de IL-10 a un petit nombre de pacients amb UC va aconseguir una millora en els anàlisis histològics, disminució de citoquines produïdes per la làmina pròpia i disminució de cèl·lules mononuclears circulants (Rennick and Fort, 2000). No obstant, el tractament a llarg termini IL-10 encara no està suficientment avaluat, i més tenint en compte que altres citoquines també estan desregulades en pacients IBD (Marlow et al., 2013).

2.3. Models de colitis espontània

Aquesta categoria engloba aquells models on la inflamació es produeix espontàniament (Taula 4). Aquests models s'utilitzen per estudiar els factors genètics que influeixen en la malaltia.

Taula 4. Models de colitis espontània en rosegadors

MODEL	ÀREA AFECTADA	INFLAMACIÓ	MALATIA	REFERÈNCIES
C3H/HeJBir	Intestí prim, Colon	A, C	-	Sundberg et al., 1994
SAMP1/Yit	Intestí prim, Colon	C	CD	Rivera-Nieves et al., 2003

A: aguda; C: crònica

Concretament, el model C3H/HeJBir s'ha utilitzat en combinació de models amb colitis induïda, i ha estat molt útil en l'estudi i identificació de factors de susceptibilitat (Cong et al., 1998) i el model SAMP1 s'ha utilitzat en l'estudi de l'efecte de l'administració d'anticossos anti-TNF- α (Marini et al., 2003) i de l'administració d'antibiòtics com a teràpia preventiva (Bamias et al., 2002).

2.4. Models de transferència cel·lular

En aquests models la inflamació es induïda mitjançant la transferència de cèl·lules al teixit limfoide de l'hoste, generalment ratolins SCID (Taula 5).

Taula 5. Models de transferència cel·lular en rosegadors

MODEL	ÀREA AFECTADA	INFLAMACIÓ	MALATIA	REFERÈNCIES
Cèl·lules T CD4 ⁺ CD45RB ^{high} / SCID	Colon > Intestí prim	C>A	CD	Leach et al., 1996
HSP60 - T CD8 ⁺ / TCR ^{-/-} o SCID	Intestí prim>Colon	Independent de bacteries	CD	Steinhoff et al., 1999

3. TERÀPIA GÈNICA

3.1. Teràpia gènica

La teràpia gènica és una de les disciplines de la biomedicina amb més futur pel desenvolupament de tècniques i protocols amb potencial terapèutic per tractar malalties d'origen genètic. La teràpia gènica consisteix en la introducció d'àcids nucleics (DNA i RNA), amb finalitat terapèutica, en una cèl·lula diana per augmentar o disminuir l'expressió gènica d'un gen específic. A més del gen, dins d'aquesta definició també s'inclouen totes aquelles unitats genètiques que puguin normalitzar l'expressió gènica del pacient com els RNAi (RNA de interferència), shRNAi (short harpins RNA de interferència), mRNA (microRNA), les seqüències antisentit, etc. D'aquesta manera, coneixent la causa per la qual el pacient manifesta una malaltia genètica, és factible pensar en una possible teràpia, gràcies a la introducció d'àcids nucleics que permetin corregir l'alteració i d'aquesta manera tractar amb èxit la malaltia (Brodi and Crystal, 1994). Però actualment, a més de les malalties genètiques, el concepte de teràpia gènica s'ha estès a altres malalties en que la patologia no està determinada per un sol gen sinó que hi ha una alteració de la homeòstasis del sistema, com en el cas del càncer (Cascallo et al., 2007), malalties cardiovasculars (Bongianino and Priori, 2015), malalties neurològiques (Nagabhushan Kalburgi et al., 2013), o com a vacuna per aconseguir immunitat, com en el cas de HIV (Balazs et al., 2012) (Fig. 6).

En les últimes dècades, ha crescut el desenvolupament i l'aplicació de la teràpia gènica gràcies a l'aparició de nous vectors, a una major bioseguretat del vector, a l'augment de l'eficiència de la transferència gènica i a les millores en les tècniques de producció a gran escala. Fins a l'actualitat,

s'han realitzat més de 2200 assaigs clínics en humans (Fig. 7), del quals 23 estan en fase II-III, 79 en fase III i 2 en fase IV (www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical).

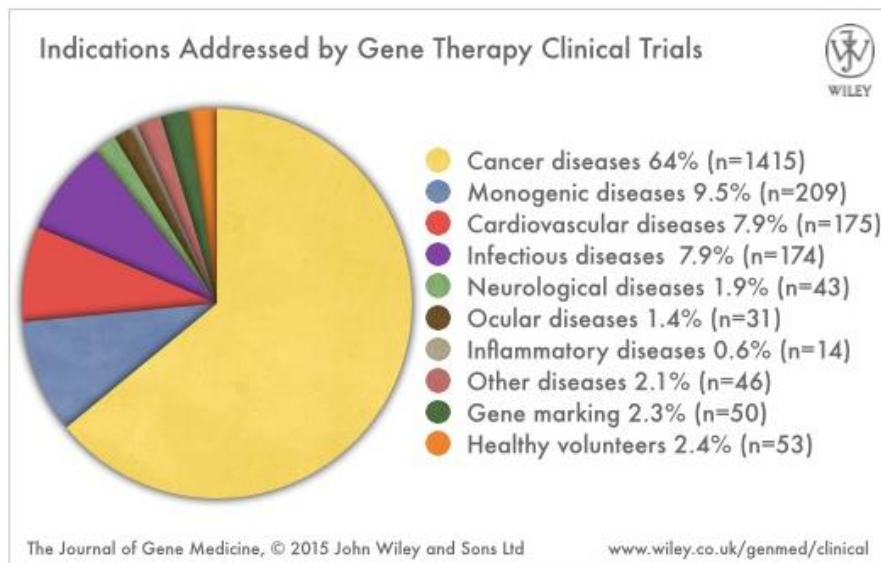


Fig. 6. Estudis clínics en teràpia gènica. Distribució dels estudis clínics en teràpia gènica segons la malaltia. www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical.

En general, el tractament de la majoria de malalties genètiques per teràpia gènica requereix l'expressió d'un gen terapèutic durant tota la vida del pacient. Per això el desenvolupament de vectors segurs que permetin l'expressió del transgen durant llargs períodes de temps i que eviti la resposta immune del pacient és imprescindible per a que aquests vectors es puguin utilitzar en protocols de teràpia gènica *in vivo*.

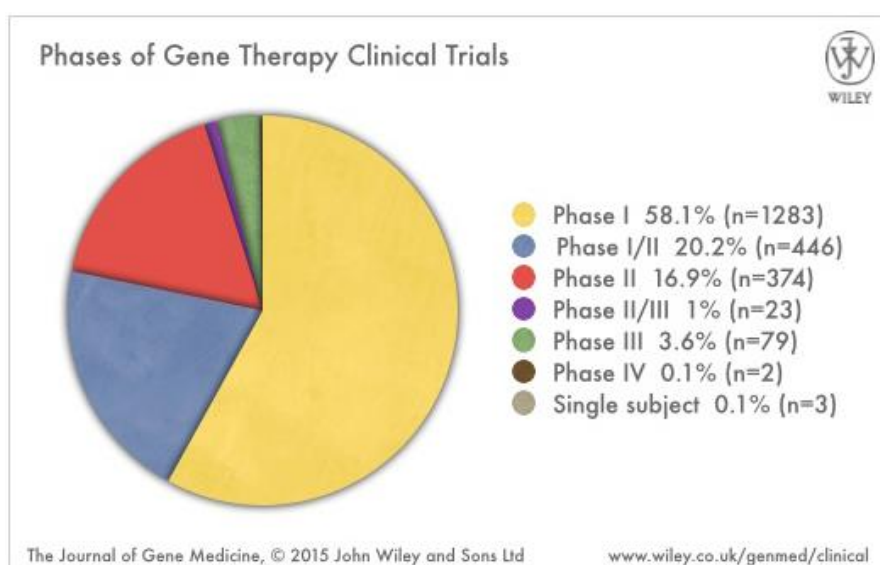


Fig. 7. Estudis clínics en teràpia gènica. Distribució dels estudis clínics segons la fase clínica. www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical

3.2. Tipus de teràpia gènica

En funció de l'estratègia aplicada, la teràpia gènica es pot classificar en (Fig. 8):

a) Teràpia gènica *ex vivo*:

La teràpia gènica *ex vivo* consisteix en l'extracció de cèl·lules diana del pacient per a la seva posterior transducció i selecció *in vitro*. Una vegada les cèl·lules estan transformades amb el material genètic, aquestes s'implanten al pacient. Aquesta teràpia té grans avantatges ja que les cèl·lules es transdueixen en un percentatge elevat, i a més no són rebutjades per l'organisme, ja que pertanyen al propi pacient. En aquestes teràpies s'acostumen a utilitzar vectors integratius (MLV, lentivirus, etc) ja que les cèl·lules passen per molts cicles de divisió cel·lular. No obstant, quan el que es vol és una expressió transitòria, s'utilitzen vectors no integratius (Adenovirus, AAV, etc.).

b) Teràpia gènica *in vivo*:

A diferència de la teràpia gènica *ex vivo*, la teràpia gènica *in vivo* consisteix en la transducció de les cèl·lules diana mitjançant vectors (virals o no virals) directament al pacient. El seu èxit depèn de l'especificitat del vector per la cèl·lula diana i per la seva eficiència de transducció.

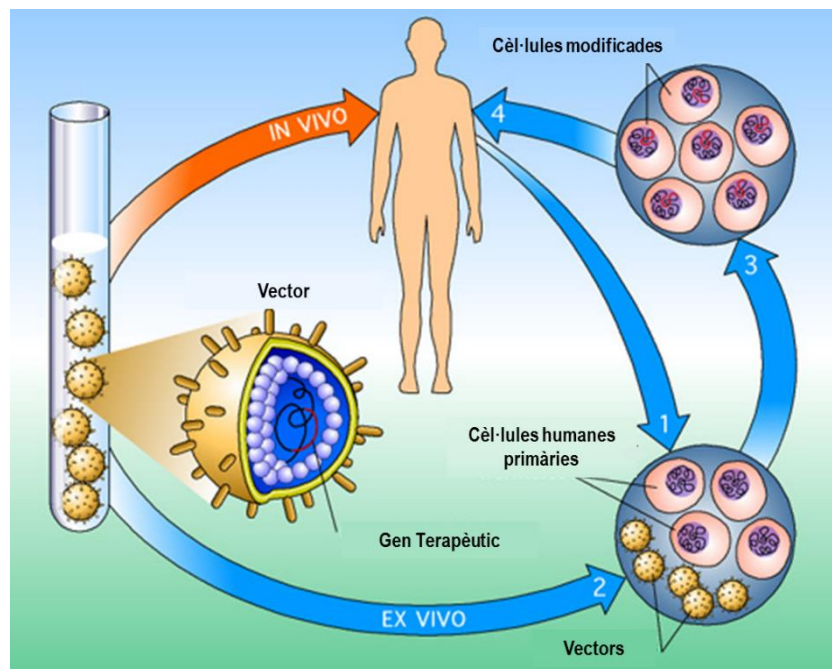


Fig. 8. Tipus de teràpia gènica. La transducció de la cèl·lula diana es pot realitzar fora de l'organisme (*ex vivo*) o per administració directa (*in vivo*). <http://recursos.cnice.mec.es>

3.3. Mètodes d'administració gènica

Els vectors de teràpia gènica es divideixen en dues grans classes: els vectors virals i els vectors no virals.

La teràpia gènica viral consisteix en la introducció de material genètic mitjançant l'ús de vectors vírics, els quals presenten un tropisme específic per a diferents tipus cel·lulars, fet que permet una major eficiència cap a l'òrgan diana. Entre els vectors virals més utilitzats es troben l'adenovirus (Ad), el retrovirus (MMLV), el lentivirus (HIV) i el virus adenoassociats (AAV).

La teràpia gènica no viral, en canvi, transporta el gen d'elecció mitjançant uns vectors d'origen fisicoquímic, garantint una major bioseguretat en el tractament, i una fàcil producció sense oferir limitació en quant a la longitud del gen d'interès. No obstant, tot i la seva elevada bioseguretat, la seva aplicació *in vivo* encara està per darrere de la teràpia gènica viral degut a la poca especificitat pel teixit diana i la seva baixa eficiència de transfecció *in vivo*. Dins de la teràpia gènica no viral, podem distingir entre la transferència química (mitjançant la formació de complexes amb el DNA per interacció de càrregues, com els liposomes i els polímers catiónics) i la transferència física (com electroporació, biobalística o el sistema hidrodinàmic, on es realitza una injecció intravenosa que per sobrepressió permet que el DNA injectat penetri els teixits).

L'èxit de la teràpia gènica en assaigs clínics depèn del desenvolupament de vectors que garanteixin l'expressió del transgen sense efectes secundaris. En l'actualitat, s'accepta que encara no existeix un vector ideal que permeti la seva aplicació per al tractament de totes les malalties genètiques. Per això, cada vector està específicament dissenyat per tractar una malaltia determinada. Tot i els nombrosos resultats positius obtinguts amb assaigs de fase I i II, actualment és en el tractament del càncer on els adenovirus han obtingut més èxit (Ginn et al., 2013)

L'elecció del vector per a transferir material genètic a un òrgan o teixit diana no és senzilla, ja que el vector escollit pot variar en funció de les necessitats terapèutiques de cada malaltia, així com les característiques de les cèl·lules diana pròpies. Una de les prioritats en recerca en el camp de la teràpia gènica es el descobriment i caracterització de nous virus i al desenvolupament de nous vectors virals. D'aquesta manera, la bateria de sistemes de transferència gènica es cada vegada més gran, i per tant, l'elecció del vector viral s'ajusta cada vegada més a les necessitats de cada malaltia.

Taula 6. Classificació i característiques més importants dels vectors virals de teràpia gènica

VECTOR	MATERIAL GENÈTIC	CAPACITAT D'EMPAQUETAMENT	TROPISME	POTENCIAL INFLAMATORI	FORMA DEL GENOMA VIRAL EN LA CÈL·LULA	PRINCIPALS LIMITACIONS	PRINCIPALS AVANTATGES
Retrovirus	RNA	8 kb	Cèl·lules en divisió	Baix	Integrat	Només transdueix cèl·lules en divisió; la integració pot induir oncogènesis	Transferència gènica persistent en cèl·lules en divisió
Lentivirus	RNA	8 kb	Ampli	Baix	Integrat	La integració pot produir oncogènesis	Transferència gènica persistent en molts teixits
HSV-1	dsDNA	40 kb* 150 kb**	Principalment neurones	Alt	Episomal	Inflamatori; l'expressió del transgen és transitòria en cèl·lules no neuronals	Gran capacitat d'empaquetament; fort tropisme per neurones
AAV	ssDNA	<5 kb	Ampli	Baix	Episomal (>99%) Integrat (<1%)	Capacitat d'empaquetament baixa	Poc inflamatori; poc patogènic
Adenovirus	dsDNA	8 kb* 30 kb***	Ampli	Alt	Episomal	Resposta inflamatòria potent	Transducció eficient de molts teixits

*Defectiu en replicació; **Amplicon; ***Helper dependent; ssDNA: DNA de cadena única

AAV: vector viral adeno-associat; HSV-1: Herpes Simple virus-1; dsDNA: DNA de doble cadena;

El vector ideal hauria de tenir les següents propietats: gran eficiència de transferència de material genètic utilitzat, especificitat per l'òrgan diana; immunogenicitat baixa o nul·la; llarga duració de l'expressió del transgen; fàcil producció i manipulació genètica; fàcil purificació; baix cost de producció, i fàcil escalat per a la seva producció a nivell industrial.

4. ADENOVIRUS

4.1. Estructura i genoma de l'adenovirus

Els Adenovirus (Ad) pertanyen a la família Adenoviridae, on trobem dos gèneres: Mastadenovirus (que inclou les espècies d'humà, simi, boví, equí, porcí, oví, caní i sarigues) i els Aviadenovirus. S'han descrit més de 100 espècies diferents, identificades a partir de mamífers, rèptils, i aus, mantenint tots una estructura arquitectònica similar. Els adenovirus humans es classifiquen en 7 subgrups (A-G) (Taula 7) per la seva capacitat d'hemaglutinació (Fields, 2007), els quals es divideixen en diferents serotips segons les seves propietats immunològiques.

Taula 7. Subgrups d'Adenovirus humans i les seves principals característiques

SUBGRUP DE ADENOVIRUS	SEROTIPS	TROPISME NATURAL PREDOMINANT	RECEPTORS CONEGUTS
A	12, 18, 31	gastrointestinal	CAR
B1	3, 7, 6, 16, 21, 50	respiratori	CD46, CD80/86, Receptor X, HSPG
B2	11,14, 34, 35	renal	CD46, CD80/86, Receptor X, HSPG
C	1, 2, 5, 6	respiratori	CAR, HSPG, MHC-1, VCAM-I, Integrines
D	8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 22-30, 32, 33, 36-39, 42-49, 51	ocular	CAR, àcid siàlic, CD46
E	4	respiratori, ocular	CAR
F	40, 41	gastrointestinal	CAR
G	52	gastrointestinal	Desconegut

Els Ad estan associats a malalties poc greus com conjuntivitis, faringitis, i en un alt percentatge, a refredat o malalties respiratòries agudes, queratoconjuntivitis, gastroenteritis i pneumònia en nens.

Entre els diferents grups cal destacar el grup C, on es troben els serotips Ad2 i Ad5 (Russell, 2000), que són els serotips més utilitzats en el camp de la teràpia gènica, i el grup F, amb els serotips Ad40 i Ad41 pel seu tropisme específic per l'intestí.

Actualment l'Ad s'ha convertit en un dels vectors més utilitzats en assaigs clínics en humans amb un 22,2%, per sobre d'altres virus com els retrovirus (Fig. 9). Aquest lideratge és deu a que l'Ad pot infectar un elevat nombre de tipus cel·lulars, tant cèl·lules quiescents com cèl·lules en divisió i a que les tècniques actuals de producció d'Ad permeten modificar la càpsida i d'aquesta manera el seu tropisme cel·lular (Mizuguchi and Hayakawa, 2004). A més són fàcils de produir a títols elevats (fins 10^{13} partícules/ml) i són virus no integratius, amb el que s'evita la mutagènesis insercional. L'inconvenient fonamental dels vectors adenovirals és que indueixen una elevada resposta immune dosi-depenent, tant innata com humoral, dificultant futures readministracions, i cel·lular, mitjançant limfòcits T (CTL).

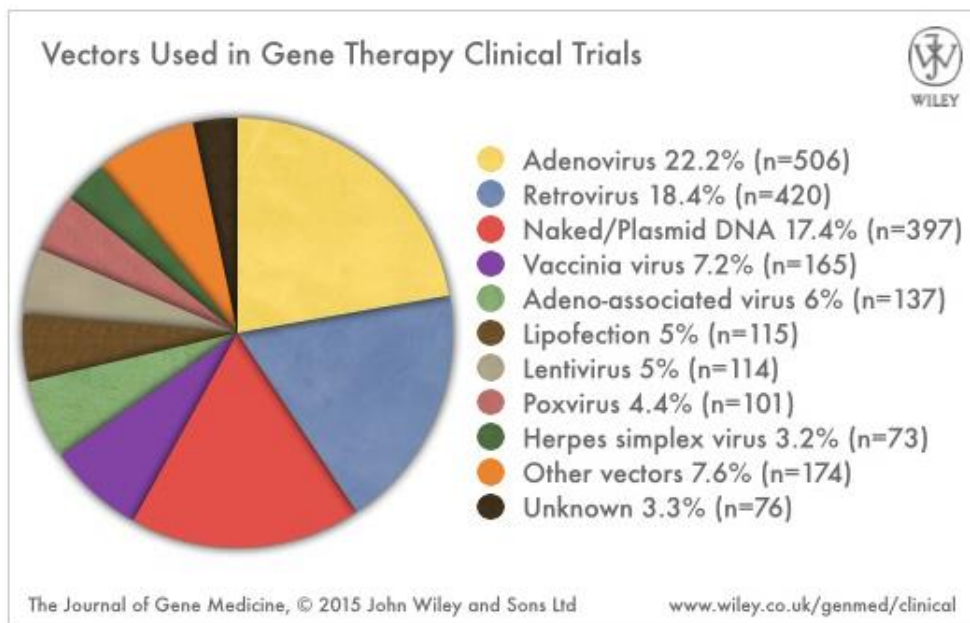


Fig. 9. Vectors utilitzats en estudis clínics de teràpia gènica. www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical

La partícula adenoviral posseeix una mida entre els 70 i 100 nm, i està formada per una càpsida externa sense envolta que protegeix el genoma viral, una cadena lineal de DNA de 36 kb, dues proteïnes terminals i les proteïnes V i VII, amb funcions de condensació (Rux and Burnett, 2004). El cromosoma també conté deu còpies de la proteasa p23 i està unit a la càpsida externa per la proteïna VI. La càpsida està formada principalment per l'hexon i és estabilitzada per les proteïnes IIIa, VIII i IX. El vèrtexs estan formats per la proteïna *penton*, d'on sobresurt la proteïna fiber, la

qual uneix el virió al receptor de les cèl·lules diana, que en la majoria dels serotips és el receptor CAR (coxsackievirus B adenovirus receptor) (Hearing et al., 1987).

Analitzant amb més detall la proteïna *fiber*, observem que té 3 dominis diferents: el *tail*, el *shaft* i el *knob* (Fig. 10). El domini *tail* es troba a l'extrem N-terminal i ancla el *fiber* a la càpsida de l'Ad a través de l'associació amb el *penton* base (Weber et al., 1989). Seguidament trobem el domini *shaft*, que s'estén fora de la superfície del virió, facilitant la interacció amb el receptor cel·lular. El domini *shaft* (en Ad2 i Ad5) té 22 pseudo-repeticions de 15 aminoàcids en una conformació triple- β -espiral (Green et al., 1983). Finalment, el *fiber knob* es situa en el C-terminal i és responsable de la unió al receptor cel·lular primari de l'hoste (Barnett et al., 2002). El domini *knob* està format per 3 subunitats on 2 fulles- β antiparal·leles formen cada subunitat.

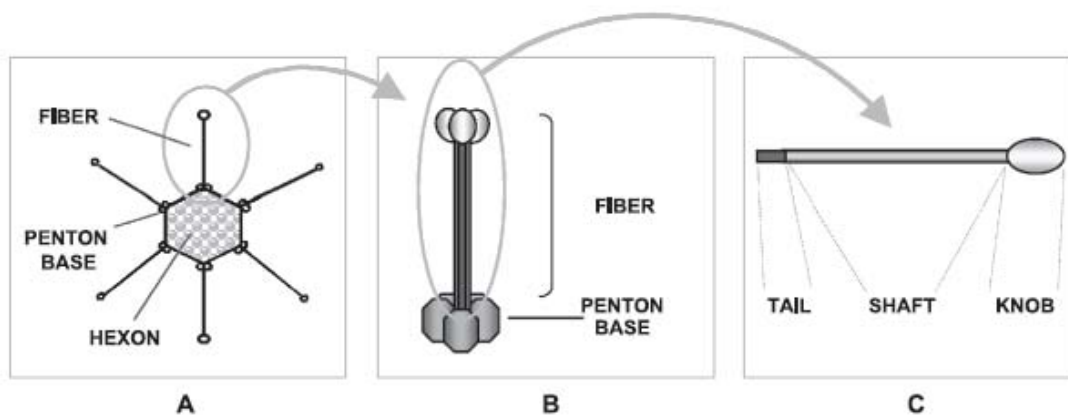


Fig. 10 Diagrama esquemàtic d'un virió d'Ad5. (A) Càpsida del virió d'adenovirus, on es mostra el *fiber*, *penton* base, i *hexon*. (B) Detall del *fiber*, on es mostra la unió *fiber/penton*. (C) El monòmer del *fiber* està format per tres dominis, *tail*, *shaft*, i *knob*. www.intechopen.com

L'Adenovirus també presenta proteïnes minoritàries que serveixen per acomodar i estabilitzar el genoma en la càpsida (Vellinga et al., 2005). Les proteïnes estructurals del virió es designen des de la proteïna II fins a la XII, segons el pes molecular que presenta en gels de poliacrilamida SDS-PAGE (van Oostrum and Burnett, 1985). Les proteïnes IIIa, VI, VIII i IX estan associades a la proteïna hexon, mentre que les proteïnes V, VII, X, XI i XII donen anclatge al genoma viral (Rux and Burnett, 2004) (Fig. 11).

A més de les proteïnes estructurals, l'Adenovirus presenta proteïnes no estructurals que li permeten desenvolupar les diferents etapes del seu cicle, com escapar de l'endosoma (proteasa adenoviral (Anderson, 1990)), l'alliberació de genoma de la càpsida, la replicació de la cadena de

DNA viral gràcies a l'activitat de les proteïnes TP, DBP i AdPol, i l'empaquetament del genoma dins la càpsida (IVa2, L155K entre altres) (Ostapchuk and Hearing, 2005; Zhang et al., 2001).

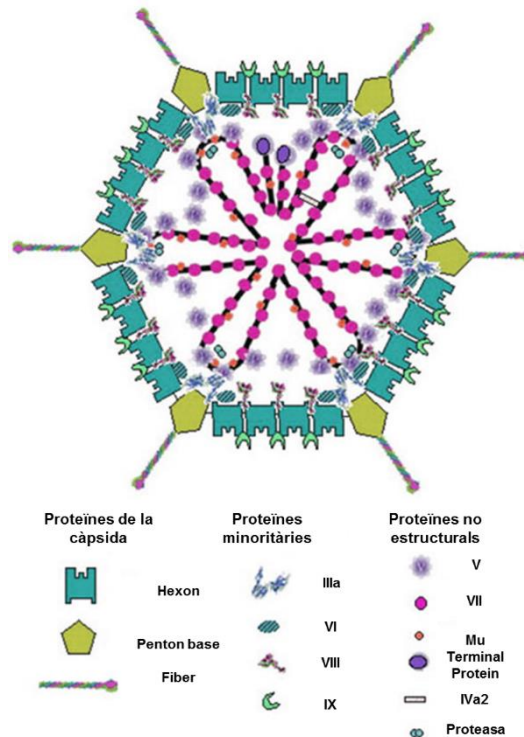


Fig. 11. Diagrama esquemàtic d'un virió d'Ad5. En el model es mostra les principals proteïnes estructurals i no estructurals d'un virió d'Ad5. www.signagen.com

El genoma viral està flanquejat per dos ITR (inverted terminal repeats) de entre 100 i 140 pb, on s'uneix la proteïna TP (terminal protein) que permet la replicació del genoma viral (Van der Vliet, 1995). En l'extrem 5' es localitza la senyal d'empaquetament (ψ), que és la que dirigeix l'encapsidació del genoma viral dins la càpsida. El genoma està dividit en gens early (E1-E4) que es transcriuen en les primeres fases del cicle, just abans de la replicació del DNA viral, i els gens late (L1-L59) transcrits en una fase més tardana (producció proteica i encapsidació) (Fig. 12)

4.2. Cicle de l'adenovirus

El cicle de l'adenovirus té una durada d'aproximadament 36 hores, i tot i que podem trobar diferències en algunes espècies, en la majoria, el virió intranuclear comença a formar-se a partir de les 8 hores i es poden produir-se entre 10^4 - 10^5 partícules per cèl·lula de mitjana (Hearing et al., 1987). El cicle de l'adenovirus es pot dividir en les següents etapes:

a) Internalització de l'adenovirus en la cèl·lula:

L'Adenovirus infecta la cèl·lula diana gràcies a la interacció de varies proteïnes de la càpsida amb diversos receptors i proteïnes cel·lulars. En el cas de l'Ad5, la proteïna *fiber* reconeix majoritàriament un receptor de 46 KDa anomenat CAR (Coxsackie and adenovirus receptor) (Tomko et al., 1997). El receptor CAR es troba en molts òrgans i teixits humans com el fetge, cor, pulmó i cervell (Howitt et al., 2003) i funciona com a molècula d'adhesió entre cèl·lula i cèl·lula en la superfície basolateral de les cèl·lules epitelials (Honda et al., 2000). S'ha suggerit que l'excés de proteïna *fiber* produïda durant el cicle de l'Ad, actua interferint en les connexions cèl·lula-cèl·lula, afavorint la difusió del virus entre els teixits (Walters et al., 2002).

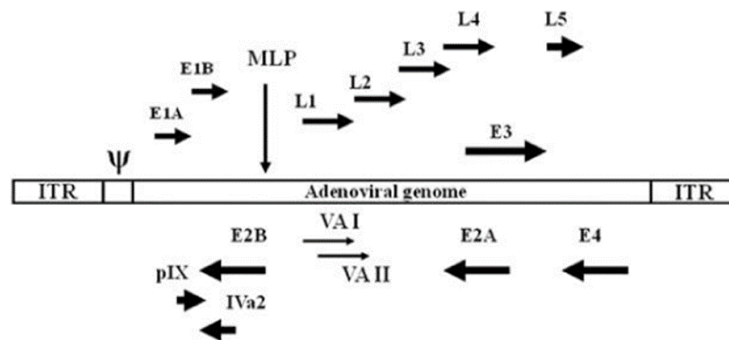


Fig. 12. Mapa de transcripció de l'Ad5. El genoma es divideix en gens early (E1-E4), gens late (L1-L5). Les ITRs es troben als extrems del genoma. En el extrem 5' es troba la signa d'empaquetament. Adaptat de Rosewell et al, *Journal of Genetic Syndromes & Gene Therapy*, 2011

A més de CAR, els diferents serotips d'Ad utilitzen altres receptors com els glicosaminoglicans heparan sulfat, CD46, cD80/86 o àcid siàlic, entre altres, per internalitzar-se en les cèl·lules, tal com es mostra a la Taula 7 (Zhang and Bergelson, 2005). A part del receptor, l'Ad5 reconeix les integrines $\alpha V\beta 3$ o $\alpha V\beta 5$, les quals interaccionen amb el *penton* base (a través de RGD), facilitant la internalització del virus en la membrana cel·lular (Rentsendorj et al., 2006; Wickham et al., 1993).

L'adenovirus utilitza la endocitosis mediada per receptor com a via d'entrada a la cèl·lula. El virus queda envoltat per una invaginació de la membrana plasmàtica que es va recobrint de la proteïna clatrina, formant una vesícula que posteriorment es fusiona amb l'endosoma (Meier and Greber, 2004; Stewart et al., 1997). L'endosoma es un mecanisme

de defensa cel·lular contra el material exogen que entra a la cèl·lula. Per tant, l'adenovirus ha d'alliberar el seu material genètic, conjuntament amb les proteïnes de la càpsida, abans de la degradació per proteases lisosòmiques (Seth et al., 1984, 1987). A mesura que l'endosoma avança cap al nucli, el virus queda exposat a un pH àcid (pH = 5.5 aproximadament) que permet iniciar la disrupció de la càpsida. En aproximadament 30-60 min el genoma de l'Ad pot arribar al nucli.

b) Replicació i transcripció adenoviral

Una vegada el genoma adenoviral ha arribat al nucli, prepara la cèl·lula per a poder replicar la seva cadena de DNA de manera segura i posteriorment, produir totes les proteïnes necessàries per a la formació de nous virions. En primer lloc, necessita simular l'entrada en fase S del cicle cel·lular per obtenir un ambient replicatiu adequat. En segon lloc, el genoma adenoviral necessita expressar les proteïnes de replicació, gens early (E1-E4), les quals s'uniran a les proteïnes cel·lulars necessàries per a l'inici de la replicació de la cadena de DNA. Finalment l'Ad protegeix a la cèl·lula de la possible resposta immune cel·lular per facilitar la difusió i replicació de l'adenovirus dins de l'organisme.

La síntesis del genoma adenoviral requereix de la participació de 3 proteïnes virals: la AdPol (polimerasa adenoviral), la pTP (pre-Terminal protein) (de Jong et al., 2003) i la DBP (DNA binding protein), totes codificades a la regió E2 de l'adenovirus (Van der Vliet, 1995). La conjunció de totes aquestes proteïnes juntament amb els factors cel·lulars que aporta la pròpia cèl·lula (de Jong and van der Vliet, 1999) inicia l'elongació de la cadena de DNA a partir del ITR, situats als extrems del genoma viral, replicant de forma simètrica les dues cadenes (Hay et al., 1995).

Els gens "late" es transcriuen per l'acció del promotor MLP (Major Late Promoter), a partir del qual es generen una sèrie de proteïnes que participen en la formació de la càpsida de l'adenovirus, l'empaquetament del genoma viral, l'assemblatge final de la partícula viral infecciosa i en la lisis de la cèl·lula infectada.

c) Empaquetament de l'adenovirus

L'empaquetament de l'adenovirus s'inicia a partir de la senyal d'empaquetament que es troba a l'extrem 5' del genoma, i és un procés de múltiples etapes on intervenen diferents proteïnes, tant virals com cel·lulars. La unió de totes aquestes proteïnes a la senyal d'empaquetament genera un complex proteic que guia el genoma adenoviral a un dels

vèrtexs de la càpsida, per on s'inicia l'empaquetament. Una vegada el genoma es troba dins de la càpsida, es va acomodant gràcies a les proteïnes pròpies de l'Adenovirus (Rux and Burnett, 2004), com la proteïna VII precursora (pVII) (Zhang and Arcos, 2005). Posteriorment, quan el genoma de l'Ad està empaquetat i ancorat dintre de la càpsida viral, la partícula viral es tanca i madura passant per diferents estadis (Weber, 1995).

d) Maduració de la partícula adenoviral

Un cop el genoma adenoviral es troba dins de la càpsida, el DNA ha d'acomodar-se i condensar-se de manera eficient, unint-se a diferents proteïnes que intervenen com ancoratge (proteïnes VI i VII). A més, la partícula adenoviral ha de madurar des d'una partícula immadura fins a convertir-se en una partícula infecciosa. Per això, l'adenovirus sintetitza la seva pròpia proteasa, Adenaina (Weber, 2003), que intervé directament sobre el desenvolupament de la infectivitat de la partícula (Anderson et al., 1973; Weber, 1976).

Una altra proteïna que actua en les últimes fases del cicle viral és la proteïna ADP (Adenoviral Death Protein) o E3-11.6K. Aquesta proteïna es necessita per lliurar la cèl·lula eficientment i poder alliberar les partícules virals a l'exterior de la cèl·lula (Tollefson et al., 1996a). En adenovirus mutants per al a proteïna ADP, els virus es mantenen en el nucli de la cèl·lula i no s'alliberen a l'exterior de manera eficient (Tollefson et al., 1996b).

e) Etapes de la maduració

En una infecció viral productiva d'adenovirus es generen diferents classes de partícules, producte de diferents estadis d'empaquetament i maduració de la partícula viral seguint un ordre establert (D'Halluin, 1995; Tibbetts and Giam, 1979). La separació dels diferents estadis d'empaquetament s'efectua per ultracentrifugació utilitzant gradients de CsCl o gradients de sacarosa (Fig. 13).

El primer estadi correspon a les càpsides buides i es troba en la part superior dels gradients de CsCl (Ishibashi and Maizel, 1974; Maizel et al., 1968a; Prage et al., 1972). Diversos autors també anomenen aquest primer estadi partícula lleugera (Light particle) o partícula incompleta (D'Halluin et al., 1978), i s'accepta que aquestes partícules poden estar totalment buides, o contenir part del genoma adenoviral. La densitat d'aquestes partícules és de 1,295-1,315 g/cm³ (Everitt et al., 1973; Morin and Boulanger, 1984).

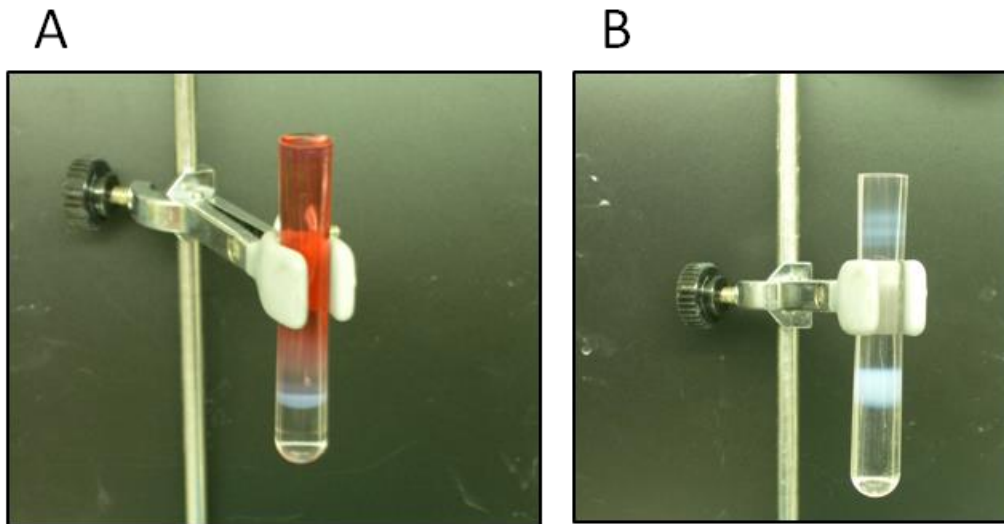


Fig. 13. Bandes obtingudes després de la 1^a centrifugació en gradient de CsCl (A), i la 2^a centrifugació en gradient de CsCl (B)

En la següent etapa, desapareixen diverses proteïnes per permetre l'entrada del genoma viral, augmentant la densitat de la partícula. Aquest estadi se'l coneix com intermedi pesat (heavy intermediate) els virions tenen una densitat de $1,37 \text{ g/cm}^3$.

En aquest intermedi d'empaquetament, la proteasa adenoviral actua sobre algunes de les proteïnes que ajuden a compactar el genoma viral i les degrada per acabar d'ajustar i ensamblar la càpsida viral (Weber, 1995). Una vegada ha entrat el DNA i la proteasa adenoviral ha actuat sobre els precursors, es genera finalment la partícula viral madura i infecciosa de densitat $1,345 \text{ g/cm}^3$. Els fenòmens de maduració es produeixen en el transcurs de 3 a 5 hores per la completa formació del virió infecciós (Edvardsson et al., 1976).

4.3. Construcció de vectors adenovirals

El genoma de l'adenovirus, transfectat directament en cèl·lules permissives, permet la generació de nous virions sense tenir necessitat de la seva pròpia càpsida proteica (Graham and van der Eb, 1973). Això ha permès desenvolupar tècniques i protocols per a la generació de nous vectors adenovirals amb múltiples modificacions genètiques. Bàsicament, es poden diferenciar tres protocols de construcció de genoma adenoviral: lligació directa *in vitro*, recombinació homòloga en cèl·lules HEK293 i la recombinació homòloga en bacteries (Mizuguchi et al., 2001).

La recombinació homòloga en bacteries és el mètode més utilitzat en l'actualitat i es basa en la recombinació homòloga de dos plàsmids, en forma lineal, utilitzant la soca d'E. Coli BJ5183 (recBCsbcBC) que permet realitzar la recombinació homòloga entre els dos fragments (Chartier et al., 1996; He et al., 1998). El plàsmid que conté el genoma adenoviral presenta dues dianes de restricció (normalment PacI o PmeI), les quals flanquegen l'origen de replicació del plàsmid i una resistència a antibiòtic. D'aquesta manera, al obrir el plàsmid per PacI o PmeI, s'allibera el genoma en forma lineal, i es transfecta en cèl·lules permissives (HEK293). El segon plàsmid conté l'extrem 5' del genoma viral amb l'extrem ITR, la senyal d'empaquetament i una regió homòloga al genoma viral corresponent a 3-4 Kpb de la regió E2. En aquest segon plàsmid llançadora es on es clonen els gens d'interès. Una vegada comprovada la inserció del fragment en el plàsmid llançadora, ambdós plàsmids es digereixen pels enzims de restricció pertinents i es co-transformen en E.Coli BJ5183 on es produeix la recombinació homòloga.

Titulació del vector viral

En el cas dels vectors adenovirals, les unitats més utilitzades són les partícules físiques i les unitats infeccioses. Generalment, les partícules físiques (PP) es quantifiquen mesurant l'absorbància de la mostra a una longitud d'ona de 260 nm després de la lisis del virió (Mittereder et al., 1996; Sweeney and Hennessey, 2002). Amb aquest mètode es quantifica la quantitat de genomes virals que conté una preparació.

El títol infeccions, en Ad de primera i segona generació, és la concentració de partícules capaces d'infectar cèl·lules HEK293 i expressar els gens del genoma viral. Aquest valor s'expressa com a IU/ml. El ratio PP/IU ens indica la fracció del virus que es infecciosa, i ens dona una mesura de l'eficiència de producció del virus.

4.4. Adenovirus de 1a i 2a generació (clàssics)

Els adenovirus, tot i que estan associats a patologies ben descrites, provoquen generalment malalties poc importants. Tanmateix, per evitar la replicació i propagació d'aquests vectors i els seus efectes adversos per un possible ús en teràpia gènica, s'han de generar vectors deficients en la seva replicació. Els vectors de 1a generació són deficients en la regió E1, que és la primera regió de l'Ad que es transcriu i dona lloc a les diferents etapes de replicació. D'aquesta manera el vector permet una capacitat màxima de 5.1 Kb per introduir un gen terapèutic. Més tard, per incrementar la bioseguretat d'aquests vectors, es va eliminar una regió E3. Com a conseqüència de la deleció del gen E3 es va augmentar la seva capacitat d'incorporació de material genètic fins

a 8.2 Kb. La regió E3 juga un paper important en la evasió de mecanismes de defensa de l'hoste davant el Ad i no es fonamental per la seva replicació (Danthinne and Imperiale, 2000).

Aquest vectors deficients de les regions E1 i E3 han de ser amplificats en línies cel·lulars que permetin la seva propagació. La primera línia creada per a la producció de vectors adenovirals va ser la HEK293, la qual va ser transformada amb la regió E1 (Graham et al., 1977). Durant el creixement dels vectors, es generaven partícules competents en replicació (RCA) a causa de la recombinació homòloga entre les zones del vector i la regió E1 de la cèl·lula. D'aquesta manera, es generen partícules d'Ad capaces de replicar en absència del gen E1. Quan es va descriure que la línia HEK293 podia generar partícules RCA, es van generar línies cel·lulars com les PER.C6 (Fallaux et al., 1998) i N52.E6 (Schiedner et al., 2000) amb la finalitat de augmentar la bioseguretat. Aquestes línies cel·lulars contenen una regió mínima del gen E1, no present en el vector, amb el que s'evita la possibilitat de recombinació homòloga entre cèl·lula i vector.

Els vectors de 1a generació, tot i que no poden replicar, generen una resposta immune cel·lular significativa *in vivo* degut a l'expressió residual de proteïnes virals, que activa la resposta immune cel·lular dirigida per limfòcits T citotòxics que acaba eliminant les cèl·lules transduïdes i amb això, l'expressió del transgen.

Els Ad de 2a generació es van construir per intentar donar solució als problemes d'immunogenicitat dels Ad de primera generació. Per evitar el problema de la resposta immune cel·lular, es van combinar diferents delecions de regions *early* (E1+/-E3 i E3/E4) disminuint l'expressió residual de proteïnes virals. Gràcies a la deleción d'aquestes regions, es va augmentar la capacitat de l'Ad fins a 14 Kb (Amalfitano et al., 1998; Armentano et al., 1997). La deleción d'aquests gens *early* va suposar la creació de noves línies cel·lulars capaces d'aportar *in trans* les carències de l'Ad per replicar-se. Tot i que es van crear grans expectatives amb aquests vectors, la seva aplicació *in vivo* va continuar aportant el mateixos problemes associats als dels Ad de 1a generació (Danthinne and Imperiale, 2000).

4.5. Adenovirus 40 i 41 del subgrup F

En la dècada de 1970 es van detectar per microscòpia electrònica en mostres de femta de nens amb diarrea uns virus adenovirus desconeguts fins al moment. Aquests virus (Ad40 i Ad41) es van conèixer com adenovirus entèrics i són responsables del 17% de diarrees infantils (Kidd et al., 1983; Mautner et al., 1999; Tiemessen and Kidd, 1995a). Aquests adenovirus tenen varies característiques pròpies que els distingeixen dels altres adenovirus humans.

Els serotips 40 i 41 són coneguts pel seu pobre creixement en condicions de laboratori, ja que no es repliquen en cèl·lules que permeten una replicació eficient d'altres serotips d'adenovirus humans (de Jong et al., 1983) com per exemple KB, HeLa, HEP-2 i human amnion. No obstant són capaços de reproduir-se en cèl·lules HEK293 (Takiff et al., 1981), una línia cel·lular de ronyó embrionari humà transformada amb la regió E1 de l'Ad5 (Graham et al., 1977), encara que amb títols molt baixos, de l'ordre de 10^8 - 10^9 IU/ml (Brown, 1985; Favier et al., 2002). Aquests valors estan al voltant de 1000 vegades menys dels que s'obtenen amb l'Ad5. S'han descrit varis defectes en el seu cicle vital, com la falta d'integritat genètica en l'E1, que podrien explicar el seu baix creixement (Mautner et al., 1995, 1999; Tiemessen and Kidd, 1995b; Tiemessen et al., 1996).

Els adenovirus clàssics presenten un sol tipus de *fiber*, però els virus Ad40 i Ad41 tenen dos *fibers* de diferent mida i seqüència (cadascun codificat per un gen diferent) (Kidd et al., 1993; Pieniazek et al., 1990b; Yeh et al., 1994) el *fiber* llarg i el *fiber* curt. El domini *shaft* de la proteïna *fiber* curta de l'Ad40 conté 12 fulles- β , mentre que el domini *shaft* de la proteïna *fiber* llarga de l'Ad40 conté 21 fulles. Les regions *tail* de la zona N-terminal de la proteïna *fiber* curta i *fiber* llarga de l'Ad40, que estan relacionades amb la incorporació del *fiber* al *penton base* (Chroboczek et al., 1995; Devaux et al., 1987), són més homòlogues a les seqüències aminoacídiques de la regió corresponent del *fiber* de l'Ad5 que a d'altres serotips. La proteïna *fiber* curta de l'Ad40 i Ad41 està tan poc relacionada amb els seus *fiber* llargs com amb els *fibers* d'altres subgrups (Chroboczek et al., 1995), la qual cosa justifica la falta de interacció d'aquests *fiber* curts amb el CAR. El *fiber* llarg interacciona amb el CAR (una proteïna que és receptor cel·lular per molts serotips humans), mentre que la proteïna cel·lular que interacciona amb el *fiber* curt del Ad40 encara no es coneix (Roelvink et al., 1998). Ja que el tropisme entèric d'Ad40 i Ad41 no pot ser explicat per la interacció de la proteïna *fiber* llarga d'aquests virus amb el receptor CAR (expressat ubiquament), cal pensar que és la interacció del *fiber* curt amb un component específic del tracte digestiu la responsable d'aquest tropisme (Favier et al., 2002). És per això que la creació de vectors virals quimèrics que portin únicament la proteïna curta permetria definir i identificar el receptor cel·lular intestinal amb el que interaccionen els adenovirus 40 i 41. Tanmateix, s'ha descrit que en el virió dels adenovirus 40 i 41, només es troba un sol *fiber* en cada vèrtex (Kidd et al., 1993) i que el ratio entre *fiber* curt i *fiber* llarg és 1:1 (Favier et al., 2002).

La internalització de l'Ad també és mediada per una altre proteïna viral, el *penton base*, al interaccionar amb les integrines cel·lulars α_v . S'ha demostrat, per molts serotips d'Ad, que el motiu RGD (Arg-Gly-Asp), localitzat la regió flexible del loop del *penton base*, està relacionat amb

l'entrada del virus a la cèl·lula a través de la interacció amb les integrines $\alpha v\beta 3$ i $\alpha v\beta 5$ (Bai et al., 1994; Mathias et al., 1994; Schoehn et al., 1996; Stewart et al., 1997; Wickham et al., 1993). Però els adenovirus del subgrup F no presenten aquest motiu RGD, si no un RGAD en el cas de l'Ad40 i un IGGD en el cas d'Ad41 (Albinsson and Kidd, 1999), el que implica que no interaccionaria amb les integrines $\alpha v\beta 3$ i $\alpha v\beta 5$, i que per tant el procés d'internalització i tràfic intracel·lular d'aquests virus no seguiria el patró clàssic (Barnett et al., 2002), la qual cosa podria explicar en part el cicle víric més lent específic dels virus 40 i 41 respecte altres serotips d'adenovirus. Tanmateix, la dificultat que comporta l'amplificació d'Ad40 i Ad41 i el limitat coneixement del genoma d'aquests virus, ha potenciat l'ús d'altres estratègies, com la construcció de virus quimèrics.

4.6. Adenovirus Quimèrics

La majoria de vectors adenovirals utilitzats en teràpia gènica estan basats en els serotips 2 i 5 del subgrup C, els quals reconeixen CAR, però hi han altres serotips que reconeixen receptors cel·lulars diferents com a receptor primari. Per tant, substituint els gens que codifiquen per la proteïna *fiber* de l'Ad5, per gens que codifiquen per la proteïna *fiber* d'altres serotips, es pot aconseguir una transferència gènica independent de CAR i fins i tot canviar el tropisme natural de l'Ad5 pel tropisme del nou *fiber*. Aquest procés s'anomena pseudotipatge.

El pseudotipatge és possible per la similitud estructural entre *fibers* de diferents serotips, destacant l'elevat grau d'homologia entre els dominis *tail* del *fiber*. Això suggereix que la regió *tail* de la proteïna *fiber* d'un serotip podria ser incorporat eficientment en la càpsida per l'associació amb el *penton base* d'un altre serotip. La simplicitat amb la qual un *fiber* d'adenovirus pot ser modificat amb les mínimes perturbacions de l'estructura de *fiber* és el principal avantatge del pseudotipatge (Taula 8).

Taula 8. Principals avantatges dels vectors pseudotipats

AVANTATGES DELS VECTORS QUIMÈRICS
La modificació no afecta l'estructura de la càpsida
La producció <i>in vitro</i> és més eficient
La clonació dels gens terapèutics és més simple
És possible comparar amb estudis realitzats amb l'adenovirus clàssic Ad5
El genoma viral està millor caracteritzat,

Fins al moment, s'ha descrit la construcció de diversos virus quimèrics amb la proteïna *fiber* del serotip 3 (Stevenson et al., 1997), Ad7 (Gall et al., 1996), Ad11 (Stecher et al., 2001), Ad17 (Chillon et al., 1999), Ad35 (Shayakhmetov and Lieber, 2000), a més d'un amb el *fiber* de l'Ad40 (Nakamura et al., 2003) i un altre amb *fiber* de l'Ad41 (Croyle et al., 1998). Tant l'Ad5/40 com l'Ad5/41 contenen el *fiber* curt a la seva càpsida, i per tant, tenen un tropisme diferent respecte a l'Ad5. S'ha hipotetitzat que vectors virals amb el *fiber* curt de l'Ad40 i Ad41 podrien transfectar específicament epíteli intestinal i per tant introduir gens terapèutics en les cèl·lules diana sense transfectar altres teixits. Tanmateix, al començament d'aquesta tesis, l'Ad5/40 s'havia administrat només per via sistèmica, sense èxit, i per tant, calia estudiar la distribució que s'obté amb l'administració per altres rutes com la oral i la rectal de cara a aconseguir una transfecció més específica i localitzada a l'intestí. D'altra banda, el virus quimèric Ad5/41 presenta alguns problemes, principalment la baixa eficiència de transducció en cèl·lules epitelials intestinals, pel que convé fer més estudis abans de poder-lo considerar un vector rellevant per teràpia gènica.

5. TERÀPIA GÈNICA DE TRASTORNS INTESTINALS

L'epíteli intestinal es considera un teixit molt atractiu per a teràpia gènica per varies raons. En primer lloc, cal destacar la seva accessibilitat a través del tub digestiu, que permet la transferència gènica *in vivo* per administració oral o via rectal, i el fet que és una massa molt gran de teixit. L'epíteli intestinal també és interessant per a teràpia gènica a llarg termini, ja que conté cèl·lules mare localitzades a les criptes de Lieberkuhn (Chang and Wu, 1994). De fet, moltes malalties que afecten l'epíteli intestinal (com malaltia de Crohn, fibrosis quística, càncer de colon) es podrien tractar o prevenir a través de la transferència gènica dirigida. L'intestí també es pot utilitzar com a diana alternativa per al tractament de disfuncions metabòliques i nutricionals (com desordres del cicle de la urea i fenilcetonúria). A més, alguns estudis han mostrat que l'epíteli intestinal es capaç de secretar proteïnes a la llum intestinal (Sweetser et al., 1988), i per tant, l'intestí podria esdevenir una diana interessant per a malalties on es produeix una deficiència en la secreció de proteïnes a la sang, com hormones o factors de coagulació (Ledley, 1992). L'intestí també es una diana destacable pel transport de material antigènic en estratègies de vacunació, ja que té accés directe al sistema limfàtic a través de les plaques de Peyer (Mestecky, 1987).

La utilització de virus com a vectors de teràpia gènica i com a potencial vehicles de vacunes ha estat examinada des de fa molts anys, però no obstant això, la teràpia gènica a l'intestí ha estat

retardada per la manca de vectors virals capaços de transferir eficaçment el gen d'interès al teixit diana (Cheng et al., 1997).

L'entorn fisicoquímic de tracte gastrointestinal és força inhòspit, així que idealment, per iniciar la infecció, un virus hauria de tenir propietats com estabilitat en presència de pH àcid (les cèl·lules gàstriques segreguen àcid i redueixen el pH intraluminal fins a 2.0 o valors inferiors), resistència a la pèrdua d'infectivitat en presència de les sals biliars i resistència a la inactivació per enzims proteolítics (Croyle et al., 1998).

A més, degut a que l'epiteli intestinal es un entorn dinàmic, on la renovació de les cèl·lules epitelials es ràpid, i varia entre les 48 hores en el villi i els 5 dies de les cèl·lules procedents de les criptes intestinals (Heath, 1996), si la transferència gènica només s'aconsegueix a l'epiteli, serà de curta durada.

Actualment, els virus més analitzats per transferència gènica a l'intestí són els retrovirus (18,4%), els lentivirus (5%), els AAV (6%) i els adenovirus (22,2%).

5.1. Retrovirus i lentivirus

Els vectors retrovirals són un dels vectors més utilitzats en teràpia gènica. Es caracteritzen perquè necessiten la disrupció de la membrana cel·lular per replicar-se, i per tant requereixen que la cèl·lula estigui en divisió (Miller et al., 1990). S'ha demostrat que els retrovirus són capaços de transduïr cèl·lules intestinals epitelials (Lau et al., 1995; Noel et al., 1994), encara que amb baixa eficiència (entre 2 i 11 cèl·lules per animal). Alternativament, les cèl·lules epitelials intestinals també poden ser transduïdes *in vivo* per lentivirus (Matsumoto et al., 2010), els quals són una subclasse dels retrovirus. Els lentivirus tenen un avantatge sobre els retrovirus com a vectors en teràpia gènica, ja que són capaços de transduïr cèl·lules que no es divideixen (Bukrinsky and Haffar, 1999; Zennou et al., 2000).

No obstant això, s'ha de tenir en compte un problema de seguretat amb ambdós vectors, i és el seu potencial per integrar-se en molts llocs en el genoma humà (Schröder et al., 2002; Wu et al., 2003). Aquestes integracions genòmiques poden resultar en una mutagènesi d'inserció causant el desenvolupament de processos tumorals com s'ha observat en alguns assaigs clínics (Fehse and Roeder, 2008). Tot i les millores significatives en la seguretat dels vectors lentivirals que s'han aconseguit en els últims anys, es necessari abordar el tema de la integració abans que aquests vectors puguin ser considerats eines segures per a aplicacions de teràpia gènica en la MII.

5.2. Vectors de virus adeno-associats

Els virus adeno-associats (AAV) són una promesa per a la teràpia gènica. Els AAV tenen un bon perfil de seguretat, ja que en general, el 99% de AAV recombinants es mantenen com còpies episomals (Schnepp et al., 2003), el que indica un risc molt baix de mutagènesi d'inserció en comparació amb vectors retrovirals. A més, els vectors de AAV són capaços de transduir tant cèl·lules en divisió com quiescents (Monahan and Samulski, 2000) i han demostrat ser eficaços com a vectors de teràpia gènica en diversos models preclínics prometedors per a trastorns autoimmunes i inflamatoris (Apparailly et al., 2002; Mu et al., 2005). Els vectors AAV són capaços de transfectar el tracte gastrointestinal encara que amb una baixa eficiència (During et al., 1998; Polyak et al., 2008) i es va observar expressió del transgen a llarg termini la qual, en relació amb l'elevada taxa de renovació de les cèl·lules intestinals, suggereix que la transducció de cèl·lules stem cells és possible. No obstant això, actualment no hi ha dades disponibles sobre el tractament de colitis experimental amb AAV.

5.3. Vectors adenovirals

Els vectors adenovirals han estat utilitzats amb freqüència en la teràpia gènica gràcies al seu ampli tropisme, la seva eficiència i la falta d'integració en el genoma hoste. Amb l'ús de vectors adenovirals s'ha aconseguit un alt nivell de transducció *in vitro* en cultius de cèl·lules intestinals, i de cèl·lules mononuclears de la lamina pròpia *in vivo* en la mucosa intestinal de l'animal. No obstant, per a aconseguir-ho calia practicar un cateterisme intestinal o una lligadura de l'intestí (Cheng et al., 1997; Foreman et al., 1998; Wirtz et al., 1999), estratègies que dificulten una aplicació clínica en humans. D'altra banda, la transducció de la mucosa intestinal per administració intravenosa o intraperitoneal d'aquests vectors ha estat ineficient, trobant-se la majoria de l'expressió del transgen en altres òrgans com el fetge (Barbara et al., 2000; Hogaboam et al., 1997; Wirtz et al., 1999). No obstant aquests inconvenients, la teràpia gènica amb vectors adenovirals ha mostrat potencial en el tractament de la colitis en models preclínics (Barbara et al., 2000; Lindsay et al., 2004). Per exemple, una sola injecció sistèmica d'un vector adenoviral amb el transgèn IL-10 era suficient no només per prevenir l'aparició de colitis, sinó també per induir la remissió clínica i histològica en ratolins amb malaltia establerta (Lindsay et al., 2001). A més les cèl·lules epitelials intestinals de pacients amb MII poden ser transduïdes *ex vivo* de manera eficient per vectors adenovirals (Schmiedlin-Ren et al., 2005).

Una de les estratègies utilitzades per augmentar l'eficiència va ser la injecció de dosis més altes de vector (Brunetti-Pierrri et al., 2004, 2005; McCormack et al., 2006). Malauradament, es va observar toxicitat hematològica i hepàtica en estudis amb animals, el que implica que és necessari el desenvolupament d'un nou tipus de vector adenoviral més eficient abans de considerar les aplicacions clíniques. Després de considerar els resultats descrits anteriorment, sembla que aquesta ineficiència es deu a una falta de especificitat en el tropisme intestinal de les soques de virus seleccionades.

Per transfectar eficientment un determinat tipus cel·lular és necessària una interacció específica virus-cèl·lula en la que intervé de forma determinant la proteïna viral *fiber*. Els virus clàssics (Ad5) són virus respiratoris amb proteïnes *fiber* que són específiques per a receptors localitzats en l'epiteli del pulmó i altres teixits respiratoris i no s'uneixen eficientment a enteròcits diferenciats (Croyle et al., 1998; Walter et al., 1997), i quan són administrats, bé per via intrainestinal o via intravenosa, l'Ad5 transfecta principalment altres òrgans com el fetge (Smith et al., 2002). Així doncs, sembla evident que l'ús de virus entèrics, com els adenovirus del subgrup F (Ad40 i Ad41) pot incrementar l'eficiència de transfecció al millorar la seva unió específica l'epiteli intestinal (Schoggins et al., 2003a), ja que el tropisme específic d'aquests adenovirus és el resultat d'una adaptació específica que converteix aquests virus en uns patògens molt eficaços per al tracte gastrointestinal. No obstant, per la falta de virus recombinants basats en el genoma dels adenovirus entèrics, els estudis de teràpia gènica en el tracte gastrointestinal s'han realitzat en vectors quimèrics derivats de l'Ad5 (Fig. 14).

La biodistribució dels adenovirus quimèrics s'ha estudiat anteriorment només a nivell intravenós, amb uns resultats poc rellevants en quant a la transfecció de l'intestí. En aquest treball (Nakamura et al., 2003), es van infectar ratolins amb els adenovirus quimèrics (2×10^{10} PP/animal) per via intravenosa. Al cap de 4 dies, i es va mesurar l'expressió del transgen (LacZ). En aquest experiment, la major part de l'expressió de LacZ es va detectar en el fetge i en la melsa, sense observar diferències significatives entre els diferents vectors (exceptuant el vector F/40S, que mostrava una infectivitat menor en aquests dos òrgans). Quan s'analitzaven altres teixits com el pulmó, el cor, el ronyó i l'intestí, on nivell d'expressió era molt menor, tampoc s'observaven diferències significatives entre els vectors.

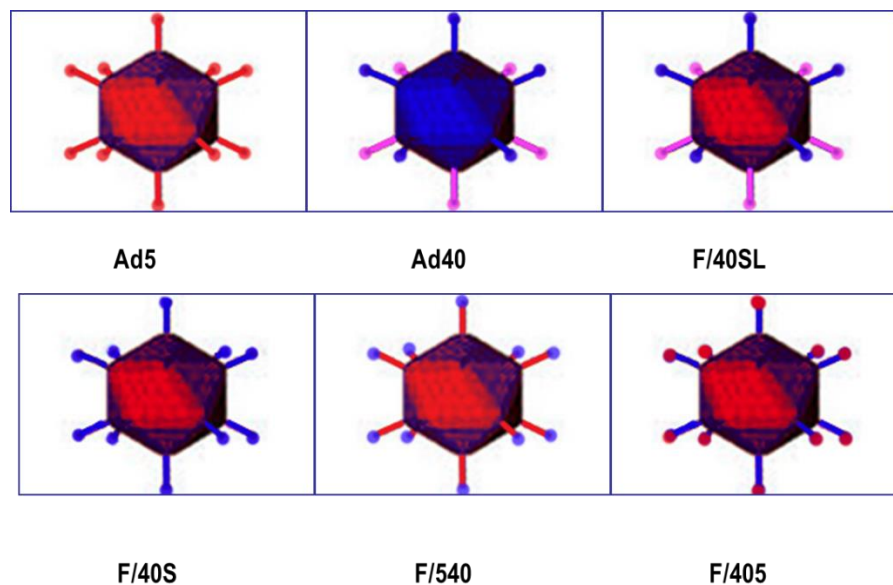


Fig. 14. Diagrama dels adenovirus quimèrics 5/40. Segons l'adenovirus d'origen, el dominis de la proteïna *fiber* són vermells (Ad5), blau (*fiber* curt d'Ad40) o lila (*fiber* llarg de l'Ad40)

A més, tot i demostrar que la llargada del *shaft* del *fiber* influeix en el tropisme dels adenovirus per fetge i melsa, no es va analitzar quins altres efectes en el tropisme es podrien observar utilitzant altres vies d'administració. Per aquesta raó, la utilització dels mateixos vectors des d'una aproximació totalment diferent, l'administració directa dels vectors al tracte digestiu, pren molta força com una hipòtesis vàlida per aquest vector, ja que una aproximació gastrointestinal no només mimetitza l'entrada natural dels adenovirus salvatge, sinó que també permet disminuir la resposta humoral preexistent associada a la administració sistèmica.

OBJECTIUS

La malaltia inflammatòria intestinal (IBD) engloba un grup de malalties (entre les quals la malaltia de Crohn i la colitis ulcerosa) que es caracteritzen per una inflamació crònica del tub digestiu. La IBD requereix un tractament mèdic i farmacològic a la mida, ja que no tots els pacients responen a les teràpies establertes i sovint aquests medicaments poden causar efectes secundaris greus. Per això, la IBD és la patologia crònica més important que afecta al tracte gastrointestinal en humans.

Actualment existeixen diferents tipus de teràpies per a la IBD que permeten millorar la qualitat de vida dels pacients, però tot i que totes representen avanços significatius, cap d'aquestes teràpies aconsegueix eliminar totalment la malaltia. Per aquesta raó, i com objectiu general, ens vam proposar caracteritzar i analitzar el potencial terapèutic d'adenovirus quimèrics 5/40 de tropisme específic intestinal per a la futura aplicació com vectors de teràpia gènica per a la Malaltia Inflamatòria Intestinal.

Per a l'anàlisi i caracterització d'aquests vectors, els objectius específics han estat:

1. Optimització de la producció dels vectors quimèrics 5/40 amb gens marcadors.
2. Anàlisi de les característiques que la incorporació del *fiber* confereix als vectors quimèrics 5/40.
3. Caracterització del tropisme *in vitro* i *in vivo* dels vectors quimèrics 5/40 i anàlisi del seu potencial terapèutic.
4. Generació de nous genomes i constructes per permetre la clonació dels gens terapèutics.

RESULTATS

En aquest treball es va analitzar el potencial dels vectors Ad5/40 com a eina de teràpia gènica amb aquests objectius:

- millorar la producció
- caracteritzar el seu tropisme *in vitro* i *in vivo* per diferents rutes d'administració (intravenosa, oral i rectal)
- i generar nous genomes i constructes per permetre la clonació dels gens terapèutics

Els adenovirus quimèrics Ad5/40 amb que es van realitzar els experiments es van amplificar a partir de les al·lotes inicialment cedides pel Dr. Hamada (Nakamura et al., 2003). Així es van amplificar 5 tipus diferents d'adenovirus quimèrics Ad5/40, amb diverses combinacions de les diferents regions de la proteïna *fiber* de l'Ad5 i de la proteïna *fiber* de l'Ad40. Tots els adenovirus quimèrics estan basats en el viriò de l'Ad5 i estan pseudotipats amb diferents *fibers* (Fig. 15). El vector F/40SL està pseudotipat amb els 2 *fibers* de l'Ad40, el curt i el llarg, mentre que el vector F/40S només conté el *fiber* curt de l'Ad40. El vector F/540S està compost pels dominis *tail* i *shaft* del *fiber* de l'Ad5 i el domini *knob* de la proteïna *fiber* curta de l'Ad40, mentre que l'F/405 es compon dels dominis *tail* i *shaft* del *fiber* curt de l'Ad40 i el domini *knob* de l'Ad5. Tots aquest virus codifiquen pel gen marcador β -galactosidasa. Finalment, també hi ha un F/40S que com a gen marcador conté el gen de la proteïna verd fluorescent (GFP).

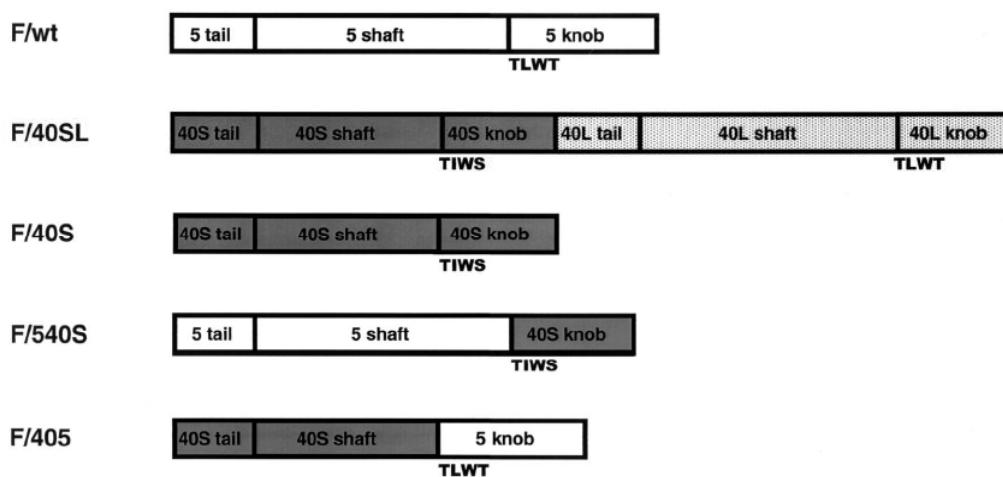


Fig. 15 Representació esquemàtica de les proteïnes *fiber* quimèriques incorporades a la càpsida d'Ad5. Adaptat de Nakamura et al, *Journal of Virology*, 2003.

En primer lloc es va realitzar una caracterització exhaustiva dels vectors per tal de determinar les possibilitats reals per convertir-se en vectors de teràpia gènica dirigida a l'intestí. I un cop realitzats aquests estudis es va procedir a l'anàlisi en animals sans i en models de la malaltia.

1. CARACTERITZACIÓ DEL FIBER DELS ADENOVIRUS QUIMÈRICS

1.1. Verificació de la presència del fiber en els adenovirus quimèrics 5/40

Per tal de verificar la presència del *fiber* en els adenovirus quimèrics 5/40, es va procedir a analitzar les partícules virals mitjançant microscòpia electrònica, amb l'objectiu d'observar el *fiber* tal com havia mostrat Favier anteriorment (Favier et al., 2002). Per això es van preparar mostres de F/40SL d'aproximadament 0,1 mg de proteïna/ml, es van aplicar a una superfície de carboni en mica (carbon/mica interface) i es va tenyir negativament amb molibdat d'amoni. Les fotografies es van prendre en condicions de baixa dosis amb el microscopi Tem Jeol 2011 a 100 kV.

En les imatges (Fig. 16) es pot observar que la preparació de virus és de bona qualitat, ja que no hi ha agregació i la majoria de càpsides estan plenes (amb una proporció 1:5 de càpsides buides versus càpsides plenes). En les imatges també podem observar la forma icosaèdrica de les càpsides, i les proteïnes hexon. Malauradament, els *fibers* son estructures molt fràgils, ja que es troben externs de la càpsida i no tenen mes suport que la unió amb el *penton*. Per aquesta raó és la primera estructura en quedar destruïda per la tècnica de microscòpia electrònica i no vam ser capaços d'observar-los en les nostres mostres.

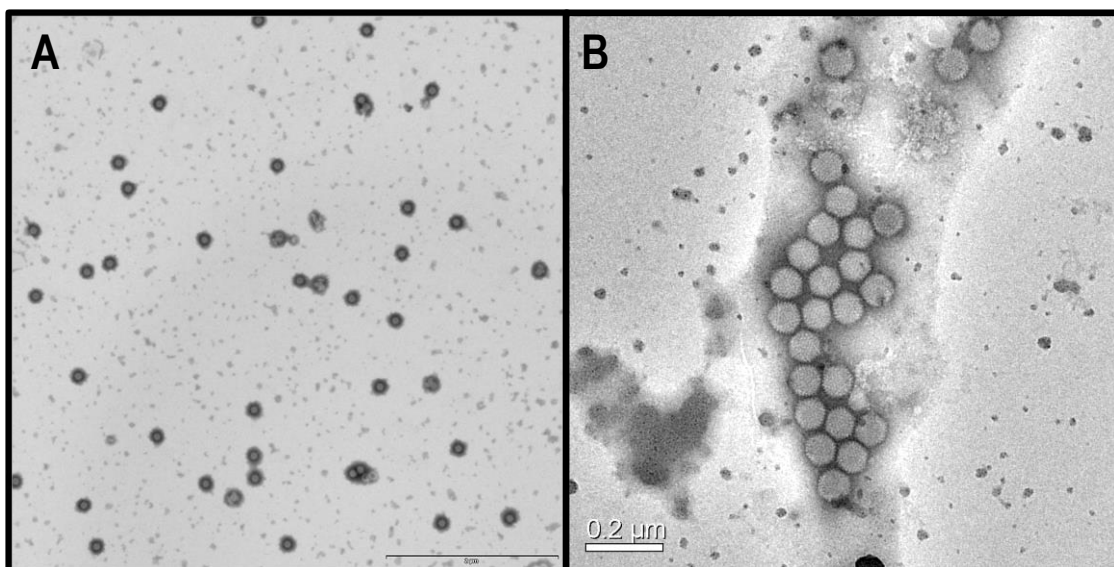


Fig. 16. Imatges de microscòpia electrònica del AdF/40S amb tinció negativa amb molibdat d'amoni. (A) En aquesta imatge general es pot observar que la majoria de partícules estan disperses i no formen agregats. (B) El Zoom de 12000X ens mostra un grup de partícules virals, on s'observen càpsides plenes (21) i càpsides buides (4).

Al no poder observar el *fiber* mitjançant la microscòpia electrònica, es va voler confirmar la presència del gen *fiber* en els genomes virals per PCR, utilitzant encebadors específics per als

fibers a partir dels virions com a motlle de DNA i el genoma del *fiber* de l'Ad5 com a control positiu. La mida de les bandes esperades en aquesta amplificació era la següent (Taula 9):

Taula 9. Comparació de la mida teòrica (Kb) de les proteïnes *fiber*

VECTOR	FIBER CURT (Kb)	FIBER LLARG (Kb)
Ad 5	N/A	1,7
F/40SL	1,1	1,6
F/40S	1,1	N/A
F/540S	N/A	1,7
F/405	1,3	N/A

No obstant, només es va poder amplificar el gen *fiber* de l'F/40S, que conté el *fiber* curt de l'Ad40, obtenint una banda de 1,1 kb, i el gen *fiber* de l'F/540S, el qual està compost pels dominis *tail* i *shaft* del *fiber* de l'Ad5 i el domini *knob* de la proteïna *fiber* curta de l'Ad40, i la banda que s'obté té una mida de 1,7 kb, la mateixa que la de l'Ad5. (Fig. 17). Malauradament, tot i repetir la PCR varies vegades (n=6) i disminuir la temperatura d'alineament per afavorir la unió de l'encebador, no vam ser capaços d'amplificar ni els *fibers* de l'F/40SL ni el *fiber* quimèric de l'F/405.

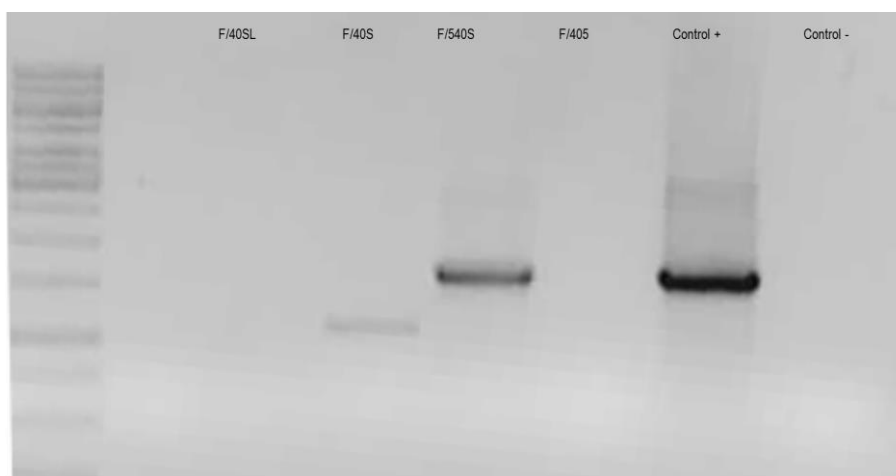


Fig. 17. Amplificació del *fiber* utilitzant encebadors específics per a cada combinació. El DNA que es va utilitzar com a motlle es va extreure dels virions dels adenovirus quimèrics, i es va utilitzar el genoma del *fiber* de l'Ad5 com a control positiu

Finalment, per confirmar la presència de la proteïna *fiber* en la càpsida de l'adenovirus, un cop es va descartar la tècnica de microscòpia electrònica i la PCR, es va realitzar una electroforesis de proteïnes SDS-PAGE seguida d'un anàlisi Western blot dels virions. Es va utilitzar l'anticòs primari monoclonal 4D2 que reconeix els 17 primers aminoàcids de la cua del *fiber* de l'Ad5. Tot i no ser

totalment homòlogues, l'anticòs també reconeix la regió de la cua dels *fiber* 40S i 40L. En la Fig. 18 es mostren les bandes corresponents als *fiber* desnaturalitzats, on el *fiber* F/540 (PM teòric 59,0 kDa) té una mida similar al *fiber* F5 (PM teòric 61,5 kDa), mentre que el *fiber* F/405 (PM teòric 43,9 kDa) té una mida similar al *fiber* F/40S (PM teòric 41,4 kDa). L'F/40SL mostra les dues mides de *fiber*.

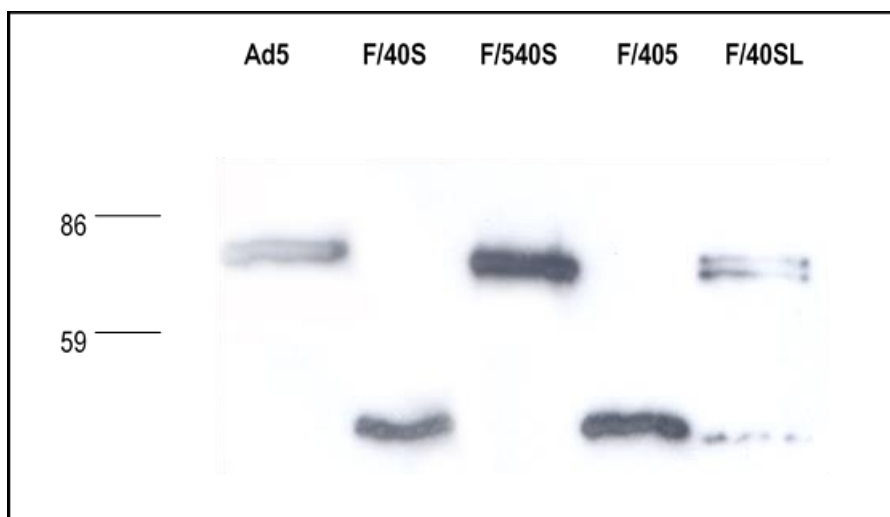


Fig. 18. Identificació de la proteïna *fiber* en l'adenovirus 5 i els adenovirus quimèrics 5/40. 5×10^9 PP de cada virus es van desnaturalitzar per calor i es van analitzar en SDS-PAGE i Western blot, utilitzant l'anticòs primari monoclonal 4D2.

1.2. Amplificació d'adenovirus quimèrics 5/40 amb gens marcadors.

La producció dels adenovirus es va dur a terme als laboratoris de seguretat biològica de nivell 2 del Laboratori de Teràpia Gènica de la Universitat Autònoma de Barcelona. El protocol inicial de producció d'adenovirus es va basar en els protocols d'amplificació de l'Ad5, a on l'amplificació es realitza esglaonadament, de manera que en cada pas es va augmentant progressivament el títol del virus (Alba et al., 2007). Primer es fan dos cicles de 72 hores i un cicle final de 36 hores. En cada cicle es recullen les cèl·lules i el sobrenedant conjuntament, i es realitzen tres congelacions/descongelacions per a que s'alliberi el virus que està en la cèl·lula. Es centrifuga tot el contingut per eliminar les restes cel·lulars i el sobrenedant que es recupera s'utilitza per amplificar el virus en passos successius fins arribar a les 20 plaques de 15 cm (aproximadament 4×10^8 cèl·lules), on el cicle final és de 36 hores. Un cop obtinguts els vectors re-suspesos en el sobrenedant, es realitzen dues centrifugacions seriades en gradient de CsCl. D'aquesta manera, s'observen normalment 3 bandes: una banda de major densitat, on es troben les càpsides formades amb DNA, i dues de menor densitat, que corresponen a les càpsides buides i a les proteïnes virals (Fig. 19).

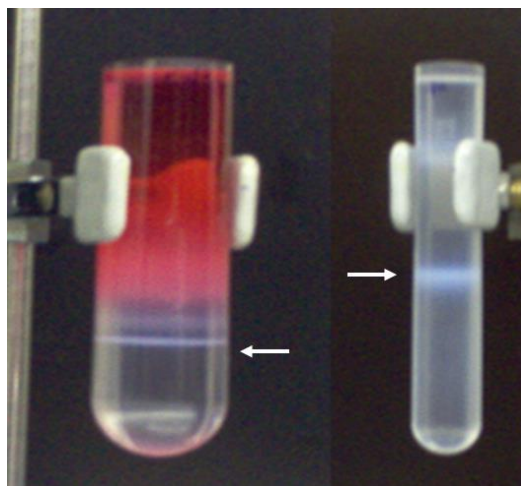


Fig. 19. Bandes obtingudes després de la centrifugació en gradient de CsCl en la purificació d'Ad5. La imatge de l'esquerra correspon a la primera centrifugació, i la de la dreta a la segona. Les fletxes marquen les bandes que contenen el virus madur.

S'extreu la banda de major densitat i s'eliminen les restes de CsCl de la mostra utilitzant una cromatografia d'exclusió molecular. La titulació en partícules infeccioses dels adenovirus es va realitzar mitjançant una dilució límit a punt final en cèl·lules permissives HEK293 (Graham et al., 1977). Les partícules físiques és un valor que ens informa del número total de càpsides amb genoma viral en la preparació, i s'obté alliberant el DNA a l'exterior per temperatura (56°C) i mesurant l'absorbància a la longitud d'ona de 260 nm.

Quan es van amplificar els adenovirus quimèrics seguint el protocol clàssic producció de l'Ad5, no es van aconseguir partícules infectives, tot i que s'observaven les bandes en el gradient de CsCl, el que indicava producció de partícules físiques. Per solucionar aquest problema es va decidir canviar dos passos crucials del protocol (Fig. 20):

- a) en el procés inicial d'infecció es va augmentar per 10 el número de virus per cèl·lula (MOI) i
- b) en lloc de les 36 hores usuals es va donar un temps més llarg durant l'amplificació per facilitar al màxim la producció de virions amb capacitat infectiva .

Així, es van fer dos processos d'amplificació de 4 dies i un cicle final de producció sense límit de temps fins observar l'efecte citopàtic (CPE), que es produeix en el moment en que el virus llisa les cèl·lules. Tanmateix, els adenovirus quimèrics, a diferència dels vectors basats en l'adenovirus 5, mantenen en el seu genoma la proteïna Death (Tollefson et al., 1996a), involucrada en el procés de lisi de la membrana cel·lular i alliberament dels virions. Mentre que els virions d'Ad5 produïts romanen dins de la cèl·lula, els adenovirus quimèrics s'alliberen al medi, perdent-se una percentatge significatiu de virions en el sobrenedant, ja que en el protocol clàssic de producció

d'adenovirus no s'aprofita aquesta fracció. Per recuperar les partícules virals del sobrenedant i així augmentar el rendiment es va utilitzar el protocol de precipitació amb sulfat amònic (Fig. 20).

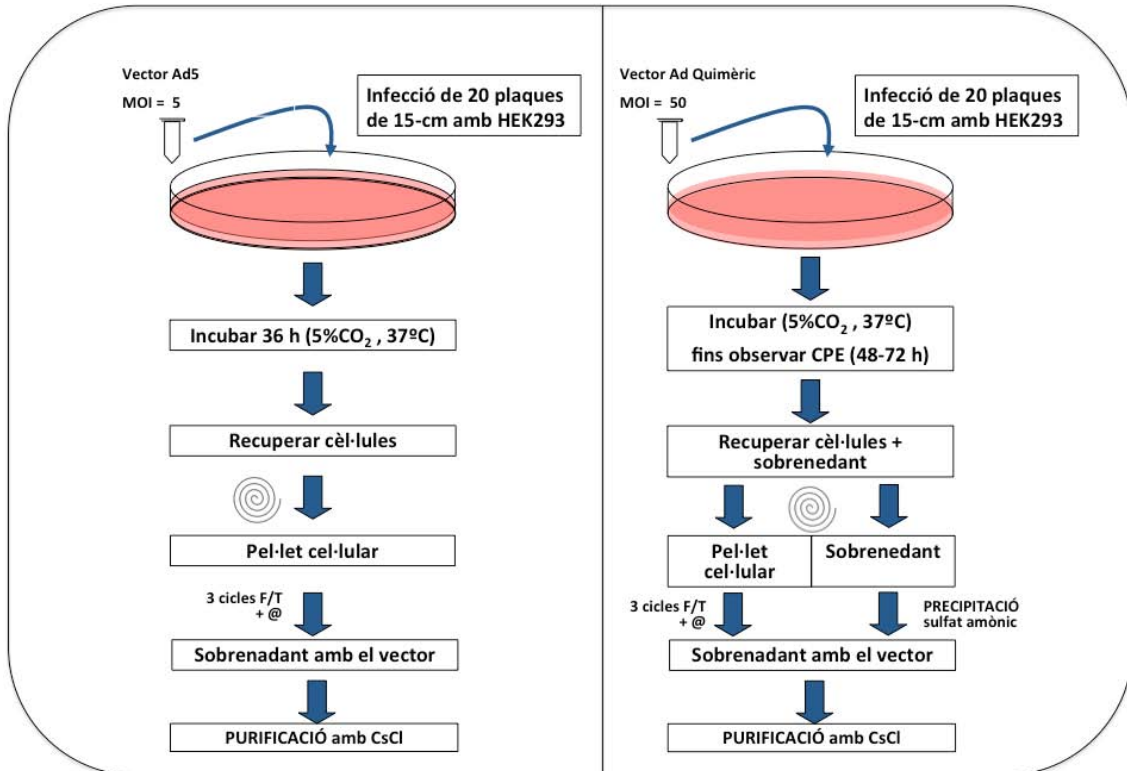


Fig. 20. Protocol d'amplificació clàssic (esquerra) i protocol d'amplificació posat a punt per als vectors quimèrics (dreta).

Amb aquest nou protocol es van poder amplificar els adenovirus quimèrics amb una eficiència acceptable i constant. Si amb el protocol clàssic la eficiència d'amplificació era de 2-4 vegades, amb el protocol optimitzat l'eficiència era entre 20 i 25 vegades per cada cicle.

En el moment de la purificació, també es va tenir en compte la diferent composició de les proteïnes *fiber* dels virions, ja que podien fer variar el diàmetre de les partícules virals i, en conseqüència, alterar el procés final de purificació per cromatografia d'exclusió molecular. Per aquesta raó es van recollir totes les fraccions d'elució de la columna de cromatografia per separat i es van quantificar individualment. Tot i que no es van observar diferències entre les purificacions dels diferents adenovirus quimèrics, aquest procediment va permetre agrupar les fraccions amb títol més semblant, i així aconseguir fraccions més concentrades, recuperant més adenovirus i obtenint un rendiment més elevat (Taula 10). En total, de cada producció s'obtenien entre 2,5 i 3 mL de virus purificat.

Taula 10. Títols de partícules físiques i infeccioses dels adenovirus quimèrics

Vector	Vector		Ratio
	Partícules/ml ^a	IU/ml ^b	Partícules:IU
Ad5	4,5 x 10 ¹²	2,5 x 10 ¹¹	18:1
F/40SL	1,5 x 10 ¹²	2,9 x 10 ¹⁰	51:1
F/40S	5,6 x 10 ¹²	1,3 x 10 ¹⁰	430:1
F/540	1,8 x 10 ¹²	6,4 x 10 ⁹	280:1
F/405	2,5 x 10 ¹²	4,00 x 10 ⁹	625:1

^a Calculat per OD₂₆₀ (1.1 x 10¹² virions per OD₂₆₀) (Maizel et al., 1968) ^b Dilució a punt final en cèl·lules HEK293

Cal destacar que la infectivitat varia molt d'un vector quimèric a un altre encara que tots els vectors es van amplificar seguint el mateix protocol. Tot i que aconseguim valors semblants en les partícules virals produïdes, els títols són més baixos que els d'una producció d'Ad5 clàssic, on s'obtenen títols de l'ordre de 5x10¹² PP totals, encara que hi ha una variabilitat gran en el ratio IU/PP. Aquestes diferències es podrien explicar si efectivament, al modificar el *fiber* del vector es produeix una modificació del tropisme, ja que anteriorment ja s'havia descrit que l'Ad40 tenia una baixa infectivitat en cèl·lules 293 (Takiff et al., 1981; Tiemessen and Kidd, 1994).

Una vegada es va obtenir material suficient per poder fer el propers experiments, es va decidir optimitzar encara més el protocol de producció per facilitar així produccions eficients que permetin treballar en condicions *in vivo* en models animals. En aquest sentit es va treballar en dos eixos, (I) caracteritzar el cicle viral dels virus quimèrics per determinar el millor temps de recollida i (II) analitzar l'estabilitat i tropisme de les càpsides quimèriques.

1.3. Caracterització del cicle viral dels adenovirus quimèrics

En primer lloc, els vectors Ad5/40 quimèrics van ser produïts utilitzant el protocol clàssic de producció de l'Ad5 (Alba et al., 2007). Malauradament, quan es va amplificar els adenovirus quimèrics seguint aquest protocol, no es van aconseguir partícules infectives (veure secció 1.2.)

Atès que diversos autors havien observat que la proteïna *fiber*, a banda del paper en la unió del virus a la superfície cel·lular, probablement també modulava el trànsit intracel·lular (Miyazawa et al., 1999; Shayakhmetov et al., 2003), es va estudiar si la incorporació de les proteïnes *fiber* de l'Ad40 en les càpsides Ad5 afectaven el cicle cel·lular viral. Per aquest experiment, es van infectar

cèl·lules HEK293 a una MOI=1, amb vectors Ad5 o Ad5/40 quimèrics.

Les cèl·lules infectades es van recollir cada 12 hores, recuperant les partícules virals i quantificant-les mitjançant el mètode de dilució a punt final (Chillon and Alemany, 2011).

Com s'observa a la Fig. 21, l'Ad5 segueix un cicle cel·lular viral de 36 hores, mentre que el vector quimèric que duu la proteïna *fiber* curta de l'Ad40 (vector F/40S) té un cicle d'entre 48 a 60 hores. A més, a les 36 hores, la productivitat del vector AdF/40S és vint vegades menor que al final del seu cicle viral, el que explica per què l'amplificació de Ad5/40 vectors quimèrics és ineficient quan s'utilitzen els procediments estàndard d'amplificació per Ad5. A més, destaca sobretot que, deixant el cicle víric dels adenovirus quimèrics a 48-60 hores, el nivell de productivitat per cèl·lula està gairebé al mateix rang (només dues vegades menys) que els valors obtinguts per l'Ad5 a 36 hores. Com a conseqüència a partir d'aquest moment es va modificar el protocol de producció dels vectors augmentant-lo de 36 hores a 60 hores.

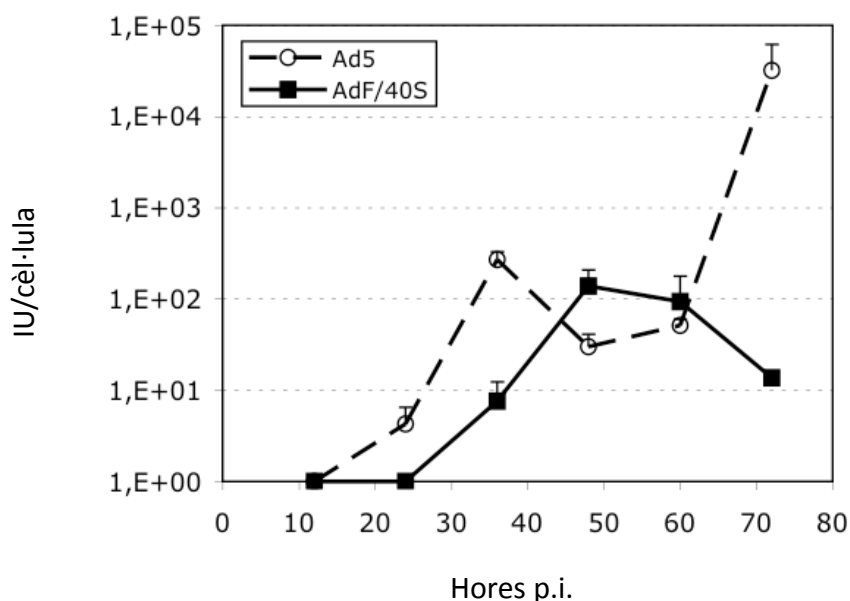


Fig. 21. Cicle viral de l'Ad5 i de l'F/40S. Es pot observar que la producció d'Ad5 té dos pics, un a les 36 hores i un segon a les 72 hores. En l'F/40S, en canvi, s'observa un pic menys definit entre les 48 i 60 hores. p.i.: post infecció

1.4. Anàlisi de la inestabilitat de la càpsida dels adenovirus quimèrics

La menor infectivitat observada en les titulacions de les produccions dels adenovirus quimèrics es pot atribuir a la disminució o absència d'interacció del *fiber* 40S amb el receptor CAR i amb altres receptors de les cèl·lules 293. Però també pot estar ocasionada per una càpsida viral menys estable a causa del pseudotipatge del virus. Per descartar aquesta segona opció, es van infectar

cèl·lules SKOV-3 amb virus prèviament exposat a factor X. El factor X és un factor sanguini implicat en la coagulació i s'ha demostrat *in vitro*, els adenovirus poden infectar les cèl·lules utilitzant el factor X com a molècula pont (Xu et al., 2013). Les cèl·lules SKOV-3 tenen nivells molt baixos de receptor CAR a la seva membrana, de manera que l'entrada del virus a les cèl·lules estarà dirigida principalment per la unió de l'*hexon* al factor X. Les cèl·lules SKOV-3 es van infectar amb 100 PP/cèl·lula dels adenovirus Ad5GFP i F/40SGFP prèviament exposats a factor X, i es van analitzar per citometria de flux a les 24 hores. Tal com s'observa a la Fig. 22, la infectivitat augmenta en els mateixos nivells tant en l'adenovirus 5 com en l'adenovirus 40, demostrant que la menor infectivitat en HEK293 no està causada per una menor estabilitat de la càpsida, sinó a l'entrada ineficient del vector.

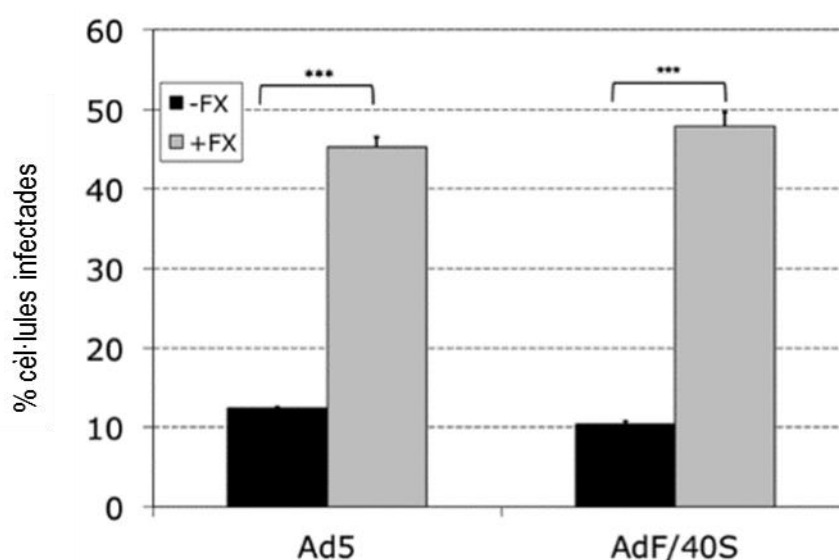


Fig. 22. Anàlisi de la infectivitat de l'Ad5 i l'Ad40 en cèl·lules SKOV-3. Es van infectar cèl·lules SKOV-3 amb 100 PP/cèl·lula dels adenovirus Ad5GFP i F/40SGFP prèviament exposats a factor X, i es van analitzar per citometria de flux a les 24 hores (n=3).

1.5. Anàlisi de l'entrada dels vectors quimèrics a la cèl·lula (*trafficking*)

El procés d'entrada de l'adenovirus a la cèl·lula es divideix en 5 etapes: unió al receptor (Binding), entrada a la cèl·lula (Entry), escapament de l'endosoma (Lysis), transport a través del citoplasma (Translocation) i entrada al nucli (Import) (Fig. 23).

L'entrada de l'adenovirus s'inicia amb la unió del *fiber* al receptor cel·lular (interacció primària) i la unió del *penton* amb les integrines (interacció secundària). La unió a les integrines estimula la senyalització cel·lular i indueix la introducció del virió a través d'una vesícula (endosoma). Una vegada dins la cèl·lula, el medi de l'endosoma s'acidifica, la càpsida es dissocia i permet

l'alliberació del virió en el citoplasma. Amb l'ajuda dels microtúbuls, el virió es transportat cap a un porus nuclear. Allí la càpsida es disgrega, el DNA s'allibera i entra al nucli a través d'un porus, on inicia l'expressió del gens virals per generar noves càpsides.

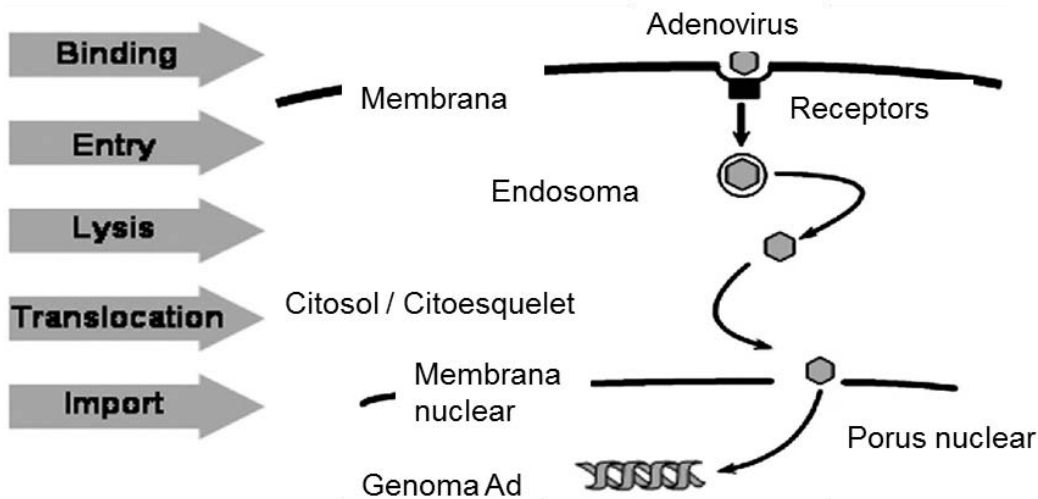


Fig. 23. Etapes d'entrada del virus a la cèl·lula. Adaptat de Leopol et al, *Advanced drug delivery reviews*, 2007.

Els resultats exposats anteriorment indicaven que la menor infectivitat en HEK293 podia ser causada per una entrada ineficient del vector a la cèl·lula, però també volíem analitzar si etapes posteriors a l'entrada fins arribar al nucli estaven també afectades en aquests vectors.

Per dur a terme aquests estudis, vaig realitzar una estada de 3 mesos (setembre-desembre 2007) a l'Institut de Genètica Molecular de Montpel·lier (IGMM), dins del grup del Dr. Erik Kremer, expert reconegut internacionalment en trafficking d'adenovirus. L'objectiu d'aquesta estada era produir adenovirus quimèrics marcats radioactivament (amb sulfur-35) o fluorescentment (fluorocroms), i amb ells estudiar els processos d'unió a la membrana (binding), internalització dels vectors (entry) quimèrics i transport cap al nucli (translocation i import). Tot i que es va aconseguir produir els vectors marcats radioactivament i fluorescentment, no es va poder posar a punt les tècniques d'internalització i transport cap al nucli a causa de la baixa activitat específica d'aquest vectors quimèrics. Tot i això, sí que es van poder realitzar els estudis de binding (Fig. 24).

Els vectors marcats radioactivament es van posar en contacte amb les cèl·lules a 4°C durant 120 min de manera que es poguessin unir als receptors de la cèl·lula. A cada temps es van rentar les cèl·lules i es va canviar el medi a 37°C, de manera que només els vectors que s'haguessin unit durant el període d'incubació podrien entrar a la cèl·lula. En la figura es pot observar que la

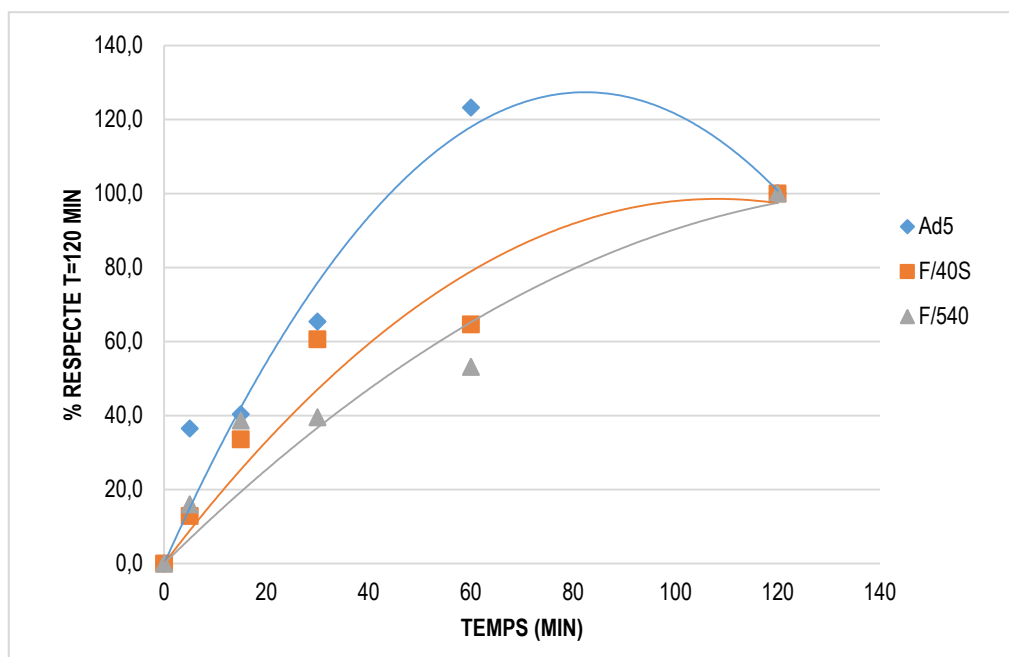


Fig. 24. Estudis unió a la membrana cel·lular. Els vectors marcats radioactivament es posen en contacte amb les cèl·lules a 4°C durant 120 min. A cada temps es canvia el medi a 37°C, de manera que només els vectors que s'hagin unit durant el període d'incubació podran entrar a la cèl·lula (n=3).

velocitat d'unió a la membrana de les cèl·lules de l'Ad5 es més ràpida que la resta de vectors. Una de les mesures més utilitzades en els estudis de cinètica es comparar el temps que es tarda en arribar al 50% del total. En el cas de l'Ad5, el temps son 20min, en el F/40S son 30 min, i en el F/540 en 45 min, el doble que l'Ad5, indicant clarament que la modificació del *fiber* afecta a la cinètica d'unió del virió i que per tant, l'entrada ineficient del vector és una de les causes de l'extensió del cicle cel·lular.

1.6. Anàlisi del tropisme *in vitro* dels adenovirus quimèrics

A continuació vam analitzar si el canvi de *fiber* també afectava el tropisme dels vectors quimèrics, comparant la seva infectivitat versus la de l'Ad5 en diferents línies cel·lulars *in vitro* (Taula 11).

Per a realitzar l'experiment, es van infectar 3×10^5 cèl·lules de cada línia amb els virus Ad5, F/40SL, F40S i F5/40 i es va analitzar l'expressió de β -galactosidasa a les 24 hores. Es va realitzar una infecció amb igual nombre de partícules físiques (125 PP/cèl·lula), amb l'objectiu de comparar la infectivitat utilitzant la infectivitat de l'Ad5 com a referència. Les dades es mostren agrupades per tipus cel·lulars a fi de facilitar-ne la interpretació. La infectivitat es mostra com a percentatges, on 100% es la infectivitat obtinguda en cada tipus cel·lular amb l'Ad5.

Taula 11. Línies cel·lulars utilitzades en els experiments de tropisme

GRUPS	LÍNIA CEL·LULAR
Producció d'adenovirus	HEK 293
	211B
	N52
Origen Intestinal	CaCo2
	HT29
Origen tumoral	U2OS
	HeLa
	A549
	SKOV3
	HepG2
Origen cèl·lules de Schwann	RT4
	S16

En línies cel·lulars utilitzades habitualment per produir vectors virals al laboratori (Fig. 25), es pot observar clarament com tots els vectors aconseguen transfectar les cèl·lules amb una eficiència molt semblant a l'Ad5, excepte l'F/40S, el qual mostra una infectivitat molt baixa de fins a 10 vegades menys en el cas de HEK293. En la línia N52, l'F/40S aconseguix una infectivitat màxima del 30%.

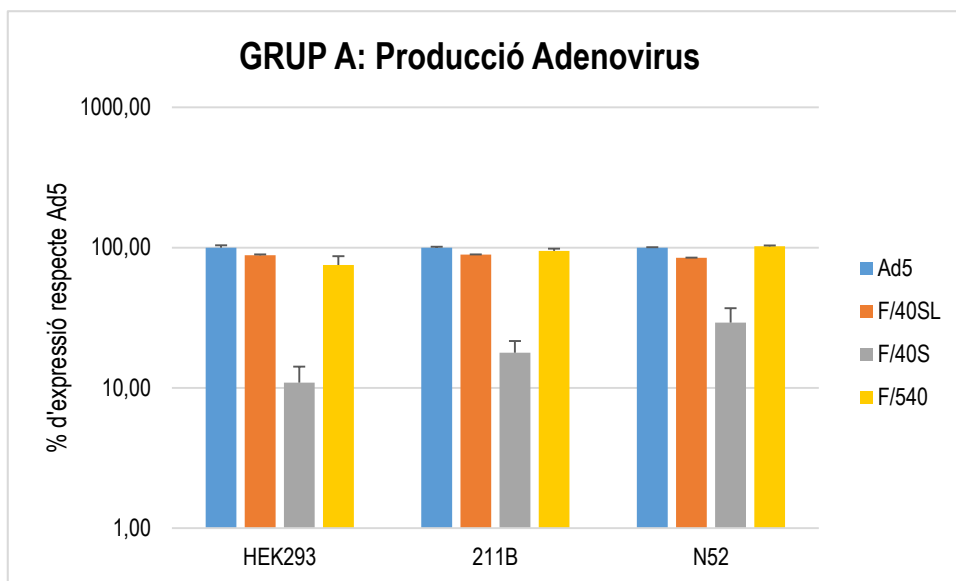


Fig. 25. Anàlisi del tropisme dels adenovirus quimèrics en línies cel·lulars utilitzades en la producció d'adenovirus (n=3).

Les línies cel·lulars HT29 i CaCo2 (Fig. 26) procedeixen d'adenocarcinoma colorectal, i per tant tenen un origen intestinal on es podrien trobar indicis de si realment els adenovirus quimèrics tenen un major tropisme per aquestes cèl·lules. En els nostres resultats observem que tan sols en l'F/540, el qual només incorpora el *knob* del *fiber* curt de l'Ad40, augmenta la infectivitat fins a 10 vegades en el cas de les CaCo2. La diferència es més moderada en el cas de les HT29, però arriba a ser 3 vegades superior que l'Ad5. No obstant, en un experiment posterior es va demostrar que l'F/40S mostrava una major eficiència de transfecció en línies cel·lulars d'origen intestinal com CaCo2, HT29 i LS174T (Rodríguez et al., 2013).

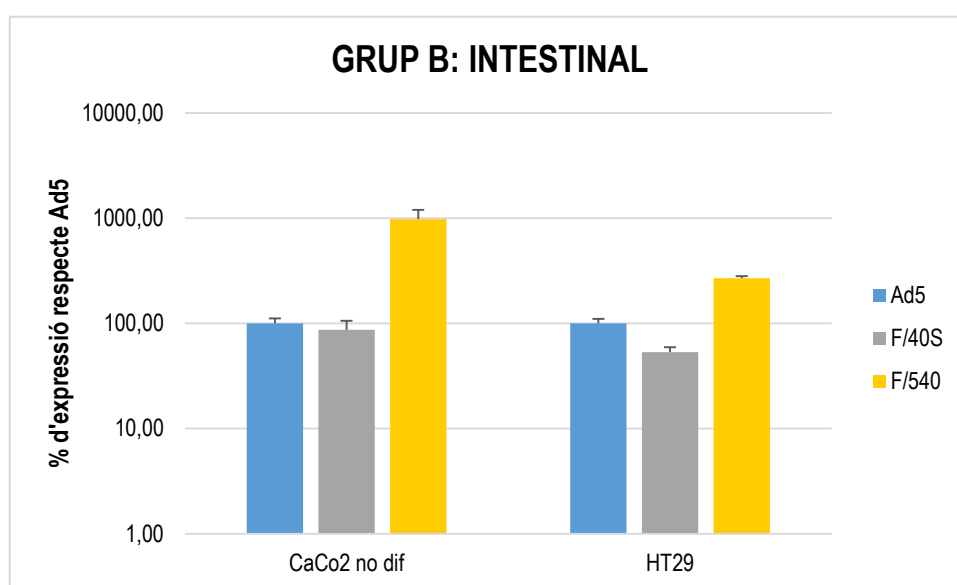


Fig. 26. Anàlisi del tropisme dels adenovirus quimèrics en línies cel·lulars d'origen intestinal.

Quan vam estudiar la capacitat infectiva dels adenovirus quimèrics en cèl·lules d'origen tumoral (Fig. 27) ens va sorprendre la capacitat infectiva de l'F/540, ja que en el cas de U2OS (origen ossi) i Ad549 (origen pulmonar) és de fins a 7 vegades més infectivitat que l'Ad5, i més moderada en HepG2 (3 vegades menys). L'F/40S també destaca per una major afinitat per aquests tipus cel·lulars, tot i que amb valors inferiors a l'F/540. Finalment, en HeLa, tots els vectors quimèrics mostren una baixa infectivitat (entre 10% del F/40SL al 25 % del F/540).

Quan vam estudiar la capacitat infectiva dels adenovirus quimèrics (Fig. 28) en les línies cel·lulars RT4 i S16, derivades de cèl·lules de Schwann, vam observar una increment de la infectivitat de tots els adenovirus quimèrics respecte a la infectivitat d'Ad5. En el vector F/40SL, aquest increment es de 2 vegades en les RT4 i quasi 4 en les S16. En F/40SL es un increment de quasi 4 vegades

en RT4 i 7 vegades en S16. Però el més destacat es l'F/540, que aconsegueix augmentar la infectivitat fins a 30 i 60 vegades en RT4 i S16, respectivament. Aquest fenomen també s'observa encara que en menor grau, i només per part de l'adenovirus F/540, en cèl·lules diferenciades.

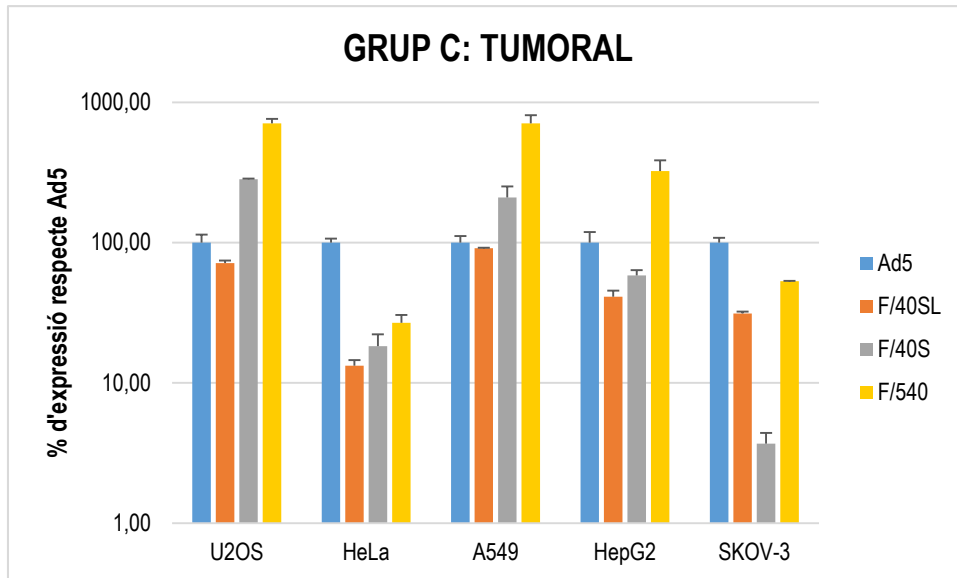


Fig. 27. Anàlisi del tropisme dels adenovirus quimèrics en línies cel·lulars d'origen tumoral

A continuació es va estudiar quines línies cel·lulars s'infecten amb més eficiència per a cada vector quimèric, comparant la seva infectivitat utilitzant la infectivitat en HEK293 com a referència. Les dades s'han agrupat per tipus cel·lulars (Fig. 29) i la infectivitat es mostra com a percentatges, on 100% es la infectivitat obtinguda en HEK293 per cada vector.

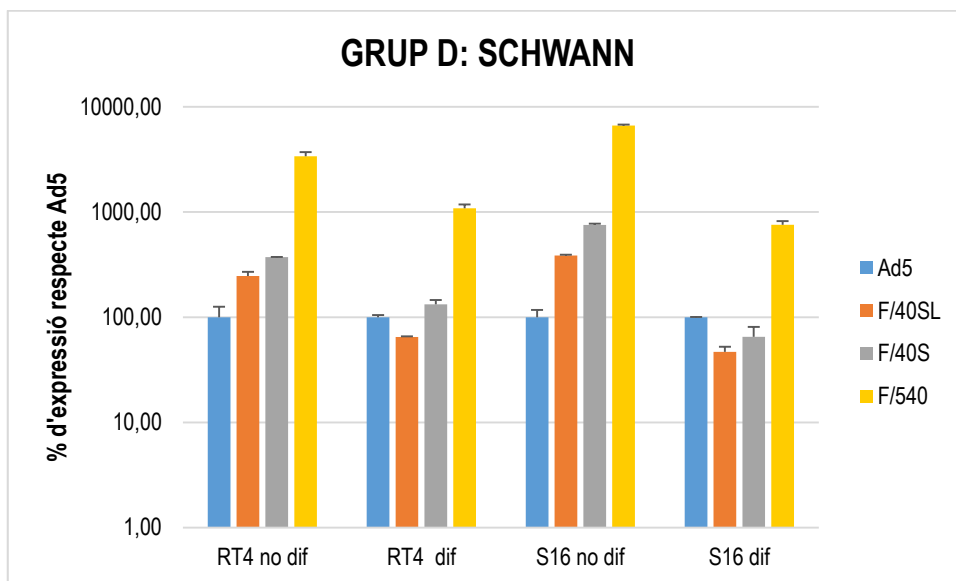


Fig. 28. Anàlisi del tropisme dels adenovirus quimèrics en línies cel·lulars procedents de cèl·lules de Schwann

El primer que s'observa es dos patrons ben diferenciats entre els vectors. Per una banda, l'Ad5 i el F/40SL mostren un perfil d'infectivitat molt similar, tot i que la infectivitat de l'Ad5 en HeLa i SKOV-3 és lleugerament superior. D'una altra banda, el F/40S i el F/540 mostren els dos una elevada afinitat per 211B i U2OS, on arribem a tenir fins a 4 vegades més capacitat infectiva que en HEK293, i en menor grau, per les RT4 i S16. Aquests resultats semblen indicar que el tropisme dels adenovirus quimèrics ve més definit pel domini *knob* que pel domini *shaft*.

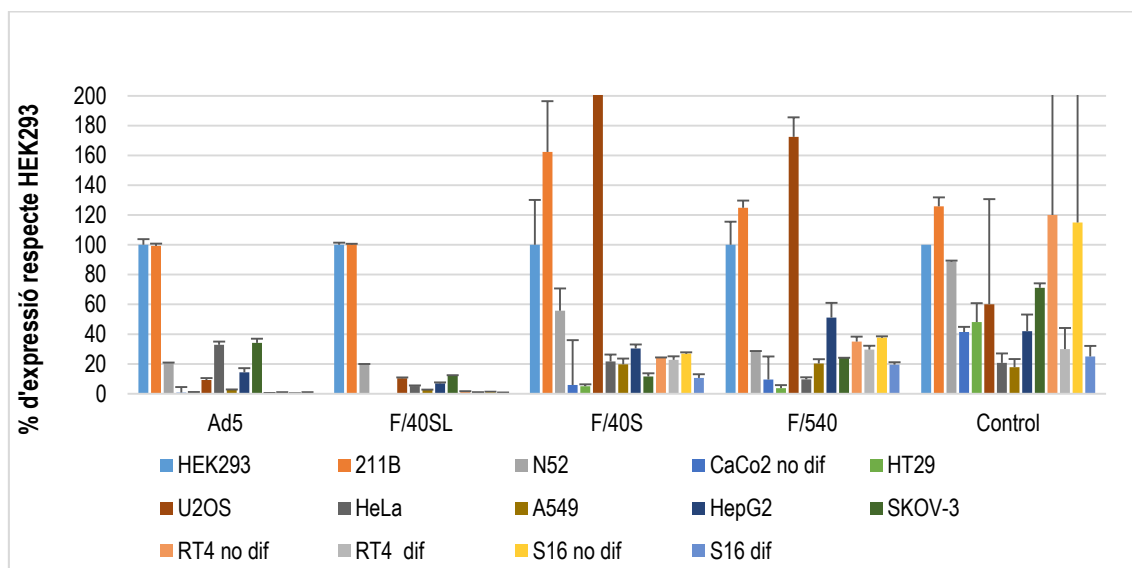


Fig. 29. Comparativa de la capacitat infectiva de cada vector per cada línia cel·lular. Els resultats es mostren com a percentatge de la infectivitat en HEK293.

Així doncs, sembla clar que la modificació del *fiber* altera el tropisme dels vectors, i que per aconseguir aquesta modificació, no es necessari el canvi total del *fiber*, ja que el F/540, el qual només conté un domini del *fiber*, també trobem el seu tropisme alterat.

2. CARACTERITZACIÓ DELS ADENOVIRUS QUIMÈRICS 5/40 COM A VECTORS DE TERÀPIA GÈNICA

2.1. Resistència a pH àcid

Tot i que no es coneix quina és la part del tracte digestiu que s'infecta pels adenovirus entèrics, és evident que aquests virus han de superar les condicions que es troben a l'estómac per tal d'arribar a l'intestí. Anteriorment, s'havia observat que una exposició breu (1 min) de l'altre adenovirus del grup F, l'Ad41, a àcid clorhídric (HCl) a pH 2 podia augmentar lleugerament la seva viabilitat, mentre que l'Ad2 s'inactivava en les mateixes condicions (Favier et al., 2004; Lu et al., 2009). En exposicions més llargues, també es podia observar una major viabilitat de Ad41 en comparació amb vectors Ad2 (Favier et al., 2004). En conseqüència, es va voler estudiar si la presència del *fiber* F40S i/o F/40L podien afectar tant la resistència a àcid com la infectivitat dels virus quimèrics 5/40.

En primer lloc, vam calcular els punts isoelèctrics teòrics (pIs) de les proteïnes *fiber* utilitzant l'[EMBL WWW Gateway to Isoelectric Point Service](#). Curiosament, la fibra curta Ad40 té un pI de 7.16, el qual és similar al del *fiber* llarg de l'Ad40 (pI 7,07) i considerablement més alt que el pI del *fiber* de l'Ad5 (6.00). Tanmateix és necessari destacar que, tal com passa per Ad41, la proteïna *fiber* curta de Ad40 té una distribució diferent de les regions bàsiques i àcides, amb els dominis de la cua i l'eix rics en aminoàcids bàsics (pI 9.08) i un *knob* més neutral amb un pI de 6.08, mentre que la regió *tail+shaft* del *fiber* 40 llarg si és semblant al *fiber* llarg de l'ad41 i al *fiber* de l'Ad5 (Taula 12).

Taula 12. Comparació dels punts isoelèctrics teòrics de les proteïnes *fiber*

FIBER	PI	PI (KNOB)	PI (TAIL+SHAFT)	ACCESION NUMBER
<i>Fiber</i> 5	6,00	6,33	6,11	P11818
<i>Fiber</i> llarg Ad41	7,07	8,76	5,37	P14267
<i>Fiber</i> llarg Ad40	7,07	8,4	5,83	P18047
<i>Fiber</i> curt Ad41	7,83	7,98	9,08	P16883
<i>Fiber</i> curt Ad40	7,16	6,92	9,10	P18048

Aproximadament el 87% de la massa de la partícula de l'Adenovirus consisteix en proteïnes (Piña and Green, 1965). Per tant, es pot assumir que la diferència de càrrega d'algunes de les proteïnes adenovirals majoritàries es reflexa en la càrrega total de la partícula. Per comprovar aquesta hipòtesis, es va analitzar la mobilitat de les partícules de l'Ad5 i l'F/40S mitjançant la observació de la migració en un gel d'agarosa no desnaturalitzant. En la Fig. 30 es pot observar que mentre l'Ad5 migra en direcció l'ànode, l'F/40S queda retingut als pous. Aquesta falta de mobilitat no es deguda a la possible formació de clústers de partícules, ja que com hem demostrat anteriorment per microscòpia electrònica (Fig. 16) no s'havia detectat agregació. En condicions no desnaturalitzants, la mobilitat de l'adenovirus en el gel depèn de la mida, la forma i la càrrega de la partícula. Els dos adenovirus són molt similars, ja que comparteixen la mateixa estructura de la partícula. Sembla per tant, que les diferències observades només es poden atribuir a la càrrega bàsica del *fiber*.

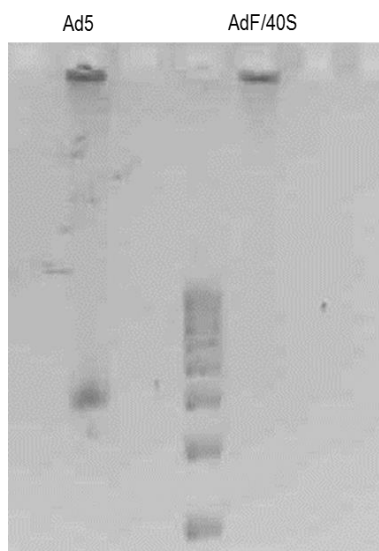


Fig. 30. Migració del genoma de l'Ad5 i l'Ad40S en gel d'agarosa no desnaturalitzant

Després, per determinar si el perfil bàsic del *fiber* curt podria conferir la protecció dels adenovirus entèrics durant el seu pas pel tracte gastrointestinal, es van infectar plaques de 24 pous sembrades amb cèl·lules HEK293 amb una MOI=0,4 de virus que prèviament havien estat exposats 3, 10, o 30 minuts a diferents pHs (pH=2, pH=4 o pH=7) i a 37°C, utilitzant un procediment adaptat de Favier (Favier et al., 2004). A un temps 2/3 del total del cicle cel·lular (24 hores pels Ad5 i 40 hores pels Ad5/40 quimèrics), es recollien les cèl·lules infectades i s'analitzaven per luminometria.

Els resultats es representen com el percentatge d'infecció obtinguda a un pH donat en comparació amb l'obtinguda quan el vector havia estat exposat a pH 7, mostrant l'activació o inhibició de la infecció pel tractament amb HCl.

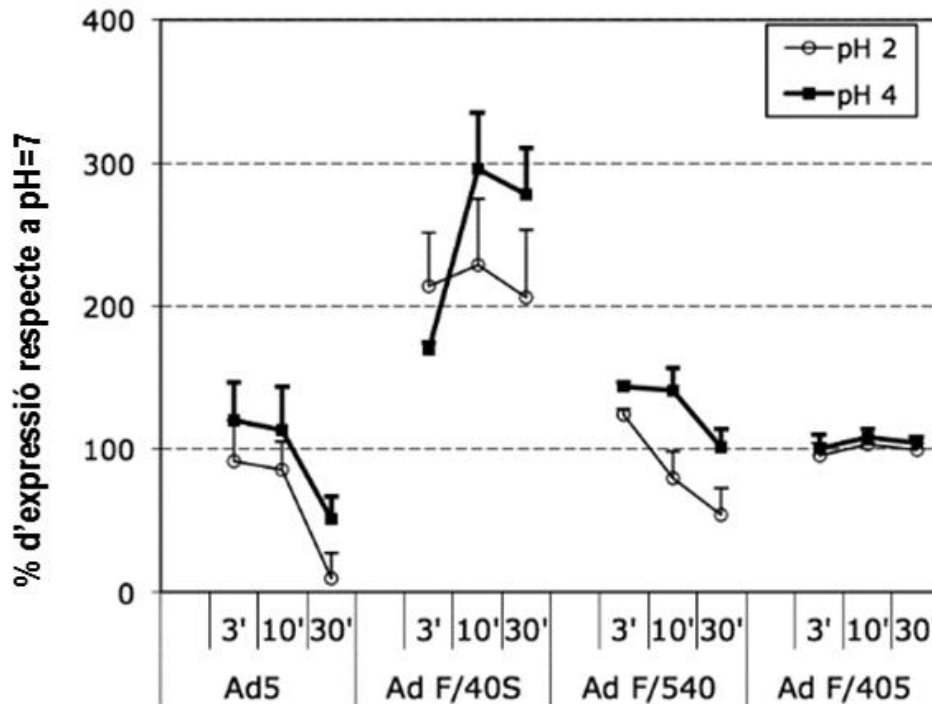


Fig. 31. Efecte de l'exposició a pH àcid en la viabilitat dels Ad quimèrics. Es van dur a terme 3 experiments d'exposició a àcids amb una n=3 per experiment.

Com es mostra en la Fig. 31, els vectors quimèrics Ad5/40 que porten els dominis *shaft* i *tail* de la proteïna *fiber* curta de l'Ad40 (F/40S i F/405) van resistir l'exposició tant a pH 2 i pH 4, mentre que les partícules que porten la proteïna *fiber* de l'Ad5 s'inactiven ràpidament. D'altra banda, només els vectors quimèrics que porten el domini *knob* (F/40S i F/540) van millorar la seva infectivitat després de temps d'exposició curts (3 min) a pH baix. És a dir, podem diferenciar dos dominis en el *fiber* 40S, el *shaft-tail* estaria involucrat en la protecció a l'exposició a pH àcids, possiblement a causa del seu elevat pI (9.10), mentre que el *knob* estaria involucrat en augmentar la infectivitat del virus quan passa per un medi de pH àcid (Fig. 32).

Aquest experiment permet doncs pensar amb el F/40S com un possible vector de teràpia gènica dirigida a l'intestí, degut a la seva resistència i fins i tot activació al ser exposat a un medi àcid.

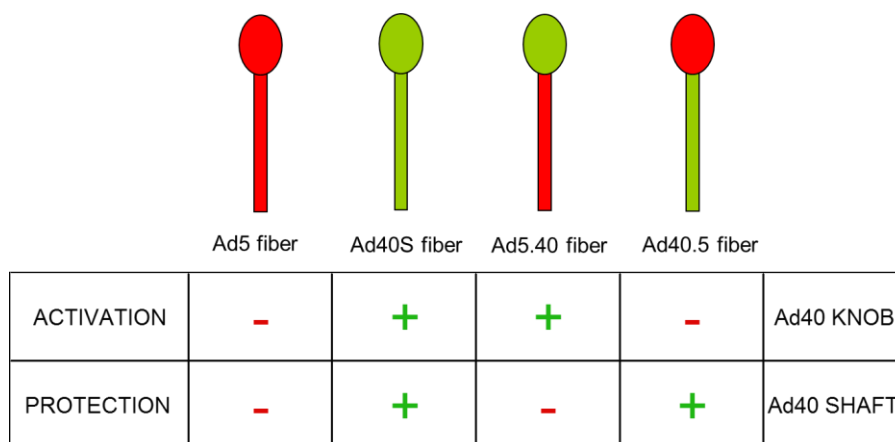


Fig. 32. Rol hipotètic de les proteïnes del *fiber* curt de l'Ad40 en la protecció o activació de de les càpsides virals quan s'exposen a pH àcid.

2.2. Resistència a proteases

La via oral és una de les vies àmpliament utilitzades per l'administració de fàrmacs en model animals. Per aquesta raó, es va estudiar si la presència del *fiber* curt de l'adenovirus 40 a la càpsida de l'adenovirus 5 era capaç no només de protegir el vector de l'efecte del pH àcid, sinó també de conferir resistència a l'acció de les proteases presents a l'estómac. Es van infectar plaques de 24 pous sembrades amb cèl·lules HEK293 amb una MOI = 1 de virus que prèviament havien estat exposats a fluid gàstric artificial (SGF), preparat segons les recomanacions de la United States Pharmacopeia (USP), i d'aquesta manera poder recrear les condicions presents a l'estómac. Es van extreure mostres durant 3 hores (cada 10 min a primera hora i després cada 30 minuts fins finalitzar l'experiment) i al cap de 24 hores es va analitzar l'expressió de β -galactosidasa per luminometria. En la Fig. 33 es pot observar que tant l'Ad5 com el F/40S són inactivats pel SGF USP ràpidament, ja que a mesura que augmenta el temps d'exposició, disminueix la capacitat infectiva dels virions, indicant que el *fiber* es capaç de retardar, però no eliminar la inactivació per part de les proteases de l'estómac.

2.3. Tropisme dels adenovirus quimèrics 5/40 en cultius primaris d'intestí i explants

Un cop analitzada la capacitat dels adenovirus quimèrics per traspasar la barrera de l'estómac, vam voler analitzar la seva capacitat d'infecció en cultius primaris i en explants d'intestí de ratolí.

Per als explants i cultius primaris, es van extreure els intestins de ratolins de 5-10 dies, des de l'inici a l'estómac fins el recte. Després d'obrir longitudinalment els intestins i rentar, es va procedir a la disgregació mecànica. Aquesta, però és insuficient per poder obtenir les cèl·lules d'intestí, i per aquesta raó es realitzà també una disgregació enzimàtica amb una solució de Col-lagenasa

XI i Dispasa I. El sobrenedant es centrifuga varies vegades i es resuspèn el precipitat en medi ECM (medi cel·lular epitelial), un medi que conté factor de creixement epidèrmic. Finalment les cèl·lules es van sembrar en plaques de 24 pous pretractades amb Matrigel, i es va estudiar la viabilitat al cap de 7 dies amb Tripán Blue (tinció de cèl·lules mortes) i Neutral Red (tinció de cèl·lules vives) (Fig. 34).

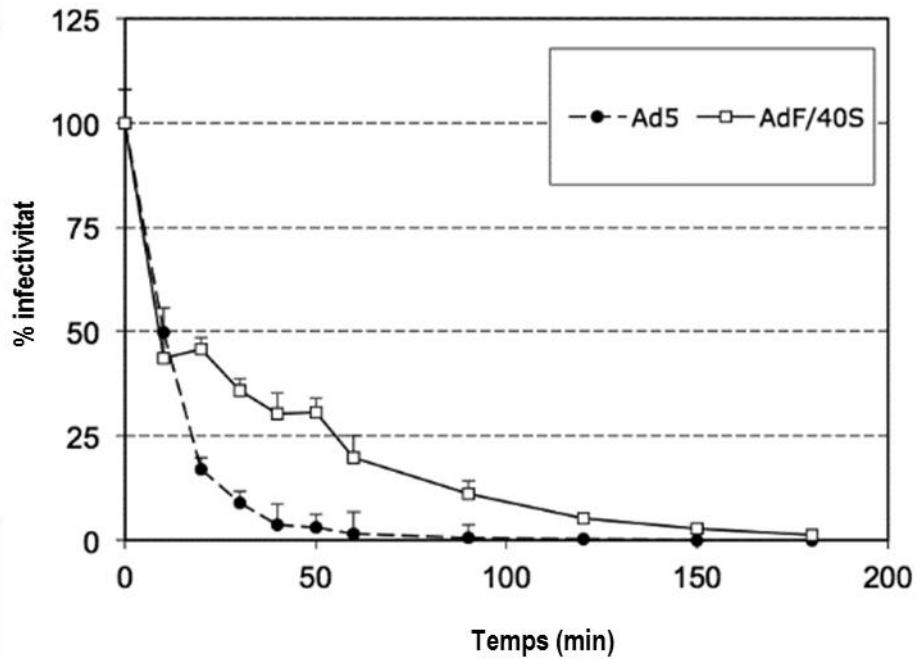


Fig. 33. Efecte de l'exposició a proteases en la viabilitat dels adenovirus quimèrics. Els resultats mostren la disminució de la infectivitat després de l'exposició a fluid gàstric artificial, on 100% és el nivell d'infecció a temps 0 min (n=3).

El protocol per als explants es molt similar. Els intestins es tallen en fragments de 1 mm, i mitjançant sedimentacions, es separen les cèl·lules i les petites làmines d'epiteli intestinal dels fragments més densos. La mostra es centrifuga diverses vegades, es descarta el sobrenedant (que conté cèl·lules epitelials, cèl·lules no epitelials i debris) i el precipitat, que consisteix predominantment en criptes intactes i petites làmines d'epiteli intestinal (organoids), a una densitat de 200-300 organoids/cm² i s'estudia la viabilitat al cap de 7 dies amb Tripán Blue (tinció de cèl·lules mortes) i Neutral Red (tinció de cèl·lules vives) (Fig. 35).

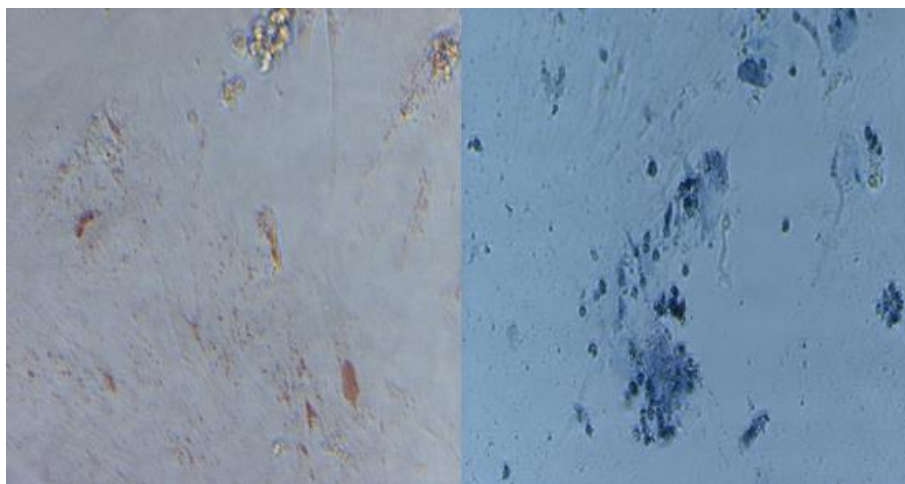


Fig. 34. Cultius primaris de ratolí. Tinció amb Neutral Red i Trypan Blue

Tot i que inicialment es va aconseguir mantenir la viabilitat del cultius primaris i els explants, la majoria dels cultius es contaminaven amb bacterïes durant els primers dies. Els cultius que es van aconseguir infectar amb F/40S GFP no van mostrar infecció en cap dels 2 experiments. Tot i això, donat que en la bibliografia s'havien trobat indicis de la capacitat infectiva dels vectors i que en els experiments *in vitro* de tropisme s'havien transfectat línies cel·lulars de tropisme intestinal, es va procedir a estudiar la infectivitat *in vivo* directament en ratolins.

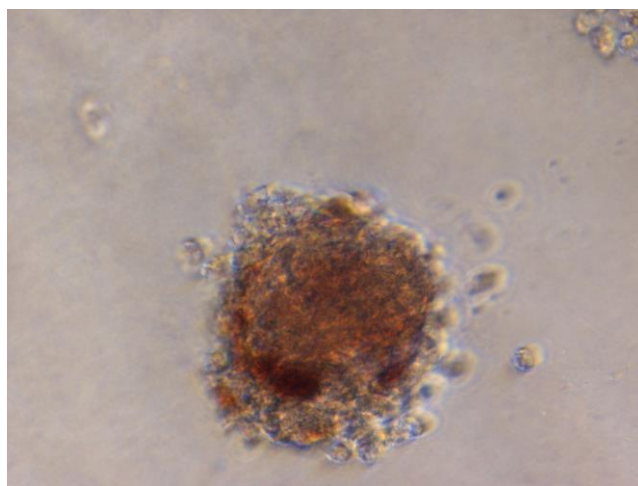


Fig. 35. Cultius primaris de ratolí. Tinció amb Neutral Red.

2.4. Biodistribució dels adenovirus quimèrics 5/40 en animals sans

La biodistribució dels adenovirus quimèrics 5/40 només s'havia estudiat mitjançant la administració intravenosa (Nakamura et al., 2003). Com la via natural d'infecció hipotètica de l'Ad40 es la gastrointestinal, es va decidir estudiar, en ratolins CD1 femella, la biodistribució i bioseguretat

d'aquests vectors per tres vies diferents: oral, rectal i intravenosa. Els animals es van eutanasiar al cap de 3 dies de l'administració i es van extreure 15 òrgans (Taula 13) per a la quantificació de l'expressió de β -gal per luminometria i l'anàlisi histològic i immunohistoquímic de la transfecció adenoviral

Taula 13. Òrgans analitzats en l'estudi de Biodistribució dels Adenovirus quimèrics

ÒRGANS		
GRUP A	Òrgans permissius a Ad5	Fetge
		Pulmó
		Melsa
		Múscul
GRUP B	Òrgans del tracte gastrointestinal (TGI)	Esòfag
		Estómac
		Intestí Proximal
		Intestí Distal
		Colon
GRUP C	Altres òrgans	Tràquea
		Úter
		Ovari
		Pàncrees
		Cor
		Ronyó

L'anàlisi de l'activitat β -galactosidasa en els extractes dels òrgans per luminometria va mostrar que l'Ad5 té un elevat tropisme pels òrgans del Grup A, sobretot quan s'administra per via intravenosa (tal i com es descriu a la bibliografia (Einfeld et al., 2001; Wirtz et al., 1999)). Els adenovirus quimèrics F40SL, F/40S i F/405 també van mostrar expressió en fetge, si bé en menor grau que

el Ad5 control (fins a 10 vegades menys). Per les vies oral i rectal no es va apreciar expressió en cap òrgan del grup A.

En quant als òrgans del TGI (òrgans diana per malalties que afecten el tracte gastrointestinal), destaquem que la major expressió es troba en colon amb els adenovirus F/405 i F/540, i especialment amb el vector F/40S, quan s'administren per via oral o rectal. En la resta de òrgans del TGI no es detecta expressió del gen marcador, ni tampoc per la via intravenosa.

En els òrgans del grup C no es detecta expressió per cap via.

La Fig. 36 mostra la biodistribució de cada vector utilitzat en aquest estudi, per via intravenosa, oral i rectal.

Es important destacar que en cap moment ni en cap animal es van observar símptomes o signes de toxicitat (alteracions orgàniques macro o microscòpiques, increment dels nivells sanguinis d'aminotransferases), excepte en els animals als que els va administrar l'Ad5 per via intravenosa, en els quals es va apreciar esplenomegàlia i un lleuger augment de les transaminases hepàtiques, sense significació patològica (entre 15-25 U/L).

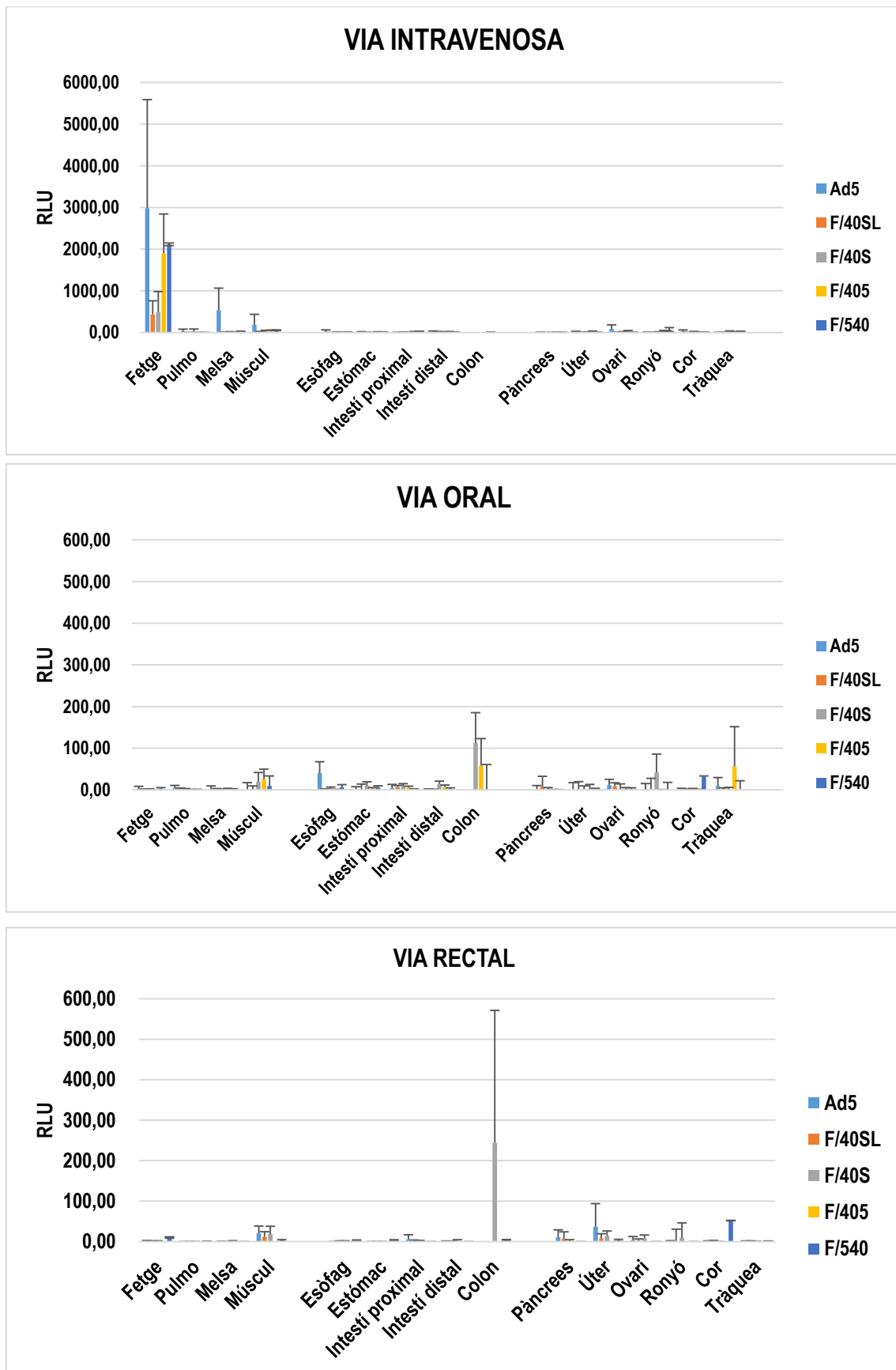


Fig. 36. Biodistribució dels adenovirus quimèrics. La biodistribució es va estudiar en ratolins sans per 3 vies d'administració: via intravenosa, via oral i via rectal (n=4-5).

Per descartar que l'elevada activitat de β -galactosidasa observada en el colon era causada per una transfecció més eficient dels vectors i no per una major quantitat de mostra, es va fer una extracció de proteïnes de cada mostra i es va analitzar les RLU/mg de proteïna per tal d'uniformitzar els valors (Fig. 37). Aquest experiment ens va permetre confirmar que l'F/40S i l'F/540 eren capaços de transfectar eficientment cèl·lules del colon tant per la via oral com la rectal. L'F/405 també era capaç de transfectar cèl·lules de colon per la via oral. L'activitat de β -galactosidasa observada procedia de la transferència del gen, ja que no es va observar activitat quan es van analitzar les mostres de colon procedents dels animals administrats per la via intravenosa.

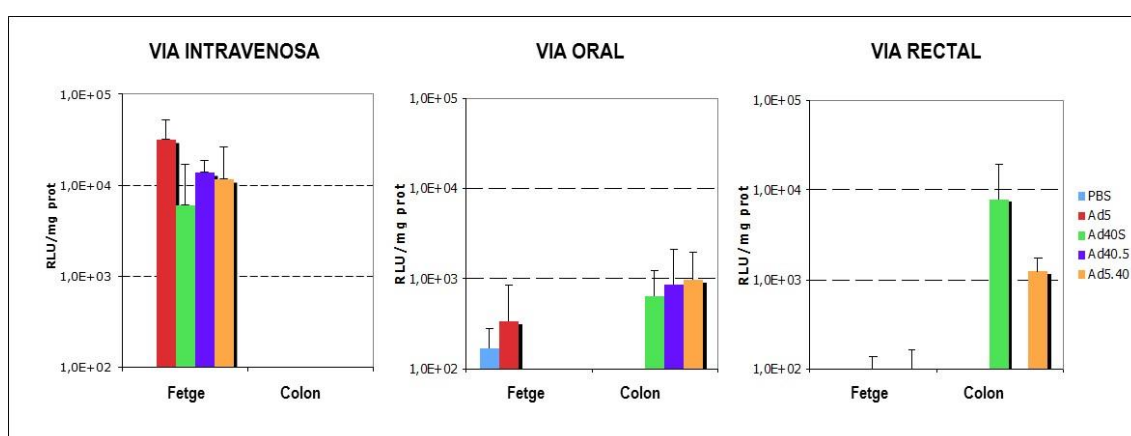


Fig. 37. Biodistribució normalitzada dels adenovirus quimèrics. La biodistribució es va estudiar en ratolins sans per 3 vies d'administració: via intravenosa, via oral i via rectal (n=4-5).

Paral·lelament es va realitzar un estudi histopatològic i immunohistoquímic de β -galactosidasa (en col·laboració amb la Dr Ester Fernandez i Carolina Romero, Departament de Fisiologia Animal de la UAB), en talls de totes les mostres analitzades per detectar, a nivell microscòpic, qualsevol efecte de citotoxicitat i identificar de manera específica el tipus cel·lular transfectat pels vectors, sobretot en el tracte digestiu, i més concretament en el colon (Fig. 38). En aquestes imatges es pot apreciar un marcatge positiu perinuclear a la β -gal tant en fetge com en intestí en els animals que van rebre F/40S i Ad5 (control positiu) en comparació amb els controls PBS, indicant la transfecció d'ambdós tipus cel·lulars (enteròcits i hepatòcits).

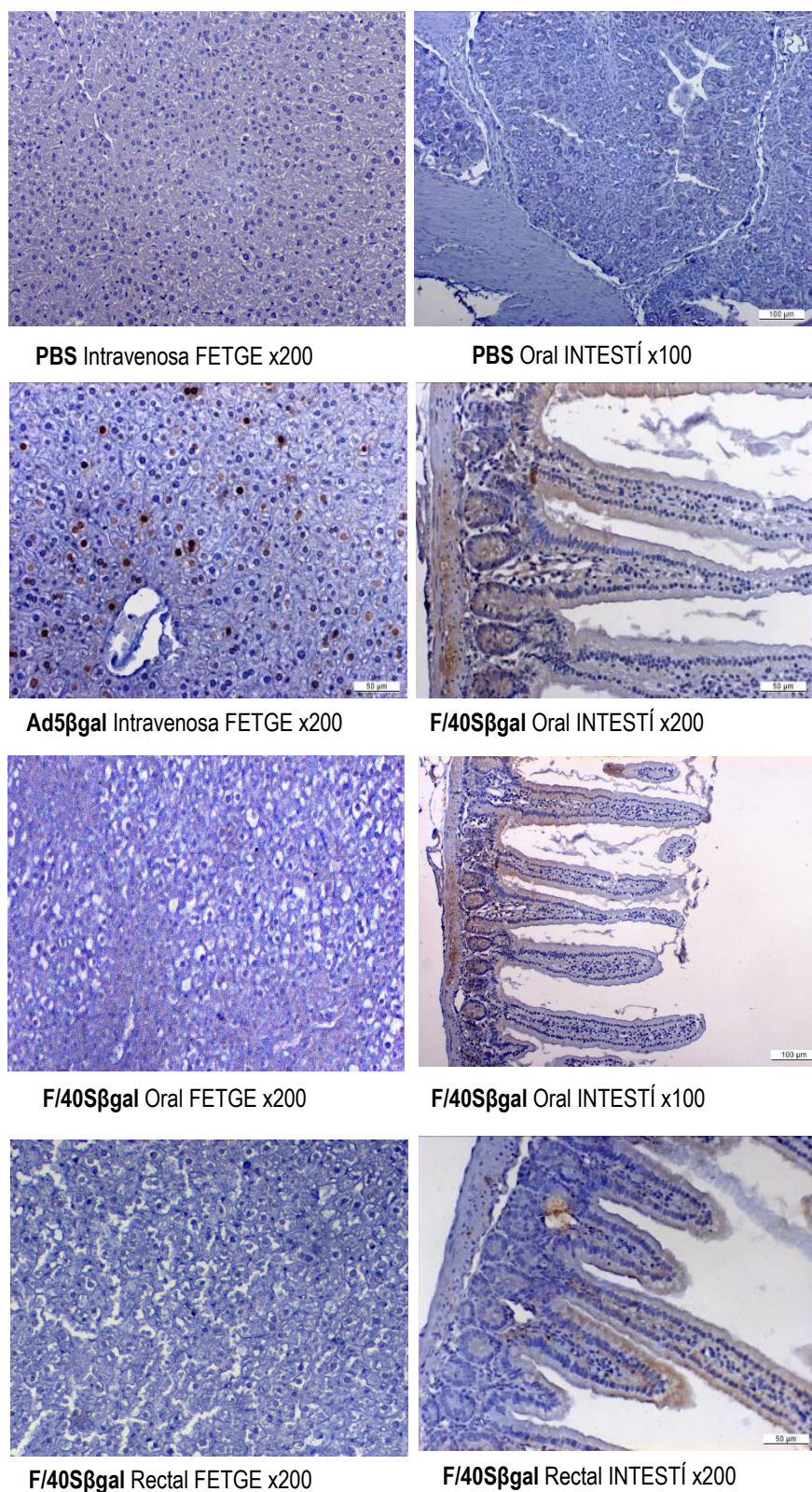


Fig. 38. Anàlisi immunohistoquímica de β -galactosidasa en seccions de fetge i intestí de ratolí CD1.

Una vegada confirmat que els vectors quimèrics eren capaços de transfectar eficientment el colon, ens vam proposar identificar els tipus cel·lulars, entre els presents a l'intestí, pels quals

presentaven més afinitat els adenovirus quimèrics. Per identificar els tipus de cèl·lules infectades per l'F/40S a còlon, es va administrar per via rectal una dosi d' 1×10^{10} partícules virals de Ad5 i l'F/40S amb GFP com a gen marcador. Tres dies més tard, les mostres de còlon, estómac, i l'intestí prim es van analitzar per immunohistoquímica. Com es veu a la Fig. 39, s'observa una forta expressió de GFP en el còlon, especialment en animals transduïts amb F/40S-GFP, i en menor grau en els animals transduïts amb Ad5-GFP.

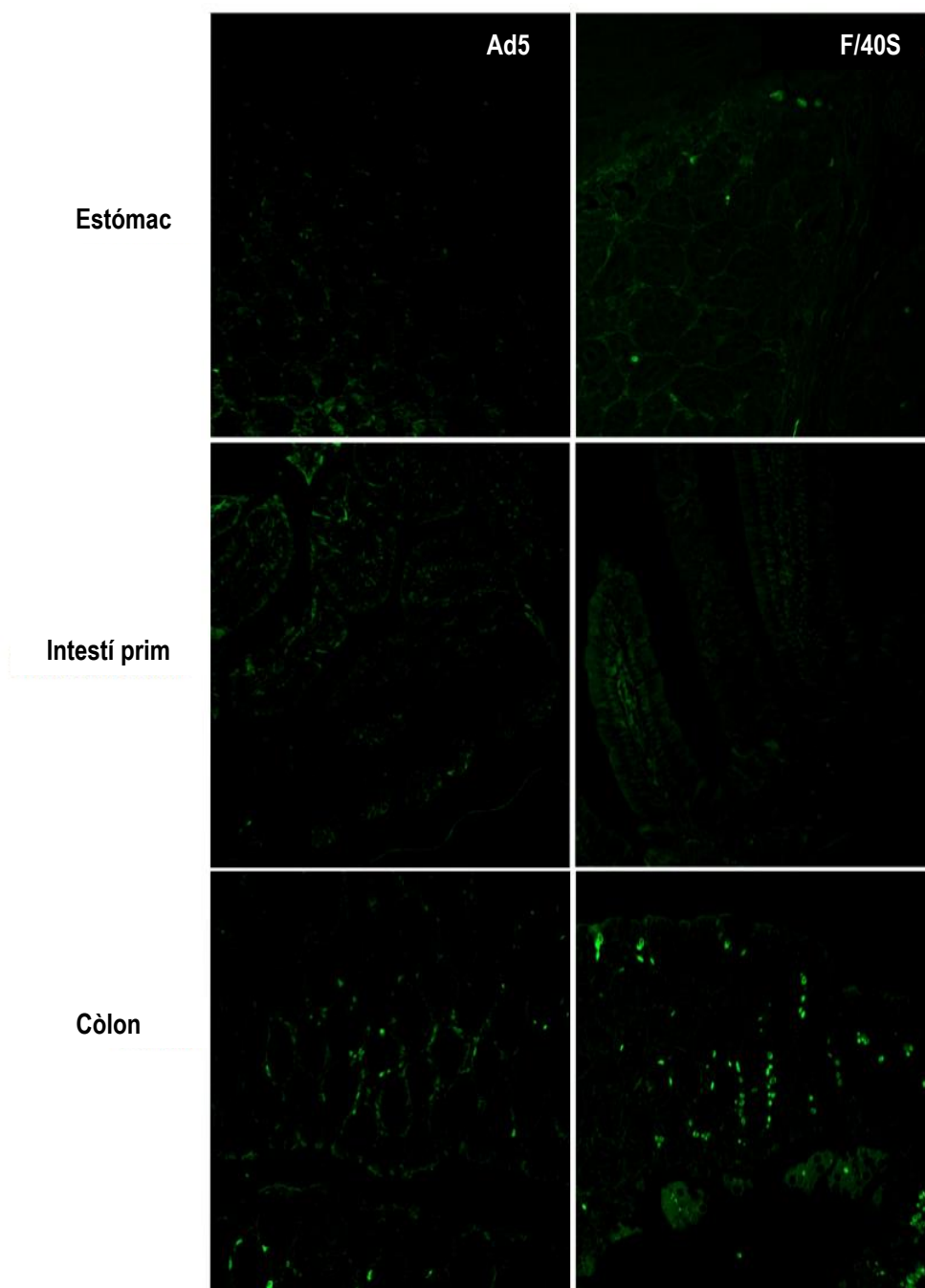


Fig. 39. Anàlisi immunohistoquímic de GFP en seccions d'estómac i intestí de ratolí CD1. Les imatges mostren una tinció positiva en el còlon per via rectal.

Amb l'administració rectal es pot apreciar un marcatge evident en les cèl·lules epitelials en vellositats i criptes intestinals, i presumiblement, en cèl·lules enteroendocrines.

A causa de l'interès que te poder transfectar tipus cel·lulars amb una vida mitjana més llarga que les cèl·lules epitelials intestinals, es van provar diferents anticossos per poder determinar més concretament el tipus cel·lular transfectat.

Així l'anticòs contra la somatostatina, com a marcador de cèl·lules enteroendocrines, va permetre observar que la majoria de la les cèl·lules que expressaven GFP eren cèl·lules endocrines. Utilitzant l'anticòs contra CD68, com marcador de macròfags, també es va observar que traduïen eficientment els macròfags locals de la mucosa intestinal per l'F/40S (Fig. 40).

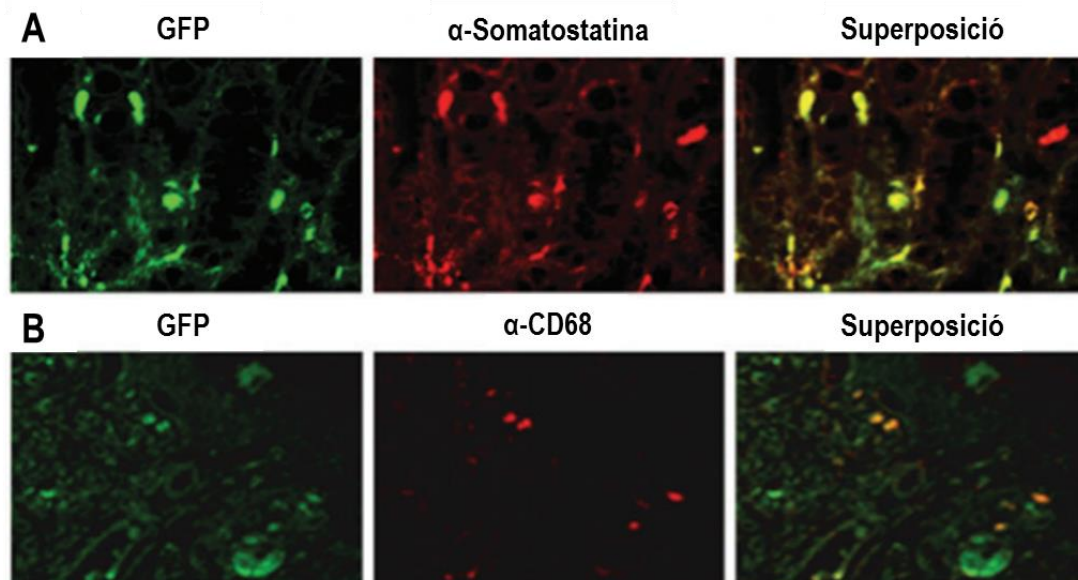


Fig. 40. Anàlisi immunohistoquímic de seccions de colon de ratolí CD1 administrats per via rectal. Les imatges mostren una tinció positiva en el colon de cèl·lules enteroendocrines (A) i macròfags residents (B).

2.5. Biodistribució dels adenovirus quimèrics 5/40 en el model murí DSS

Un cop avaluada la capacitat dels adenovirus quimèrics d'infectar l'intestí de ratolins sans, i validar el vector F/40S com a vector per transfectar l'intestí, es va procedir a avaluar si mantenia la seva infectivitat en un model murí de IBD. El model escollit va ser la colitis induïda per DSS, perquè és un model altament reproduïble i es considera adequat per provar noves teràpies i d'alt valor predictiu, ja que els estudis farmacològics fets en aquests ratolins mostren una gran concordança amb els resultats dels assajos clínics posteriors.

Per induir la colitis, els ratolins C57BL/6 van rebre 4% (w/v) de DSS en l'aigua per beure durant 5 dies consecutius. Amb aquest règim de DSS apareix una colitis entre lleu i severa amb els símptomes de pèrdua de pes, mucus rectal, diarrea, sang a les femtes, etc. Els ratolins amb colitis DSS es van infectar per via rectal amb els diferents vectors, i al cap de 3 dies es van recollir els següents òrgans: fetge, melsa ovari, intestí prim, limfonodes i colon. Sorprenentment, quan es va analitzar l'activitat específica (RLU/ μ g de proteïna) en tots els òrgans, només es va trobar expressió en ovari i colon.

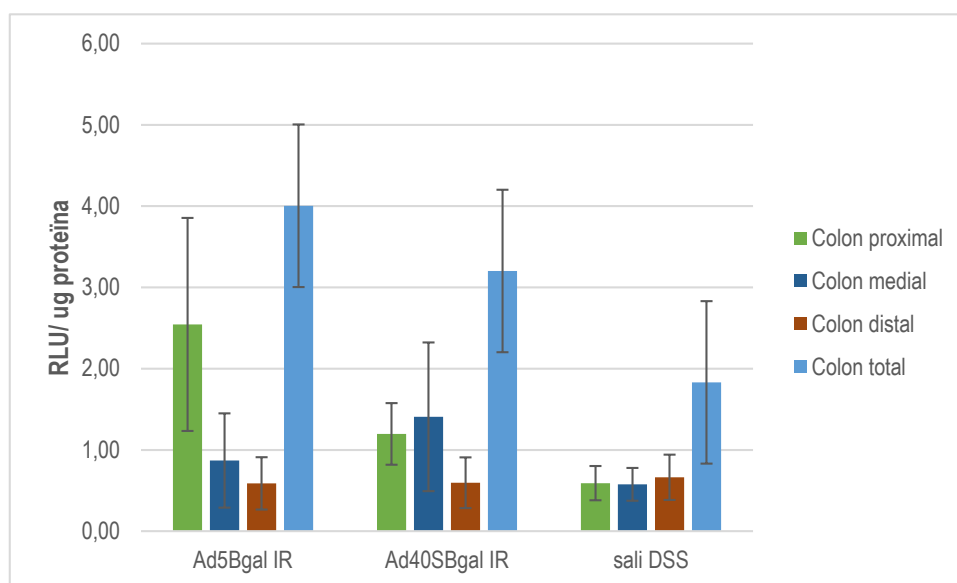


Fig. 41. Biodistribució de l'adenovirus quimèric F/40S en el model murí DSS (n=5)

Tal com es mostra en la Fig. 41, els valors obtinguts són tots propers als nivells de background i no s'observen diferències significatives entre Ad5 i Ad40S. Prèviament s'havia descrit que durant la inflamació de l'intestí es podia produir la translocació de les bacteries presents a la llum intestinal cap a l'epiteli. Per descartar que l'activitat β -galactosidasa observada fins i tot en animals control era causada per translocació bacteriana que pot aparèixer durant la inflamació de l'intestí, es va comparar l'activitat β -galactosidasa de cada mostra (homogenats de fetge i dels òrgans del tracte gastrointestinal d'animals sans i d'animals DSS) per luminometria amb el seu contingut bacterià. En els homogenats d'animals sans, l'activitat β -gal es baixa i no relacionada amb la presència de les bacteries. Contràriament, en els homogenats de ratolins amb colitis, l'activitat β -gal es elevada, podent correlacionar amb la presència de bacteries. La sonicació des homogenats redueix la presència de bacteries, però l'activitat β -galactosidasa residual continua sent alta en les mostres procedents del model de colitis, comparada amb els animals sans. Com a conseqüència, no podem analitzar la biodistribució dels adenovirus quimèrics amb β -gal com a gen marcador en animals

inflamats. Per aquesta raó proposem utilitzar GFP o luciferasa com a marcadors per a experiments futurs.

3. GENERACIÓ ADENOVIRUS QUIMÈRICS 5/40 AMB GENS MARCADORS PER A TERÀPIA GÈNICA DIRIGIDA A L'INTESTI

3.1. *Generació de nous adenovirus amb fiber quimèric.*

Durant la caracterització dels vectors quimèrics, es va seqüenciar el plàsmid original cedit per Hamada (pWEAxKM40S) i es va observar que presentava algunes mutacions respecte la seqüència original del *fiber* 40S (Fig. 42), extreta del NCBI GenBank (M28822) (de Jong et al., 1983).

```

1 atgaaaagaa ccagaattga agacgacttc aaccccgctc acccctatga cacctcctca
61 actcccagca tCccttatgt agctccgccc ttTgtttctt cTgacggggt acaggaaaac
121 cccccgggag ttttagcact taagtacact gaccccatta ctaccaatgc taacatgag
181 cttactttaa aacttggcag caacataact ttacaaaatg ggttactttc ggccaccggt
241 cccactgttt ctctcccct tacaacagc aacaactcct tgggtttagc cacatccgct
301 cctatagctg tgtcagctaa ctctcttaca ttggccaccg cgcaccact gacagtaagc
361 aacaaccagc ttagtattaa cacGggcaga ggcttagttG taactaaca tgccgtagca
421 gttaatccta cgggagcgtt aAgctttaac aatacaggag ctttacaatt aaacgctgcy
481 ggaggaatga gagtggacgg cgccaactta attcttcatg tagcataccc ctttgaagca
541 atcaaccaac taacactgcy attagaaaac gggttagaag taaccaacgA aggaaaCctT
601 aacgttaagt tgggatcagg cctccaattt gacaataacg gacgcattac cattagtaat
661 cgcactccaga ctccaagtgt aacatccctc actaccattt ggtctatctc gcctacgct
721 aactgctcca tctatgaaac ccaagatgca aatctgtttc tttgtctaac taaaaacgga
781 gctcacgtgt taggtactat aacaattaaa ggtGttaaag gagcactgcy ggaaatgac
841 gataacgctt tatGtgtaaa acttccctt gacaatcagg gaaatttact caaTtgtgcc
901 ttggaatcat ccacctggcy ttaccaggaa accaacgcag tggcctctaa tgccttaaca
961 tttatgccc acagtacagt gtatccccga aacaaaaccg cggaccagcy caacatgctc
1021 atccaaatct cgcctaacat caccttcagt gtcgtctaca acgagataaa cagtgggtat
1081 gcttttacgt ttaaattggtc agccgaaccg ggaaaacctt ttcaccacc caccgctgta
1141 ttttgctaca taactgaaca ataa

```

Fig. 42. Seqüència del gen *fiber* curt de l'Ad40. En groc les mutacions que es van observar en la seqüenciació del plàsmid pWEAxKM40S

Aquestes mutacions podien (o no) afectar la viabilitat del virus, per tant vam decidir generar un nou *fiber* 40S per síntesis química. A més, degut a que la nostra meta final era crear vectors que transportin gens terapèutics, vàrem decidir crear de novo un sistema de producció a nivell genòmic dels adenovirus quimeres 5/40, mitjançant la generació d'un plàsmid que contingüés tot el genoma de l'Ad5, però amb el *fiber* curt de l'Ad40. A causa de que la clonació per lligació amb plàsmids de més de 10 Kb és ineficient, vam generar un plàsmid més petit en el qual vam introduir dues dianes per mutagènesis dirigida. Aquestes dianes es troben just als extrems del gen del *fiber*, i

d'aquesta manera es pot escindir la proteïna *fiber* de l'Ad5 i introduir una proteïna *fiber* d'un altre serotip sense alterar la resta del genoma de l'adenovirus.

Per a la generació d'adenovirus amb el *fiber* quimèric ens vam basar en el genoma adenoviral del serotip 5 (Ad5). El genoma adenoviral del Ad5 està inserit en el plàsmid pKP 1.3 (cedit per Dr. Eric Kremer, Genethon II, França) que conté tota la regió viral codificant excepte la regió E1 i part de la regió E3. A més conté el promotor CMV, un lloc de clonatge múltiple (MCS), que permet la incorporació de gens, i el polyA del virus SV40. El plàsmid pKP1.3 té 36 Kb, i és difícil clonar en un plàsmid tan gran. Per això vam decidir construir un plàsmid llançadora, amb una mida de 9 Kb, on es realitzarien els canvis per poder modificar els gens dels *fibers*.

a) Preparació del plàsmid llançadora p8900F5

El primer pas va ser modificar el plàsmid pKP 1.3, mantenint la zona del *fiber*, l'ampicil·lina i l'origen de replicació i eliminar tota la resta. Amb aquest fi es va digerir el plàsmid pKP 1.3 per les dianes SpeI, originant dos fragments de 27 Kb i 9 Kb. El fragment de 9 Kb es va relligar obtenint el plàsmid p8900F5 (Fig. 43).

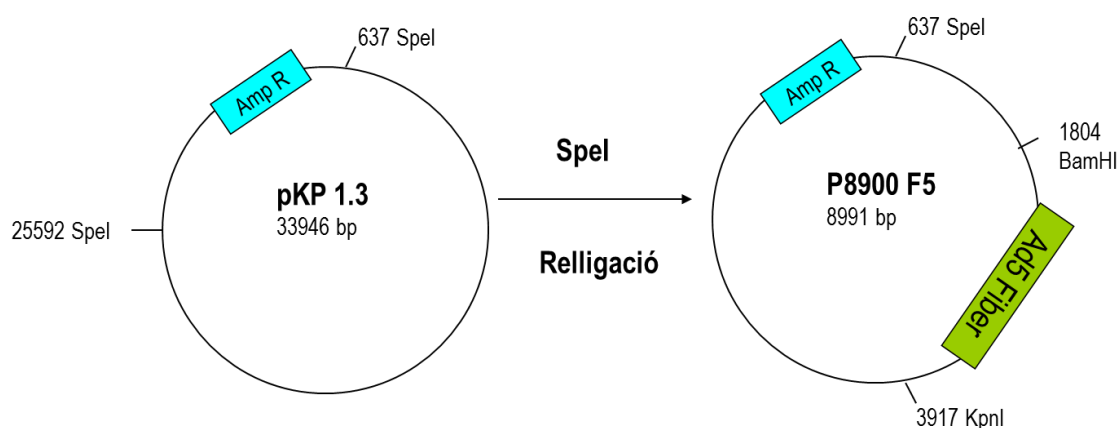


Fig. 43. Preparació del plàsmid llançadora pKP 1.3 intermedi

b) Introducció de les bandes flanquejant al *fiber*

Analitzant la seqüència de l'Ad5 es van dissenyar oligonucleòtids per introduir una diana Xba-I a l'extrem 5' del *fiber* i una diana Mlu-I a l'extrem 3'dins del plàsmid p8900F5 (Fig. 44). D'aquesta manera es pot escindir el gen de la proteïna *fiber* de l'Ad5 i introduir una proteïna *fiber* d'un altre serotip.

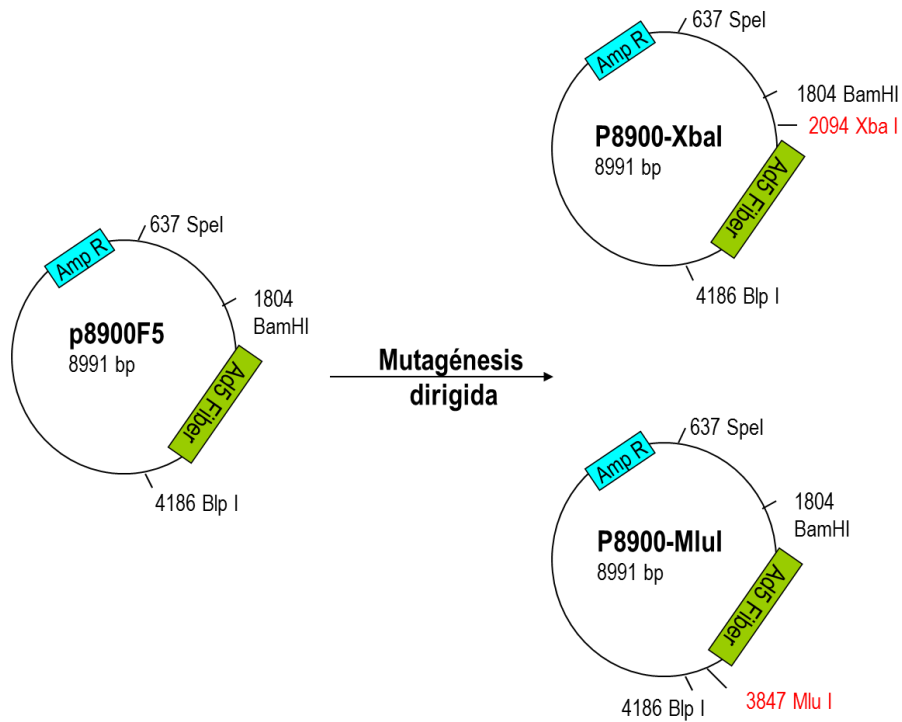


Fig. 44. Introducció de les dianes XbaI i MluI en el plàsmid p8900F5

Posteriorment, per confirmar el procés de mutagènesis dirigida es van realitzar varies digestions de comprovació i es van seqüenciar. D'aquesta manera es va generar el p8900F5_XM.

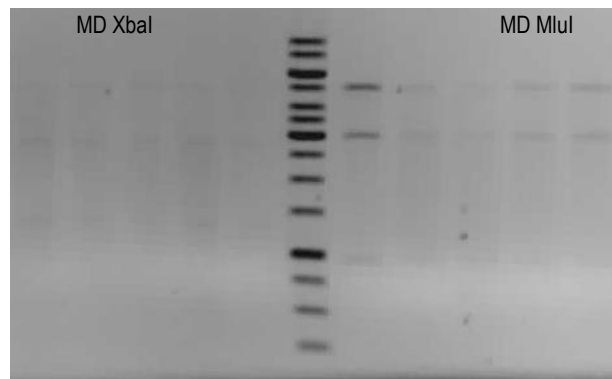


Fig. 45. Comprovació mutagènesis dirigida. Els fragments esperats per MD XbaI digerits per EcoRV i XbaI son 1,2 kb +2,7 kb+5kb. Els fragments esperats per MD MluI digerits per EcoRV i MluI son 0.9 kb +3 kb+5kb.

Una vegada es va aconseguir una de les dues dianes introduïdes (Fig. 45) es va realitzar una segona mutagènesis sobre aquest plàsmids, introduint la segona diana, seguint el mateix protocol. La mutagènesis dirigida, tot i realitzar-se amb polimerases amb capacitat correctora, pot introduir errors en altres zones del plàsmid, ja que el genoma adenoviral està molt compactat i qualsevol mutació podria impedir el seu funcionament posterior. Per això es van seqüenciar les regions

flanquejant a les dianes introduïdes i es va seleccionar un plàsmid p8900F5_XM que no presentava cap mutació en aquesta zona. Posteriorment es digerí amb BamH-I i Kpn-I per clonar-lo en el plàsmid p8900F5 que no hagués passat pel procés de mutagènesis dirigida (via les dianes BamH I Acc65I, compatible amb KpnI) (Fig 33).

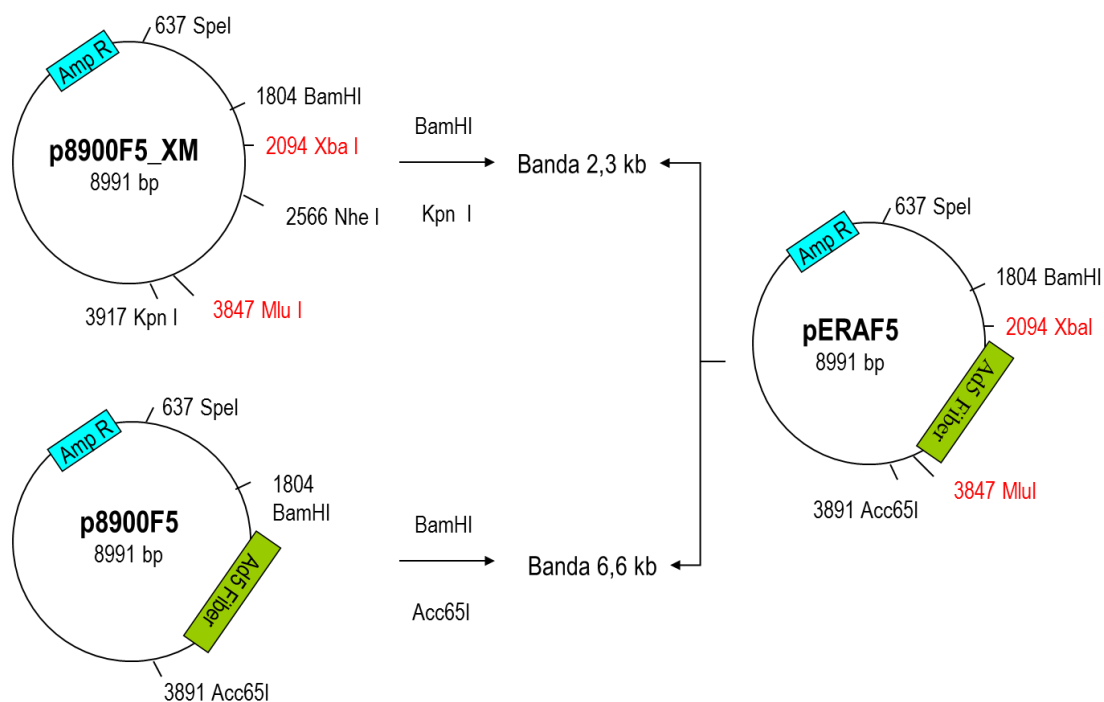


Fig. 46. Construcció del plàsmid pERAF5, amb les dianes Xba I i Mlu I, lliure de mutacions

Aquest nou plàsmid es va digerir amb Xba I i Mlu I per eliminar el *fiber 5* i substituir-lo per *fiber* curt de l'Ad40. El fragment amb el *fiber* curt de l'Ad40 s'havia obtingut prèviament per síntesi gènica, incorporant les dianes Xba I i Mlu I, i s'havia clonat en plàsmid pGEMT-easy, obtenint el pERAF40S. Utilitzant el procés invers, i mitjançant la digestió amb Spe I, es reconstrueix el pKP1.3, però ara ja amb el *fiber* curt de l'Ad40. El pKP 1.3 F40S es linealitzava mitjançant la digestió amb l'enzim Swa I i es recombinava amb el plàsmid pTG6600, portador del cassette de replicació del transgen. D'aquesta manera, transfectant en cèl·lules HEK293, es poden amplificar vectors quimèrics F/40S amb el gen terapèutic d'interès.

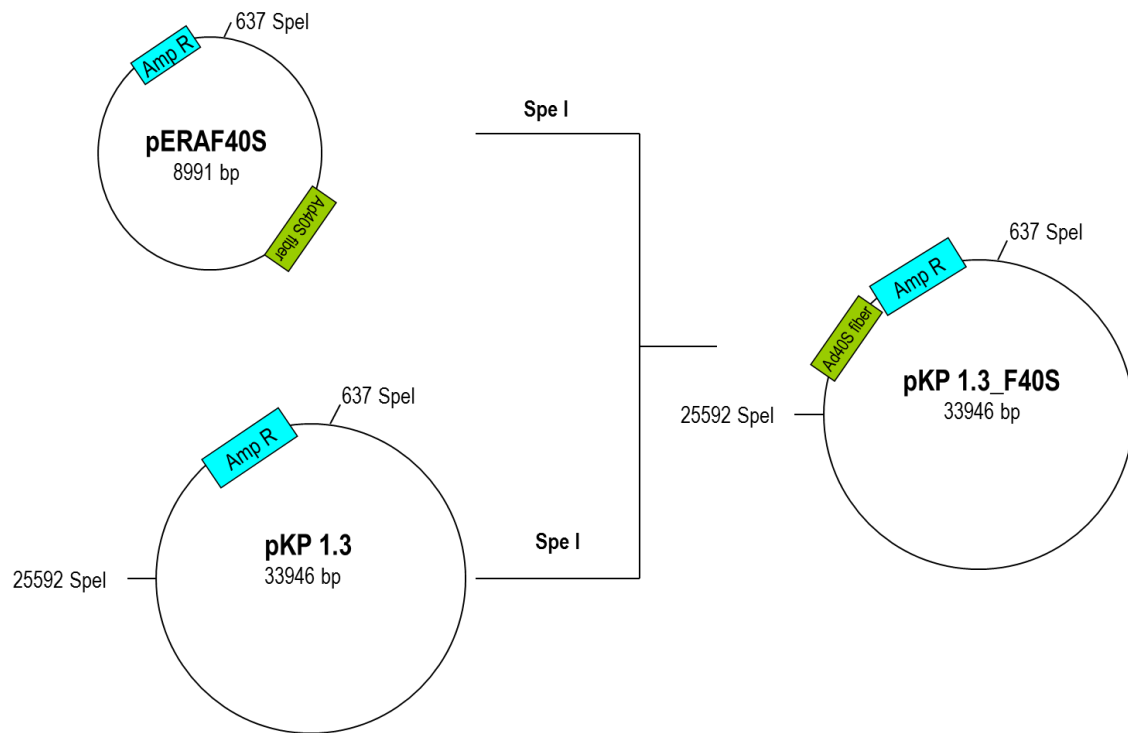


Fig. 47. Construcció del plàsmid pKP 1.3 F40S

DISCUSSION

La Malaltia Inflamatòria Intestinal (IBD), la qual engloba la malaltia de Crohn (CD) i la colitis ulcerosa (UC), es caracteritza per una inflamació crònica del tub digestiu. Actualment existeixen diferents tipus de teràpies per a la IBD que permeten millorar la qualitat de vida dels pacients, però avui dia encara no es disposa un tractament curatiu. En els últims anys han aparegut les anomenades teràpies biològiques, un terme que engloba una sèrie de tractaments basats en diferents conceptes, des de l'administració de probiòtics a l'ús de proteïnes recombinats, àcids nucleics o anticossos monoclonals. Tot i que totes representen avanços significatius, cap d'aquestes teràpies aconsegueix eliminar totalment la malaltia. Per aquesta raó, es necessari buscar noves estratègies terapèutiques, de més eficàcia i amb menys efectes secundaris.

La teràpia gènica és una de les noves estratègies terapèutiques en biomedicina amb més potencial per tractar malalties d'origen genètic. L'èxit de la teràpia gènica depèn del desenvolupament de vectors que garanteixin l'expressió del transgen sense efectes secundaris. Actualment no existeix un vector ideal que permeti la seva aplicació en qualsevol malaltia, i per aquesta raó, cada vector està específicament dissenyat per tractar una malaltia determinada.

En el cas de la IBD, el més idoni sembla utilitzar un vector que mostri un tropisme natural dirigit a l'intestí. En els humans, destaquen els adenovirus del subgrup F, format per l'Ad40 i l'Ad41. Aquests dos virus entèrics es van descobrir en 1981 i estan associats a gastroenteritis infantils. Malauradament, la característica principal que els defineix és la seva dificultat per produir-se *in vitro*, inclús en cultius cel·lulars que s'utilitzen per propagar altres adenovirus humans (de Jong et al., 1983), i de fet, se'ls coneix com a "fastidious adenovirus" (en la literatura hi ha varis estudis en relació amb la capacitat d'aquests virus per replicar-se en diferents línies cel·lulars, com ara cèl·lules HEK293 (Pieniazek et al., 1990a; Takiff et al., 1981) i cèl·lules KB (Mautner et al., 1989; Witt and Bousquet, 1988)). Sembla que la falta d'integritat genètica en l'E1 de l'Ad40 podria explicar la dificultat del seu cultiu *in vitro* (Hashimoto et al., 1991; Mautner et al., 1989; Yamasaki et al., 2010). Afortunadament, el creixement d'Ad40 *in vitro* es pot complementar amb la proteïna E1b55K d'altres adenovirus, incloent l'Ad5 (Hashimoto et al., 1991; Mautner et al., 1989; Tiemessen and Kidd, 1988) i que per aquesta raó és capaç de produir-se en HEK293, tot i que de manera ineficient.

Posteriorment al inici d'aquesta tesis, altres grups van generar vectors basats en els genomes de l'Ad40 i de l'Ad41. En el cas de l'Ad40, el vector es va generar clonant directament en un plàsmid el genoma complet de l'Ad40. Aquest vector però, es produïa amb un cicle molt llarg (72 hores) i una eficiència molt baixa, i a més mostrava inestabilitat en E1 (Yamasaki et al., 2010). No obstant,

aquest vector es va utilitzar posteriorment en estudis de vacunació, i tot i ser capaç de transfectar la mucosa intestinal via administració intraduodenal, la eficiència per via oral era molt baixa (Yamasaki et al., 2013). En el cas de l'Ad41, el vector es va construir per recombinació homòloga, amb una capacitat de 3.6 kb. Aquest vector tot i tenir un cicle de producció molt llarg (6 dies per etapa d'amplificació), va mostrar una gran resistència a l'exposició a pH àcid i a fluid gàstric (Lu et al., 2009), però tot i utilitzar-se en estudis de vacunació (Guo et al., 2015) encara no s'ha comprovat la seva capacitat d'infectar l'intestí. Així doncs, actualment encara no es coneix un vector eficient per a teràpia gènica basats en els adenovirus Ad40 o Ad41.

Al no existir un vector eficient per a teràpia gènica basat en l'Ad40 o l'Ad41, es va decidir treballar amb un vector pseudotipat, ja que el tropisme del virus ve determinat bàsicament per la proteïna *fiber*. En el nostre cas vam utilitzar un vector quimera entre l'Ad5 i l'Ad40, amb la càpsida de l'Ad5, però amb la proteïna *fiber* curta de l'Ad40. Les càpsides d'aquests vectors quimèrics Ad5/F40S són estables i mantenen la seva infectivitat, ja que quan hem forçat la seva entrada a la cèl·lula a través del pont hexon-FX i no a través de la proteïna *fiber*, no s'observa cap disminució en la infectivitat. Si les càpsides haguessin estat inestables, la infectivitat dels vectors quimèrics seria menor independentment de la proteïna viral utilitzada per introduir-se en la cèl·lula. Aquests resultats concorden amb els estudis que s'havien fet prèviament amb el vector quimèric Ad3/F5, on el *fiber* de l'Ad5 s'incorpora de manera eficient en el *penton base* de la càpsida de Ad3 (Von Seggern et al., 1998). De fet, l'estabilitat de la càpsida també es manté en quimeres del mateix gènere, quan s'utilitzen *fibers* d'origen caní, oví o boví (Glasgow et al., 2004; Nakayama et al., 2006; Wu and Tikoo, 2004). Paral·lelament també es van publicar diversos estudis incorporant el *fiber* curt de l'Ad41 en la càpsida de l'Ad5. En el primer treball, els autors van ser incapaços d'aïllar un vector que expressés només el *fiber* curt de l'Ad41 (Schoggins et al., 2003b). Més recentment, es va construir un vector amb el *fiber* curt de l'Ad41 que sí que era capaç de reduir el tropisme natural de l'Ad5 per via intravenosa (Nicol, 2004). Finalment, es va crear un adenovirus quimera Ad5/F41S i es va produir amb títols similars a l'Ad5, però mostrava una eficiència de transducció molt menor que l'Ad5 quan s'aplicava a cèl·lules epitelials intestinals, tant en biòpsies d'intestí de pacients sans i amb UC com en cèl·lules Caco-2 diferenciades (Kesisoglou et al., 2005).

Així doncs, l'ús de vectors quimèrics 5/40 es perfilava com una alternativa prometedora com vectors de teràpia gènica dirigida a l'intestí. Inicialment, com que el genoma dels vectors no es van construir al nostre laboratori, els vam caracteritzar i vam comprovar la presència del *fiber* via western blot. No obstant, quan es va seqüenciar el *fiber*, es van observar mutacions en alguns nucleòtids que si bé no semblaven afectar les característiques del vector, sí que era millor corregir,

i per això es va construir de nou el vector quimèric Ad5/F40S, incorporant un *fiber* curt de l'Ad40 produït mitjançant síntesi gènica dins del genoma de l'Ad5, l'utilitzat en el nostre laboratori per construir vectors adenovirals.

La primera dificultat que vam trobar va ser amplificar aquests vectors, ja que la seva producció *in vitro* era molt pobre comparada amb la de l'Ad5. El virus salvatge té un cicle viral diferent, que afecta a la producció i a les característiques d'aquests virus, i tot i que la major part de les proteïnes del vector quimèric pertanyien a l'Ad5, es va observar un comportament similar al del virus Ad40 salvatge en aquests vectors pseudotipats. No obstant, amb el nou sistema de producció vam aconseguir produir els adenovirus quimèrics amb relativa eficiència, amb unes quantitats similars a l'Ad5 de referència, després de diferents cicles d'amplificació. El més essencial va ser descobrir que els adenovirus quimèrics tenien un cicle viral més llarg, com també es va observar posteriorment en altres vectors derivats d'adenovirus del subgrup F (Hesse et al., 2007; Lu et al., 2009; Yamasaki et al., 2010). Aquest fet no és molt important a petita escala, però sí que afecta econòmicament quan es treballa a escala industrial, ja que encareix molt els costos. El nostre objectiu final era trobar un vector idoni per utilitzar en clínica, i per tant, augmentar la productivitat per cèl·lula era un punt important per la seva producció a gran escala. Gràcies als resultats obtinguts en aquesta tesis, en una tesis posterior del grup es va dissenyar i posar a punt un sistema de producció en cèl·lules 211B en suspensió, que disminuïa els temps de producció i augmentava encara més la productivitat. La hipòtesis de partida era que la baixa productivitat era el resultat de l'entrada ineficient del virus a les cèl·lules durant l'amplificació. Per a això, es va desenvolupar una estratègia de producció basada en l'ús de cèl·lules 211B en les etapes d'amplificació, que expressen el *fiber* de l'Ad5 constitutivament, i en l'ús de polybrene, un polímer catiònic que incrementa l'entrada inespecífica del virus, durant les etapes d'infecció. Aquesta doble estratègia redueix significativament el nombre d'amplificacions (de 5 a 2 passos) i la durada del procés (de 15 a 5 dies). A més, per facilitar encara més la producció de l'Ad5/F40S, es van adaptar les cèl·lules 211B al creixement en suspensió (Miralles et al., 2012) permetent així quelcom impensable fins al moment, com l'escalatge del protocol i la producció dels adenovirus quimèrics en bioreactors.

Els nostres estudis també demostren que la incorporació del *fiber* es capaç d'eliminar el tropisme natiu de l'Ad5 i fins i tot redirigir el tropisme cap al del vector d'origen del *fiber*. Aquest resultat concorden amb el que s'havia observat anteriorment en vectors pseudotipats. La incorporació del *fiber* de l'Ad5 en el vector Ad5/35, va permetre augmentar la infectivitat de les cèl·lules de càncer de bufeta (Zhao et al., 2011) o en cèl·lules de múscul llis (Parker et al., 2013), en comparació amb

Ad5 normals *in vitro*. De la mateixa manera, l'adenovirus quimèric Ad5 incorporant el *fiber* de l'Ad19p també va mostrar una disminució del seu tropisme pel fetge i un increment del tropisme per cèl·lules tumorals de ronyó (Diaconu et al., 2009). Així doncs, els nostres vectors quimèrics no només són capaços d'infectar cèl·lules intestinals, sinó que també són capaços de transfectar molt eficientment altres tipus cel·lulars com les U2OS en humans, o les RT4 o les S16 en rata. Tot i que a priori no serien el seu tropisme natural, per la seva elevada capacitat infectiva seria interessant d'explorar la seva utilització en noves aplicacions.

En els nostres vectors, amb la incorporació de la proteïna *fiber* a la seva càpsida, no només es va modificar el cicle viral i van mostrar una entrada més lenta a la cèl·lula, si no que es van incorporar algunes de les característiques essencials del virus d'origen Ad40, més enllà del tropisme. Inesperadament, la simple presència del *fiber* conferia a aquests vectors la capacitat d'activació i protecció a pH àcid, adaptant-se a la via natural d'entrada pròpia dels virus salvatge: la via oral. Aquest efecte ja s'havia observat en l'Ad41 (Favier et al., 2004; Lu et al., 2009), però amb la càpsida completa del virus. És difícil d'explicar com una part minoritària de la càpsida té un efecte tan gran, però una possibilitat és que el *fiber* pugui adoptar una configuració on el *knob* es trobi bloquejat, i que el pas per l'estómac l'activi i l'exposi, augmentant la infectivitat. Paral·lelament, el *shaft*, un domini amb un pH essencialment bàsic, també permet la protecció de la partícula davant a pHs àcids. És conegut que l'entorn fisicoquímic de tracte gastrointestinal és força inhòspit, així que idealment, per iniciar la infecció, un virus hauria de mostrar estabilitat en presència de pH àcid (les cèl·lules gàstriques segreguen àcid i redueixen el pH intraluminal fins a 2.0 o valors inferiors), resistència a la pèrdua d'infectivitat en presència de les sals biliars i enzims proteolítics. Els nostres vectors, tot i mostrar l'estabilitat en presència de pH àcid, no són capaços de resistir a l'acció de les proteases. Segurament per assolir la total protecció en front les condicions extremes del tracte gastrointestinal, és necessari incorporar més proteïnes del virus Ad40 salvatge, ja que el vector quimèric amb majoria de proteïnes de l'Ad5 no és capaç de resistir l'atac de les proteases. Una d'aquestes proteïnes és el *penton*, i és probable que protegeixi la càpsida ja que al seu pas pel tracte gastrointestinal confereixi la resistència necessària per a una administració oral, tal com succeeix en vector basat en l'Ad41 (Lu et al., 2009). Per aquesta raó, es va iniciar la construcció d'un vector quimèric amb el *penton base* de l'Ad40, tot i que al finalitzar aquesta tesi encara no s'havia completat el clonatge.

Tot i la falta de protecció davant l'acció de les proteases gàstriques, la possibilitat de poder administrar els vectors per via rectal és ja un gran avantatge en front els sistemes de transducció utilitzats fins al moment amb adenovirus d'altres serotips, els quals utilitzaven tècniques tan

agressives com cateterismes intestinals o lligadura d'intestí (Cheng et al., 1997; Foreman et al., 1998; Wirtz et al., 1999), estratègies que dificultarien una aplicació clínica en humans. Així doncs, vam plantejar estudiar la biodistribució dels vectors quimèrics 5/40 en ratolins a través de tres vies poc invasives: intravenosa, oral i rectal. La biodistribució dels adenovirus quimèrics 5/40 en animals s'havia estudiat anteriorment només a nivell intravenós, amb uns resultats poc rellevants en quant a la transfecció de l'intestí i amb un tropisme reduït per fetge i melsa (Nakamura et al., 2003), però no es va analitzar altres vies d'administració. Per aquesta raó, l'administració directa dels vectors al tracte digestiu, era molt interessant, ja que una aproximació gastrointestinal no només mimetitza l'entrada natural dels adenovirus Ad40 salvatge, sinó que també permet disminuir la resposta humoral preexistent associada a la administració sistèmica.

Com a primer pas per analitzar el tropisme intestinal dels vectors Ad5/40, vam administrar els vectors directament al tracte gastrointestinal de ratolins sans i van demostrar com, especialment després de l'administració rectal, els vectors d'AdF/40S són capaços de infectar el còlon i, en menor mesura, l'intestí prim en ambdós casos, sense signes de citotoxicitat o esplenomegàlia. A més, en altres estudis paral·lels realitzats pel nostre col·laborador Adolfo Río, també es va observar que els vectors AdF/40S són capaços de infectar diferents cèl·lules intestinals humanes (HT29, Caco2, HCT116, i SW480, encara que no SW1116) en una eficàcia similar o superior de vectors Ad5, assenyalant l'adenovirus quimèric AdF/40S com a vectors molt interessants per administrar gens selectivament per al tractament de malalties intestinals (Rodríguez et al., 2013).

El tracte digestiu té tant barreres físiques (mucoses, enzims, proteolítics i pH àcid) com barreres biològiques (immunitat preexistent) que poden neutralitzar els vectors limitant per tant la transferència del gen terapèutic. Degut a aquestes barreres, els diferents estudis *in vivo* que s'han realitzat fins al moment han estat molt ineficients, independentment dels vectors utilitzats, com retrovirus (Lau et al., 1995; Noel et al., 1994), AAV (Shao et al., 2006; Tang et al., 2005) o Adenovirus (Barbara et al., 2000; Wirtz et al., 1999). Dintre d'aquest context de falta de vectors eficients pel tracte gastrointestinal, els nostres estudis *in vivo* amb el vector Ad5/F40S van mostrar la preferència d'aquest vector en la interacció de cèl·lules enteroendocrines, les que en comparació amb les cèl·lules epitelials, tenen un recanvi cel·lular més llarg i per tant són més atractives com a cèl·lules diana per a estratègies de teràpia gènica. Tot i això, per una teràpia gènica a llarg termini, era important trobar un vector capaç d'infectar eficientment cèl·lules stem cells situades en les criptes de Lieberkühn, ja que per a la longevitat d'aquestes cèl·lules, contribuiria a una expressió del transgen més duradora, i inclús els nivells d'expressió podrien veure's amplificats si el transgen fos heretat per les cèl·lules descendents. Malauradament, els resultats obtinguts van mostrar que

ni els vectors quimèrics Ad5/40, ni els vectors AAV2 i AAV8 (resultats generats però no mostrats en aquesta tesis) eren capaços d'infectar eficientment stem cells de les criptes de Lieberkühn. Això concorda amb les dades disponibles en la bibliografia, on s'assenyala que, tot i la utilització de diferents vectors virals i no virals, el tracte intestinal es un objectiu difícil per a estratègies de teràpia gènica. A més, estudis *in vivo* i *in vitro* amb retrovirus i AAV ha reportat baixa eficiència de transducció en les cèl·lules epitelials intestinals (Marel, 2011) inclús amb una administració rectal en un model muri de colitis (Farlow 2007). De fet, el més comú és que després d'una administració oral l'expressió del transgen s'observi en cèl·lules epitelials de les vellositats, però no en les cèl·lules de les criptes (Wu 1999, Foreman 1998), i per tant que l'expressió es perdi en pocs dies. No obstant, s'ha observat que el pseudotip AAV2 permet l'expressió persistent del transgen tan en cèl·lules epitelials com en cèl·lules de la lamina pròpia, el que suggereix la transducció d'alguna de les cèl·lules progenitores de la cripta (Pokyak 2008), tot i que una forma molt ineficient. Desafortunadament, no hi ha més resultats en aquest sentit.

D'altra banda, en termes de bioseguretat, els nostres resultats indiquen també que els adenovirus quimèrics resulten segurs tant en animals sans com en animals colítics, almenys amb els gens marcadors. No obstant, les lectures de luminometria dels teixits d'animals colítics tractats amb vectors d'expressió β -galactosidasa no son fiables, per lo que no estem en condicions de aportar valors quantitativs per descriure la biodistribució en animals colítics. En animals sans, el rentat elimina eficaçment les bactèries adherides al mucus, i per tant, la β -galactosidasa derivada de la microbiota, i en conseqüència, la quantificació realitzada per luminometria és precisa i fiable. En estudis en model animal de colitis induïda, però, cal descartar la utilització de β -galactosidasa com a gen marcador, ja que la disrupció de l'intestí permet la translocació de la flora bacteriana, impeding distingir l'origen de la proteïna. La nostra recomanació es utilitzar gens marcadors fluorescents, com la GFP o la luciferasa, en aquest tipus d'estudis, encara que la seva quantificació no sigui tan sensible ni precisa com l'obtinguda amb la β -galactosidasa.

Finalment, destacar que es va observar que el vector F/40S era capaç de transfectar de manera extremadament eficient macròfags residents de l'intestí. Tot i que inicialment es va escollir el vector F/40S per seu tropisme intestinal, aquest descobriment va permetre considerar altres estratègies terapèutiques, com per exemple, la teràpia cel·lular *ex vivo*. D'aquesta manera, podria considerar-se una estratègia consistent en l'extracció de monòcits d'un pacient, seguit de la seva infecció per F/40S amb el gen terapèutic corresponent, per finalment readministrar-los al pacient. Aquesta teràpia generaria una sèrie d'avantatges. Primerament, al tractar-se d'una teràpia *ex vivo* hi haurien menys problemes de bioseguretat, ja que els adenovirus que no haguessin infectat les

cèl·lules serien eliminats del medi abans de ser readministrats al pacient. En segon lloc, es tractaria d'una teràpia específicament dirigida al pacient, doncs s'utilitzarien les seves pròpies cèl·lules. I per últim els monòcits anirien directament al lloc d'inflamació, on podrien actuar de forma més localitzada.

Aquestes dades en conjunt donen suport a la idea de que l'F/40S es un vector a tenir en compte no només en teràpies intestinals, si no també en abordatges terapèutics que requereixin de la infecció de cèl·lules dels sistema immune amb monòcits. Transfectant els monòcits/macròfags del propi pacient, i reintroduint-los al torrent sanguini, aquests són capaços d'arribar a la zona inflamada de l'intestí. Però no només això, sinó que en aquest cas es podrien aplicar a qualsevol malaltia inflamatòria, ja que el macròfag transportaria el gen terapèutic als llocs d'interès. També seria un sistema molt útil per a vacunació, ja que exposant els epítops en els macròfags es podrien produir els anticossos necessaris. Així mateix, considerant la capacitat d'infecció de cèl·lules enteroendocrines, donada la seva capacitat secretora dirigida cap al lumen intestinal, també és podria aplicar el vector F/40S per alliberar productes al lumen intestinal en teràpies agudes per altres malalties no intestinals. Les possibles aplicacions d'aquest vector són tan prometedores que es va patentar i es va llicenciar a la empresa Nanotherapix, que va ser posteriorment adquirida per la farmacèutica GRIFOLS per portar els vectors quimèrics Ad5/40 a assaigs clínics en humans.

En resum, quan vam iniciar aquest estudi, no hi havia disponible un vector eficient per infectar cèl·lules del tracte gastrointestinal *in vivo*. Gràcies a aquest estudi hem analitzat i demostrat que els vectors quimèrics Ad5/F40S tenen un gran potencial coma vectors per estratègies de teràpia gènica a l'intestí, amb tropisme per cèl·lules enteroendocrines i també per macròfags residents.

A més, l'estudi del seu cicle viral i l'optimització de la seva amplificació ha permès posar a punt un protocol que ha aconseguit resoldre els problemes de la producció ineficient fins obtenir els nivells de titulació necessaris per assaigs preclínics i fins i tot clínics, i per tant facilitant la seva aplicació com a eina terapèutica en humans.

CONCLUSIONS

1. S'han generat els constructes plasmídics necessaris per a la producció de vectors quimèrics 5/40 amb gens terapèutics.
2. La proteïna F40S alenteix la cinètica d'unió de la càpsida dels adenovirus quimèrics 5/40 a les cèl·lules HEK293.
3. El vector quimèric F/40S té un cicle de 48-60 hores en comparació amb els Ad5 controls. Aquesta modificació del cicle viral és causada per presència del *fiber* curt de l'Ad40S.
4. S'ha optimitzat la producció dels vectors quimèrics 5/40 adaptant el protocol d'amplificació al cicle viral dels vectors. Amb aquest protocol optimitzat s'aconsegueix un títol més elevat de virus, i per tant, es millora l'eficiència d'amplificació.
5. La baixa proporció de partícules infeccioses F/40S en les produccions en cèl·lules HEK293 no és deu a la inestabilitat de la interacció entre el *fiber* 40S i el *penton base* de l'Ad5, sinó probablement a baixos nivells en HEK293 del receptor amb que interacciona el *fiber* F40S
6. El *shaft* del *fiber* curt de l'Ad40S confereix protecció davant de l'exposició a pH àcid, tot i que no a proteases. L'exposició a pH àcid també activa el *knob* del *fiber* i augmenta la infectivitat dels vectors F/40S i F/540.
7. La presència del *fiber* curt o del *knob* de l'Ad40S modifica el tropisme natural de l'Ad5 en cultius *in vitro*, i augmenta la eficiència de transducció en les línies cel·lulars U2OS, A549, RT4 i S16.
8. La presència del F40S redueix el tropisme natural de l'Ad5 cap al fetge quan s'administra de forma sistèmica.
9. Quan s'administra per via oral o rectal, els vectors F/40S i F/540 infecten amb molta més eficiència el colon que l'Ad5.

10. Les cèl·lules principalment infectades a còlon per l'F/40S són cèl·lules enteroendocrines i macròfags residents.

11. En conclusió, s'ha aconseguit generar un vector eficient per infectar cèl·lules del tracte gastrointestinal *in vivo* als nivells de titulació necessaris per assaigs preclínic, i s'ha demostrat que els vectors quimèrics Ad5/F40S tenen un gran potencial com a vectors per estratègies de teràpia gènica a l'intestí.

MATERIAL I MÈTODES

1. MATERIALS

1.1. Vectors plasmídics i soques bacterianes

Els plàsmids de partida del quals s'han generat els plàsmids d'aquest treball són: pTG6600 (Transgene), pGEMT-easy (Promega), pKP1.3 i pKP1.4 delta CMV, (cedits per Dr. Eric Kremer, Genethon II, França), i pWEAxKM-F/40SL, -F/40S, -F/540S, -F/405 (cedits per Dr. H. Hamada). Els plàsmids generats a partir d'aquest últim es mostren en la Taula 14.

Taula 14. Plàsmids generats

PLÀSMIDS
p8900F5
P8900F5_M
P8900F5_X
P8900F5_XM
pGEMT-F40S
P8900F40S

Per l'amplificació de plàsmids s'ha utilitzat la soca d'*E. coli* TOP10 d'Invitrogen (genotip: F-mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 araD139 Δ (ara-leu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG).

Per a la recombinació homòloga s'han utilitzat la soca d'*E. coli* BJ5183R d'Stratagene (genotip endA1 sbcBC recBC galK met thi-1hsdR (Str)).

1.2. Vectors virals

En aquesta tesis s'han utilitzat els següents vectors virals:

Taula 15. Vectors adenovirals utilitzats

VECTOR	Descripció
Ad5-GFP	stocks inicials cedits per Dr. E. Kremer
Ad5- β Gal	
F/40SL- β Gal	stocks inicials cedits per Dr. H. Hamada
F/40S- β Gal	
F/40S-GFP	
F/540- β Gal	
F/405- β Gal	

1.3. *Cultius in vitro*

Per a la producció d'adenovirus es van utilitzar les cèl·lules HEK293 (ATCC® CRL-1573™). Les cèl·lules HEK293 son permissives per a la producció de vectors adenovirals, ja que contenen la regió E1A que s'ha eliminat del genoma del vector.

Per a analitzar el tropisme dels adenovirus quimèrics es van utilitzar les següents línies cel·lulars (veure Taula 16).

1.4. *Animals*

Pels experiments de biodistribució es van utilitzar ratolins femella CD1 entre 8 i 10 setmanes d'edat sanes (Charlie River, França). Els animals es van alimentar *ad-libitum* amb una dieta estàndard (PanLab, España) i amb cicles de llum-fosc de 12 hores de duració.

Per induir la colitis es va administrar 5 dies de DSS 4% (MP Biomedicals) amb l'aigua de beure, i després 7 dies de descans. Amb aquesta metodologia s'obté un quadre colíctic amb símptomes de diarrea, sang a les femtes i alteració en l'aspecte i comportament dels animals.

Per a l'administració rectal, els animals es van anestesiar prèviament amb quetamina (Imalgene Merial Labs) i xilazina (Rompun, Bayer) (55/15 mg/kg, volum d'administració 10mL/kg, intraperitoneal). Després de l'administració dels adenovirus, els ratolins es van mantenir en posició vertical (posició Trendelenburg) per evitar fugues del líquid.

En els estudis de biodistribució els animals es van eutanasiar tres dies després de l'administració dels vectors virals.

Els experiments amb animals es van realitzar en el *Servei d'Estabulari de la Universitat Autònoma de Barcelona*, seguint la legislació vigent i amb l'aprovació del comitè d'ètica i experimentació animal i humana de la UAB.

Taula 16. Línies cel·lulars utilitzades en els experiments de tropisme

GRUPS	LÍNIA CEL·LULAR	REFERÈNCIA ATCC	DESCRIPCIÓ
Producció d'adenovirus	HEK 293	CRL-1573	Línia cel·lular de cèl·lules embrionàries de ronyó humanes, transformades amb un insert de 4.5 kilobases procedent del braç esquerre del genoma de l'Ad5
	211B	-	Línia cel·lular derivada de HEK 293, la qual expressa constitutivament el <i>fiber</i> de l'Ad5
	N52	-	Línia cel·lular d'amniòcits humans, transformades amb el gens E1 de l'Ad5
Origen Intestinal	CaCo2	HTB-37	Línia cel·lular de cèl·lules epitelials humanes d'adenocarcinoma colorectal
	HT29	HTB-38	Línia cel·lular de cèl·lules epitelials humanes d'adenocarcinoma colorectal de grau II
Origen tumoral	U2OS	HTB-96	Línia cel·lular de cèl·lules epitelials humanes d'osteosarcoma
	HeLa	CCL-2	Línia cel·lular de cèl·lules humanes de càncer cervical
	A549	CCL-185	Línia cel·lular de cèl·lules epitelials humanes d'adenocarcinoma pulmonar
	SKOV3	HTB-77	Línia cel·lular de cèl·lules humanes de carcinoma d'ovari
	HepG2	HB-8065	Línia cel·lular de cèl·lules humanes de carcinoma de fetge
Origen cèl·lules de Schwann	RT4	CRL-2768	Línia cel·lular tumoral de cèl·lules de Schwann de rata
	S16	CRL-2941	Línia cel·lular de cèl·lules de Schwann de rata immortalitzades

2. MÈTODES

2.1. Obtenció i anàlisis de DNA

2.1.1. Minipreparacions de DNA plasmídic

Tècnica utilitzada per a l'obtenció de DNA plasmídic mitjançant la lisi alcalina d'un precultiu de bacteris i posterior precipitació amb isopropanol. El DNA s'obté a baixes quantitats (5-15 mg) i de poca puresa, però és suficient per a la seva amplificació per PCR o digestió amb enzims de restricció. Per a la seva extracció es parteix de 3 mL de medi de cultiu (suplementat amb l'antibiòtic de selecció) inoculat prèviament amb colònies aïllades crescudes en placa de LB-agar.

Reactius: Solució I de resuspensió (4 °C): 50mM Tris-HCl (Sigma) pH = 8,0, 10mM EDTA (USB), 100µg/mL RNAsa (Sigma). Solució II de lisi: 200mM NaOH (Panreac), 1% SDS (p/v) (USB). Solució III de precipitació proteica (4 °C): 3M acetat potàssic, pH = 5,5 (Panreac). Isopropanol i etanol absolut (Panreac).

Procediment: Es centrifuga 1,5 mL de cultiu en un Eppendorf durant 1 minut a 12.000G. Es descarta el sobrenedant i es resuspèn el precipitat amb 200 µl de Solució I de resuspensió. A continuació, s'afegeix 400 µl de Solució II de lisi, es barreja suaument invertint el tub diverses vegades i es deixa incubar 5 minuts a temperatura ambient. S'afegeix 400 µl de Solució III de precipitació proteica i s'agita fins a homogeneïtzar. S'incuba 10 minuts en gel. Es centrifuga 10 minuts a 12.000G i es recupera el sobrenedant traspasant a un altre tub. S'afegeix 0,6 volums d'isopropanol i es deixa reposar 10 minuts a temperatura ambient. Es centrifuga 10 minuts a 12.000G i es descarta el sobrenedant. Es renta amb etanol 70% i es centrifuga 10 minuts a 12.000G. Es descarta el sobrenedant i es deixa assecar el precipitat. Finalment es resuspèn en 30 µl d'aigua MilliQ.

2.1.2. Maxipreparacions de DNA plasmídic

Per tal d'obtenir DNA plasmídic en quantitats elevades (250-1000 µg) s'ha utilitzat el Kit comercial Phoenix Maxiprep Kit (Q-BIOgene, 2075-300), seguint el protocol indicat pel fabricant a partir de 200 mL de cultiu bacterià.

Procediment: Es centrifuga el cultiu bacterià durant 15 minuts a 6000G a temperatura ambient, es descarta el sobrenedant i s'afegeix 10 mL de Rnase A-containing Cell Resuspension Buffer fins a resuspendre el pellet. S'afegeix 10mL de Lysis Buffer, es barreja per inversió i es deixa incubar 5

minuts a temperatura ambient. S'afegeix 10 mL de Neutralization Buffer i es centrifuga a 12000G durant 10 minuts a temperatura ambient. El sobrenedant s'aboca a la columna, que prèviament ha estat equilibrada amb 30 mL d'Equilibration Buffer, ho fem utilitzant gasses per evitar que el precipitat proteic obturi la columna. Quan el sobrenedant ha passat per la columna per gravetat s'hi afegeixen 60 mL del Wash Buffer. Un cop han passat per la columna, s'afegeixen 15 mL d'Elution Buffer i al eluït, que recollim en tubs corex de Pyrex, se li afegeixen 10,5 mL de isopropanol. S'inverteix i es centrifuga a 12000G durant 30 minuts a 4°C. Es descarta el sobrenedant i es fa un rentat amb 1 mL d'etanol 70%. Eliminar el sobrenedant, deixar assecar el pellet i resuspendre'l amb aigua MiliQ. Per tal de conèixer la concentració de DNA mesurem la densitat òptica a l'espectrofotòmetre (Uvmini 1240, Shimadzu) a 260 nm, tenint en compte que a aquesta longitud d'ona 1 unitat de densitat òptica correspon a 50 µg de DNA/mL.

2.1.3. Preparació de bacteries quimiocompetents

Per a què un plàsmid es pugui replicar s'ha d'inserir dins de cèl·lules bacterianes mitjançant el procés anomenat transformació. Aquestes cèl·lules bacterianes han d'adquirir prèviament l'habilitat de transformar el DNA. Per a això s'utilitzen cèl·lules quimiocompetents TOP10 (Invitrogen).

Reactius: *E.coli* TOP10, TFB1: 10 mM RbCl (Fluka), 50 mM MgCl₂ (Sigma), 30 mM acetat potàssic (Panreac), 10 mM CaCl₂ (Sigma), 15% glicerol (v / v) (Panreac); pH = 5,8 (HCl). TFB2: 10 mM MOPS (Fluka), 10 mM RbCl (Fluka), 75 mM CaCl₂ (Sigma), 15% glicerol (v / v) (Panreac); pH = 6,8 (HCl). Les dues solucions s'esterilitzen mitjançant filtres de xeringa 0,22 µm (Millex), després de la preparació

Procediment: Es creix durant una nit un pre-inòcul de 3 mL de LB a partir d'una alíquota de 5 µl de bacteris de preparacions anteriors. L'endemà, s'utilitza per inocular 200 mL de LB i s'incuba a 37°C en agitació (incubador orbital), fins que el cultiu arriba a una densitat òptica DO₆₀₀=0,5, corresponent a la fase exponencial de creixement. A continuació, es deixa refredar el cultiu en gel durant 5 minuts i es reparteix en tubs de 50 mL. Es centrifuga 5 minuts a 4.000G a 4°C i es descarta el sobrenedant per decantació. És important mantenir sempre els bacteris en gel. A continuació, es resuspèn el pellet en 30 mL de TFB1 per cada 100 mL de cultiu centrifugat i s'incuba en gel durant 90 minuts. Seguidament, es centrifuga durant 5 minuts a 4.000G a 4°C, es descarta el sobrenedant i es resuspèn el pellet cel·lular amb 4 mL de TFB2 per cada 100 mL de cultiu original

centrifugat. Finalment, es preparen alíquotes de 100 µl en tubs Eppendorf prèviament refredats (-80°C) mantenint-los en neu carbònica i s'emmagatzemen a -80°C.

2.1.4. Transformació bacteriana

La transformació es la introducció de DNA plasmídic dins la cèl·lula bacteriana i es realitza per xoc tèrmic.

Reactius: Plaques de Petri (Nunc) de LB-agar amb ampicilina: Luria Broth (Miller's LB Broth), agar (Panreac), ampicilina 100 µg/mL (USB). Medi de creixement LB líquid.

Procediment: Es descongelen els vials de cèl·lules quimiocompetents (100 µl) durant 10 minuts en gel i s'afegeix 5-10 µl del plàsmid (procedent d'una miniprep o d'una reacció de lligació). S'incuba en gel 30 minuts i a continuació es realitza el xoc tèrmic, que consisteix en mantenir els vials durant 90 segons al bany a 42°C i immediatament després dipositar-los en gel durant 2 minuts. S'afegeixen llavors 200 µl de LB sense antibiòtic i s'incuba 1 hora a 37°C en agitació (incubador orbital). D'aquesta manera les cèl·lules poden recuperar-se i expressar la resistència a l'antibiòtic. Finalment, es sembren les cèl·lules en plaques de Petri LB-agar amb ampicilina i s'incuben o/n en l'estufa a 37°C. En el cas que el plàsmid confereixi resistència a un antibiòtic diferent a l'ampicilina, substituir aquesta per l'antibiòtic corresponent.

2.1.5. Electroforesis de DNA en gel d'agarosa

Per a separar fragments de DNA de diferent mida es va utilitzar la tècnica de l'electroforesi. El DNA carregat negativament es sotmet a un camp elèctric i migra a través de la matriu en direcció a l'ànode de manera proporcional a la seva mida. El percentatge d'agarosa pot variar (1-2%) depenent dels fragments a aïllar.

Reactius: Agarosa (p/v) (Amresco). Tampó d'electroforesi TAE 1X: 40 mM tris-acetat, pH = 8,0; 0,1 mM EDTA. Tampó de càrrega 10X: 50% glicerol (v/v) (Panreac), 100 mM EDTA pH=8,0 (USB), 1% SDS (p/v) (USB), 0,1% Blau de bromofenol (p/v) (Sigma), 0,1% Xileno cianol (p/v). GeneRuler 1Kb DNA Ladder (Fermentas), Bromur d'etidi (Invitrogen).

Procediment: Per a la preparació del gel es fon l'agarosa amb el percentatge desitjat (p/v) en tampó TAE (1x). Després de la polimerització, s'afegeix TAE (1x) fins a cobrir el gel. A continuació, es carreguen les mostres de DNA en els pous juntament amb tampó de càrrega i s'aplica un corrent d'60-110V el temps necessari per a la separació dels fragments de DNA. Es submergeix el gel en

una solució de Bromur d'etidi (6 µg/mL en TAE) durant 15 minuts i finalment es visualitza mitjançant llum UV en un transiluminador (Syngene).

2.1.6. Purificació de fragments de DNA

La purificació de bandes de DNA de gels d'electroforesi es va dur a terme amb el kit comercial GENE CLEAN Turbo Kit de Q-BIOgene (Ref. 1102 # 400) seguint el protocol del fabricant.

2.1.7. Quantificació del DNA

La quantificació del DNA procedent de minipreparacions, maxipreparacions, etc es va realitzar mitjançant lectura en NanoDrop (NanoDrop Technologies, Inc Wilmington, DE, USA) a una longitud d'ona de 260nm (OD 260/280). Aquest sistema permet determinar la concentració de DNA i la seva puresa amb volums de mostra molt petits (1-2 µl).

2.1.8. Digestió mitjançant enzims de restricció

Les endonucleases de restricció són enzims que actuen reconeixent seqüències curtes i específiques de nucleòtids, trencant la cadena a llocs concrets. Per a la digestió s'utilitzen entre 4 i 10 U d'enzims per 1 µg de DNA. La temperatura i els tampons necessaris són establerts pel fabricant. El temps de digestió varia des d'una hora a o/n depenent de la quantitat d'enzim utilitzada i del propi enzim. Els enzims de restricció utilitzats en aquest treball són de Fermentas i New England Biolabs.

2.1.9. Clonació

L'objectiu d'aquesta tècnica és unir dos segments de DNA plasmídic per formar una única molècula de DNA amb autonomia per replicar-se en un bacteri. Les construccions utilitzades en aquest treball s'han obtingut mitjançant clonació per lligació i clonació per recombinació.

2.1.9.1. Clonació per lligació

Procediment: S'obté el vector i l'insert dels plàsmids respectius mitjançant digestió amb enzims de restricció (New England Biolabs, Fermentas) generant extrems compatibles. Seguidament, se separen els fragments de DNA mitjançant electroforesi en gel d'agarosa, es purifiquen les bandes d'interès mitjançant GeneClean i es quantifiquen amb el NanoDrop. Per evitar una possible relligament, es desfosforilen els extrems del insert mitjançant la fosfatasa TSAP (*Thermosensitive*

Alkaline Phosphatase, Promega). S'utilitza 1µl de TSAP, s'incuba 1h a 37°C i posteriorment s'inactiva per calor a 74°C durant 15 minuts.

Per a la reacció de lligació s'utilitza la T4 DNA lligasa (New England Biolabs). Habitualment s'utilitzen 50 ng del vector per reacció de lligació. Per tal de calcular la quantitat molar equivalent de l'insert és necessari conèixer la relació de mida vector/insert. Es prepara una condició equimolar (1:1), una condició on l'insert es troba en excés (1:3 o 1:4), una condició control sense lligasa (per conèixer la quantitat de vector sense digerir) i una condició control sense insert (per determinar l'eficiència de la lligasa). Les reaccions de lligació es realitzen a 16°C durant 4 hores. Posteriorment, es transformen els productes d'aquestes lligacions en cèl·lules quimiocompetents TOP10 (Invitrogen) per xoc tèrmic. Finalment, s'inoculen precultius de 3 mL de LB amb ampicil·lina (o l'antibiòtic de selecció utilitzat) i es deixen créixer o/n a 37°C en agitació. Seguidament, s'extreu el DNA plasmídic per minipreparació i es comprova amb enzims de restricció.

2.1.9.2. *Clonació per recombinació homòloga en bacteris*

Procediment: Per a la generació de vectors adenovirals l'últim pas de clonació es realitza mitjançant recombinació homòloga degut a que els plàsmids implicats tenen una mida considerablement més gran, i per tant el procés clàssic de lligació no és eficient. Així doncs, el plàsmids pKP1.3 o pKP1.4, portadors del genoma de l'adenovirus flanquejat per seqüències ITR, es linealitzen mitjançant la digestió amb l'enzim de restricció SwaI. Al seu torn el plàsmid llançadora p6600 portador del cassette de replicació amb el transgèn es digereix amb dos enzims que tinguin dianes externes a la zona de recombinació. Per a la reacció de recombinació es van utilitzar 50 ng del pKP1.4 digerit amb SwaI. Es prepara una condició equimolar (1:1), una condició 1:2 i una altra 1:3 (pTG6600 linealitzat en excés). A continuació es transforma en bacteries BJ5183, s'inoculen precultius de 3 mL de LB amb ampicil·lina a partir de colònies aïllades i es deixen créixer o/n a 37°C en agitació. Seguidament, s'extreu el DNA plasmídic per minipreparació i s'analitza per enzims de restricció per comprovar el patró de digestió. Els clons positius es transformen en cèl·lules TOP10, que permet un major rendiment en la replicació del DNA plasmídic.

2.1.10. *Amplificació de fragments de DNA mitjançant PCR*

La PCR (reacció en cadena de la polimerasa o *Polymerase Chain Reaction*) és una tècnica en la qual s'amplifiquen fragments de DNA gràcies a l'ús de dos oligonucleòtids o encebadors, que s'hibriden de forma complementària amb els extrems del fragment de DNA a amplificar, i gràcies a l'acció de l'enzim TaqPolimerasa. Aquest enzim incorpora els nucleòtids necessaris fins arribar

al final de la cadena de DNA que està amplificant, procés que es repeteix fins a 25-35 cicles per PCR, obtenint el DNA desitjat. Les PCR del present treball han estat realitzades utilitzant els següents reactius i condicions:

Reactius:

0,4 µl dNTPs (25 mM)
5,0 µl MgCl₂ (10 mM)
10 µl tampó de l'enzim TaqPol (5X)
0,3 mL TaqPol (5 U/µl)
1 µl de cada primer (10 µM)
0,5 µl de DNA (20 ng/µl)
Volum final de 20 mL (amb aigua MilliQ)

Condicions d'amplificació:

98° C- 5 minuts
(94° C- 30 segons, 58° C-30 segons, 72° C-2 minuts) x 30 cicles
72° C-10 minuts
25° C- 5 minuts
Mantenir a 4° C o congelar a -20° C

Les condicions d'amplificació poden variar en funció del nombre de Kb a ampliar (1 min/Kb), del DNA de partida (10 ng de DNA plasmídic o 100 ng de DNA genòmic) o de l'oligonucleòtid utilitzat (temperatura d'unió a la cadena motlle).

Taula 17. Primers utilitzats en l'amplificació dels *fibers*

DNA MOTLLE	PRIMER FORWARD	PRIMER REVERS
Ad5	CCGGTCCTCCAACCTGTGCC	GGCAATGTATGAAAAAGTGTAAG
F/40SL	TCCCAGCATTCTTATGTAG	TTGTTACATAAGAAAATGAGCAAC
F/40S	CCCTATGACACCTCCTCAAC	CGGTGGGTGGGTGAAAAGG
F/540	CCGGTCCTCCAACCTGTGCC	CGGTGGGTGGGTGAAAAGG
F/405	CCCTATGACACCTCCTCAAC	GGCAATGTATGAAAAAGTGTAAG

2.1.11. Mutagènesis dirigida

La mutagènesis dirigida permet mutar específicament un o varis nucleòtids d'un fragment de DNA. Les mutagènesis que es van dur a terme en aquesta tesi es van realitzar per obtenir dianes de

restricció necessàries per a la clonació en els vectors adenovirals. Es van utilitzar les següents condicions:

Reactius:

45 µl de MIX high fidelity (Platinum PCR Supermix high fidelity d'INVITROGEN #12532-016)
Aquest mix conté tots els elements necessaris per a l'amplificació dels fragments de DNA per PCR.

1 µl de cada primer (10 µM)

0,5 µg de DNA plasmídic

Volum final de 50 µl (amb aigua MilliQ)

Condicions d'amplificació:

94° C- 1 minut

(94° C- 30 segons, 58° C-30 segons, 72° C-9 minuts) x 30 cicles

72° C-10 minuts

25° C- 5 minuts

Mantenir a 4° C o congelar a -20° C

Posteriorment a la reacció de PCR, s'afegeix 10 U de l'enzim DpnI amb 5,6 µl del tampó corresponent i es deixa 1 hora a 37° C, per degradar el DNA procedent de la bactèria.

Es transforma 5 µl de la reacció en cèl·lules competents i es creixen les colònies en minipreparacions per analitzar posteriorment el seu patró de digestió mitjançant enzims de restricció.

Taula 18. Primers utilitzats en la mutagènesis dirigida

	PRIMER FORWARD	PRIMER REVERS
Introducció XbaI	CATGTTGTTCTAGATGAAGCGCGCAA	CGCTTCATCTAGAACAACATGAAGATAG
Introducció MluI	GCCCAAGAATAAAGACGCGTTTGTG	GAAACATAACACAAACGCGTCTTTATTC

2.1.12. Seqüenciació

La seqüenciació es va dur a terme al *Servei de Seqüenciació de la Universitat Autònoma de Barcelona*.

Taula 19. Primers utilitzats en seqüenciació

	PRIMER FORWARD	PRIMER REVERS
Seqüenciació p8900_XM	CCCACTATCTTCATGTTGTTCT	GTTGAAACATAACACAAACGCG

2.2. Obtenció i anàlisis de proteïnes

En aquest treball s'ha realitzat l'extracció de proteïnes totals de partícules virals i mostres de teixit.

2.2.1. Extracció de proteïnes a partir de partícules virals

Procediment: Es desnaturalitzen 100 µl de partícules virals 10 minuts a 98-99 °C.

2.2.2. Extracció de proteïnes a partir d'extractes cel·lulars

Reactius: buffer lisi RIPA (50mm Tris-HCl (pH 7.4) (Sigma), 150 mm NaCl (Panreac), 1mM EDTA (USB), 1% NP-40 (Panreac) i 0.25% deoxicolat sòdic (Fluka), tauleta amb inhibidors de proteïnes i fosfatases (Roche), sonicador (Sonics).

Procediment: En el cas dels extractes cel·lulars, les cèl·lules es centrifuguen 5 minuts a 200G, es descarta el sobrenedant i el pellet es resuspèn en 100 µl de buffer RIPA. Seguidament s'homogeneïtzen mitjançant sonicació utilitzant 3 polsos de 10 a 20 segons, mantenint les cèl·lules en gel per a que no es degradi la mostra amb el calor generat. En les mostres de còlon i altres òrgans s'afegeix 400 µl i s'homogeneïtzen utilitzant uns 5-10 polsos de 10 a 20 segons, també mantenint les cèl·lules en gel, per evitar que s'escalfin i possibles degradacions proteiques. Un cop finalitzada la homogeneïtzació es centrifuguen durant 15 minuts a 12.000G a 4°C per eliminar les restes, es recull el sobrenedant i es guarda a -80°C fins a la seva quantificació.

2.2.3. Quantificació de proteïnes

Tots els extractes proteics es quantifiquen amb el mètode colorimètric BCA™ Protein Assay Kit (Pierce) que està basat en la reacció de Biuret. Aquesta reacció consisteix en la capacitat quelant de l'àcid bicinconínic (BCA) amb els ions Cu⁺ resultants de la reducció del Cu²⁺ a Cu⁺ pels enllaços peptídics de les proteïnes en solució alcalina. Els ions Cu⁺ són quelats per cada 2 molècules de BCA, afavorint el viratge de la solució verdosa a lila, que absorbeix a 562 nm i que es pot mesurar per espectrofotometria.

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

Procediment: Es parteix d'una recta patró que consisteix en dilucions seriades (des 2 mg/mL fins 0,0625 mg/mL) a partir d'un estoc d'albumina bovina sèrica (BSA) proporcionada pel kit. Es preparen també les dilucions de les mostres proteiques a quantificar (normalment 1/10, però pot

variar si els valors no entren en la recta). Prèviament, es prepara la solució *working reagent* tal com indica el fabricant, i aquesta es barreja amb 2 µl de recta patró o de les mostres a quantificar. A continuació, es deixa la reacció incubant 30 minuts a 37°C. Posteriorment, es mesura l'absorbància a 562 nm amb el Nanodrop, començant per la recta patró a partir de la qual s'extrapolen les mesures d'absorbància de les mostres, obtenint la concentració per a cadascuna d'elles.

2.2.4. Electroforesis desnaturalitzant (SDS-PAGE)

L'electroforesi desnaturalitzant SDS-PAGE es fonamenta en la capacitat de mobilització de les partícules amb càrrega després de l'aplicació d'un camp elèctric. La presència d'un detergent aniònic, com el SDS, provoca la desnaturalització de les proteïnes pel trencament dels ponts disulfurs. D'aquesta manera, les proteïnes poden migrar i separar segons la seva mida molecular.

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

Procediment: Es prepara un gel d'acrilamida. La concentració d'acrilamida dependrà del rang de pes molecular de la proteïna a detectar (en aquest treball s'han utilitzat concentracions del 7 a 10%). Es prepara també un gel concentrador (stacking) a 3,9% d'acrilamida per als pous on es carregaran les mostres. Per a la polimerització s'afegeix TEMED i APS. Per preparar les mostres, es dilueix la quantitat de mg de proteïna que es desitgi córrer en aigua (en el nostre cas, 4×10^9 PP de cada vector), i s'afegeix el tampó de càrrega 5x. Abans de carregar al gel, es desnaturalitzen durant 10 minuts a 98°C. Un cop carregades al gel, es realitza l'electroforesi a un voltatge inicial de 110V durant 20 minuts perquè les proteïnes es concentrin abans d'entrar al gel separador, i posteriorment durant 1-1,5h a 130-140V segons les bandes a detectar.

2.2.4.1. Electrotransferència

Reactius: Transblot semidry transfer cell (BioRad), membranes PVDF (GE Healthcare), metanol (Panreac), tampó de transferència 1x (25mm Tris [Sigma], 192mM Glicina [Serva]), paper Protean XL Size (BioRad), tampó Ponceau (5% en aigua amb àcid acètic) (Sigma).

Procediment: Les proteïnes presents al gel d'acrilamida es transfereixen a una membrana de PVDF prèviament activada (submersió en metanol 10 segons, seguit d'un rentat de 5 minuts amb aigua destil·lada i 15 minuts en tampó de transferència). El gel d'acrilamida amb les proteïnes també s'equilibra durant 15 minuts en tampó de transferència, igual que dos trossos de paper Protean. Després d'aquesta preparació, es munten les capes necessàries per a la transferència, aquestes són de baix a dalt: paper, membrana, gel i un altre paper. És important anar eliminant amb un corró les bombolles entre les capes perquè no interfereixin en el procés. Es realitza la transferència durant 45 minuts a 25V. Posteriorment, i de forma opcional, poden observar les proteïnes transferides al paper mitjançant tinció amb Ponceau (submersió 5 minuts). Després de la seva visualització s'ha d'extreure el Ponceau mitjançant rentats seriatos amb aigua destil·lada

2.2.4.2. Immunodetecció

Reactius: TBS (50 mM Tris [Sigma], 136 mM NaCl [Panreac], 40 mM KCl [Panreac], pH 7,5), llet desnatada en pols (Central Lechera Asturiana), albúmina bovina sèrica (BSA) (Sigma), Tween-20 (Sigma), anticossos primaris i secundaris, ECL Plus Western Blotting Detection (GE Healthcare), Hyperfilm ECL high performance chemiluminescence film (GE Healthcare), tampó de deshibridació (62,5 mM Tris [Sigma], 100 mM 2-mercaptoetanol [Sigma], 2% SDS [USB]).

Taula 20. Anticossos utilitzats en immunodetecció

ANTICÒS PRIMARI	CASA COMERCIAL	REFERÈNCIA	ANTICÒS SECUNDARI
Anti-Adenovirus <i>Fiber</i>	Abcam	ab3233	Goat ¹

¹Anticòs secundari utilitzat: peroxidasa de rave (HRP) conjugat amb cabra-anti-conill (P0160, Dako).

Procediment: Després de la correcta transferència de la membrana, es procedeix al bloqueig submergint la membrana en solució de bloqueig durant 1 h a temperatura ambient per evitar unions inespecífiques de l'anticòs primari. La solució emprada de forma majoritària ha estat 5% de llet en TBST (TBS amb 0,1% de Tween-20). Posteriorment, s'incuba la membrana amb 5-7 mL de la dilució de l'anticòs en solució de bloqueig a la concentració que indica el fabricant, o/n a 4°C. L'endemà, es realitzen 3 rentats de la membrana amb TBST durant 10 minuts i s'incuben amb la dilució de l'anticòs secundari (té conjugada la peroxidasa de rave) en solució de bloqueig durant 1h a temperatura ambient. Posteriorment, es realitzen 3 rentats a la membrana de 10 minuts amb TBST i es procedeix a la detecció. Per a la detecció, es barregen els dos components del kit ECL Plus com indica el fabricant, es cobreix la superfície de la membrana i s'incuba durant 5 minuts.

D'aquesta manera, el luminol del kit reaccionarà amb la peroxidasa, emetent llum. Finalment, s'exposa la membrana amb una pel·lícula fotogràfica durant el temps necessari (variable) i s'escanegen les bandes obtingudes en els films.

2.3. Tècniques generals de cultius cel·lulars

La manipulació de cultius cel·lulars va ser realitzada en les instal·lacions de nivell de seguretat biològica 2 (NSB2) de la cinquena planta del CBATEG, seguint el Reglament de Seguretat de la instal·lació per tal de mantenir tot el possible les condicions d'asèpsia i esterilitat.

Equipament general: Campana de flux laminar vertical amb sistema de llum ultraviolada (Telstar). Incubador de cèl·lules (Forma Scientific) d'atmosfera controlada (5% CO₂, 95% O₂, 95% d'humitat relativa i 37°C). Congelador de -80°C (Forma Scientific). Microscopi invertit (Nikon). Material fungible: pipetes de plàstic estèrils (ALP), plaques de 10 i 15 cm de diàmetre, plaques de 6, 12, 24, 48 i 96 pous, tubs cònics (Falcons) de 15 i de 50 mL, criotubs, scrappers (Nunc).

2.3.1. Manteniment de cultius cel·lulars en monocapa

Reactius: Medi de creixement: Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (PAA), conté 4,5 mg/mL glucosa i L-glutamina, es complementa amb un 10% (v/v) de Sèrum Fetal Boví (FBS) (PAA) i antibiòtics penicil·lina/estreptomicina (P/S) 1x (100x) (PAA). Tampó fosfat salí (D-PBS): 137 mM NaCl, 3 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄ 7H₂O, 1,7 mM KH₂PO₄, pH 7,4 (Panreac), Tripsina-EDTA (1x) (PAA). Solució salina 1x (1,4 M KCl, 0,7 M NaCl).

Procediment: El manteniment habitualment es realitza en plaques de 15 cm. Amb les línies cel·lulars de HEK293 s'aspira el medi i es fa un rentat amb 5 mL de D-PBS. S'elimina el D-PBS i s'afegeixen 10 mL de solució salina 1x. A continuació es resuspenen les cèl·lules per acció mecànica de la pipeta i es traspassen a un tub cònic. En el cas d'algunes línies cel·lulars més adherents cal afegir 3 mL tripsina a la placa i deixar actuar 5 minuts a 37°C. Després es recullen les cèl·lules saltades i es traspassen a un tub Falcon, afegint medi de creixement per inhibir l'acció de la tripsina. Es centrifuga durant 5 minuts a 1000G, es descarta per aspiració el sobrenedant i s'afegeixen 3 mL de medi. Es procedeix amb una pipeta a la disgregació mecànica del pellet fins a obtenir una suspensió homogènia. Es sembla en cada placa de 15 cm una dilució variable depenent del dia en què es vulguin utilitzar les cèl·lules, o s'hagin de tornar a passar. S'afegeix a la placa medi de creixement fins a uns 17-18 mL totals i es fan moviments suaus per dispersar les

cèl·lules per tota la placa. Finalment, s'incuba a 37°C i 5% CO₂ fins al seu ús o nou *passage* de manteniment.

2.3.2. Criopreservació: congelació i descongelació de vials

Reactius: Medi de congelació per a línies cel·lulars HEK293: FBS amb 10% de DMSO.

Procediment de congelació: De manera similar al descrit en el manteniment de la línia cel·lular, les cèl·lules de la placa es disgreguen mecànicament amb solució salina, es traspassen a un tub Falcon i es centrifuguen 5 minuts a 1000G. S'elimina el sobrenedant i es resuspèn el precipitat cel·lular en 1 mL de medi de congelació. Ràpidament, es traspassa la suspensió a un criotub de congelació, es diposita en un dipòsit de congelació gradual i es congela a -80°C. L'endemà, es poden extreure els tubs del dipòsit de congelació gradual i emmagatzemar al congelador a -80°C, o amb nitrògen líquid.

Procediment de descongelació: Es descongela el vial de cèl·lules al bany a 37°C i ràpidament es passa el contingut a un tub cònic amb 10 mL de medi de cultiu. Les cèl·lules es precipiten per centrifugació 5 minuts a 1000G, s'elimina el sobrenedant i es resuspenen en 10 mL de medi de creixement. Finalment, es sembren a la placa de 10 cm. Quan les cèl·lules arribin al percentatge desitjat de confluència es realitza el protocol de manteniment.

2.3.3. Introducció de DNA plasmídic en cèl·lules per transfecció

Reactius: Polietilenimina (PEI) 10 mM (PolyScience), NaCl 0,9% (B.Braun). Medi de transfecció: medi DMEM (PAA) sense FBS.

Procediment: El dia anterior a la transfecció es sembren les cèl·lules de manera que en el moment de la transfecció estiguin a una confluència aproximada del 70%. Usualment es realitzen les transfeccions en plaques de 6 pous. Per a la realització de la transfecció en un altre tipus de placa n'hi ha prou amb adequar proporcionalment les quantitats. Per a un pou de placa de 6 pous: es transfecta 6 µg de plàsmid, dissolent el DNA en 200 µl de NaCl 150 mM. En un tub a part es barreja 2,25 µl de PEI 10 mM per cada mg de DNA amb NaCl 150 mM, en un volum final igual que la dilució del DNA. La dilució de PEI s'afegeix poc a poc a la del DNA i s'incuba durant 20 minuts a temperatura ambient, amb la finalitat de formar els complexos PEI-DNA. Posteriorment, s'aspira el medi de cada pou, s'afegeix el medi de transfecció i el volum de DNA/PEI corresponent a cada pou, fins a tenir 750 µl/pou. A continuació, les plaques s'incuben a 37°C i 5% de CO₂ durant 3 hores. Finalment, s'aspira el medi i s'afegeixen 2 mL de medi fresc (complementat amb 10% de

FBS i 1% de P/S) per pou. S'incuba a 37°C i 5% CO₂ durant el temps necessari segons l'experiment.

2.3.4. Cultius primaris de cèl·lules de colon de ratolí

Reactius: SOLUTION 1: Hank's balanced SALT solution (HBSS) sense Ca²⁺ Mg²⁺ 2% glucosa, Amphotericin B 25 ng/mL, Penicil·lina 100 U/mL, Estreptomicina 100 ug/mL. SOLUTION 2; Hank's balanced SALT solution (HBSS) sense Ca²⁺ Mg²⁺, Colagenasa XI 150 U/mL, dispasa I 0,02 mg/mL, 2% BSA, soybean trypsin inhibitor 0,2 mg /mL. SOLUTION 3: Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM), 10% sorbitol, Penicil·lina 100 U/mL, Estreptomicina 100 ug/mL, 5% fetal bovine serum (FBS). SOLUTION 4: Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM), 2% sorbitol. SOLUTION 5 (ECM): DMEM/F-12 (1:1) phenol red free, Insulina 5 µg/mL, 5x10⁻⁸ M dexamethasone, 60 nM selenium, transferrin 5 µg/mL, 5x10⁻⁸ M triiodothyronine, epidermal growth factor (EGF) 10 ng/mL, 20 mM HEPEs, 2 mM glutamina, Penicil·lina 100 U/mL, Estreptomicina 100 ug/mL, 0,2 % D-glucose, 2% FBS; Matrigel (#354234, Bd Biosciences)

Procediment: Per als explants i cultius primaris, es van extreure els intestins de ratolins de 5-10 dies, des de l'inici a l'estómac fins el recte. L'intestí es disposa en una placa de Petri que conté la Solution 1. En aquesta solució mantindrem les mostres fins que s'hagin extret tots el intestins, obrirem longitudinalment els intestins. Un cop oberts tots el intestins, es passen a una nova placa de Petri, amb la Solution 2, on s'inicia la disgregació mecànica, tallant els intestins amb una tisora en fragments de 2-3 mm i després amb bisturí. Posteriorment pipetejar vigorosament (amb una pipeta pasteur de vidre allargada, >2 mm i autoclavada) uns 150 cops aproximadament. Per a la disgregació enzimàtica, els intestins disgregats suspensos en la Solution 2 es deixen 1h a temperatura ambient en agitació (agitador orbital) a temperatura ambient. Després separar les cèl·lules dels fragments de teixit recollint els sobrenadants després de 3 sedimentacions a 1G en Solution 3 i centrifugar el sobrenadant obtingut anteriorment a 120G durant 3 min. Es descarta el sobrenadant i es resuspen el precipitat en Solution 4. Es repeteixen les centrifugacions (5-6 cops) fins a obtenir el sobrenadant transparent i el precipitat ben definit, per resuspendre les cèl·lules en 1 mL de ECM i calcular la concentració i viabilitat de les cèl·lules amb Tripán Blue i cambra de Neubauer. Finalment sembrar les cèl·lules en una placa de 24 pous pretractada amb Matrigel i s'estudia la viabilitat al cap de 7 dies amb Tripán Blue (tinció de cèl·lules mortes) i Neutral Red (tinció de cèl·lules vives).

El protocol per als explants es molt similar. Els intestins es tallen en fragments de 1 mm, i mitjançant dues sedimentacions, es separen les cèl·lules i les petites làmines d'epiteli intestinal

dels fragments més densos. La mostra es centrifuga diverses vegades, i es descarta el sobrenedant (que conté cèl·lules epitelials, cèl·lules no epitelials i debris). El precipitat consisteix predominantment en criptes intactes i petites làmines d'epiteli intestinal (organoids). Finalment les cèl·lules es sembren en plaques de 24 pous pretractades amb Matrigel, a una densitat de 200-300 organoids/cm² i s'estudia la viabilitat al cap de 7 dies amb Tripán Blue (tinció de cèl·lules mortes) i Neutral Red (tinció de cèl·lules vives).

2.4. Vectors virals

La producció de vectors adenovirals s'ha dut a terme en condicions de bioseguretat de nivell 2 (NBS2), seguint el Reglament de Seguretat de la Unitat de Producció de Vectors del CBATEG. Els residus generats durant aquest treball han estat eliminats seguint el procediment corresponent al NSB2.

2.4.1. Generació i titulació de vectors adenovirals

2.4.1.1. Preparació del genoma viral per a la seva transfecció en cèl·lules HEK293

Abans d'iniciar la transfecció, el plàsmid del genoma adenoviral es linealitzava mitjançant la digestió amb PacI, per així eliminar l'origen de replicació plasmídic i el gen de resistència a la Ampicil·lina. Per a això, 100 µg de DNA es digereixen amb 50 U de Pac I en un volum final de 200 µl o/n. A continuació, es precipiten amb 20 µl d'acetat de potassi 3M (pH 5,2) i 550 µl d'etanol absolut i s'incuba a -80°C durant 30 minuts. Seguidament, es centrifuga a 16.000G a 4°C i es descarta el sobrenedant. El pellet de DNA es renta amb etanol al 70% i es deixa assecat durant 15 minuts. Després d'això, el DNA es resuspèn amb aigua milliQ o TE (10mM Tris-HCl / 1mM EDTA, pH = 8) i s'incuba 1 hora a 37°C

2.4.1.2. Transfecció i amplificació dels vectors adenovirals

La transfecció dels vectors virals es realitza amb cèl·lules HEK293 en placa de 6 pous seguint el procediment descrit en l'apartat 2.3.3. A les 72 hores es recullen les cèl·lules i es realitzen 3 cicles de congelació/descongelació per alliberar el virus. Es centrifuga a 1.400G durant 5 minuts i el sobrenedant (anomenat lisat cru) s'utilitza per al següent pas d'amplificació.

El lisat cru procedent de la placa de 6 pous s'utilitza per infectar una placa de 10 cm amb HEK293. Passats uns dies (varia en funció del virus) es detecta l'efecte citopàtic (les cèl·lules deixen d'estar adherides al fons de la placa). En aquest moment es recullen i es fan 3 cicles de

congelació/descongelació. Seguidament, es centrifuguen a 1.400G 5 minuts i el sobrenedant (llisat cru) s'utilitza per al següent pas d'amplificació. Del llisat cru de la placa de 10 cm, s'infecten 3 plaques de 15 cm, i del llisat obtingut d'aquestes, s'infecten 20-40 plaques de 15 cm. El llisat cru d'aquestes plaques s'utilitza per a la purificació del vector viral.

2.4.1.3. Purificació dels vectors adenovirals

Per a la purificació dels adenovirus es realitzen 2 centrifugacions seriadades del llisat cru en gradient de CsCl. La primera centrifugació es realitza amb un gradient discontinu de CsCl. Per a la seva preparació es col·loquen en un tub de centrifugació (Beckman, *centrifuge tubes polyallomer*) 2,5mL de CsCl (concentració: 1,25g / mL) i 2,5mL de CsCl (concentració: 1,4g / mL). A continuació, s'afegeix suaument el llisat cru sobre el gradient fins omplir tot el tub de centrifugació. La centrifugació es realitza amb el rotor Beckman SW32 durant 1 hora i 42 minuts a 174.586G i 18° C. La banda corresponent al virus s'extreu amb una agulla hipodèrmica (B.Braun 100 Sterican 1,20x40 mm 18G 1,5 "). Per a la segona centrifugació, es diposita en el tub de centrifugació 5mL de CsCl a 1,34 g/mL. Sobre ell es diposita amb cura la mostra provinent de la primera centrifugació. Es centrifuga en un rotor Beckman SW40 durant 18 hores a 28.4061G i 18°C. La banda corresponent al virus s'extreu amb una agulla hipodèrmica. Finalment, s'utilitza una columna Sephadex (PD-10 *desalting columns*, Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) per eliminar les restes de CsCl (és tòxic per a les cèl·lules).

2.4.1.4. Titulació dels vectors adenovirals

La titulació dels vectors virals es duu a terme en cèl·lules HEK-293 per dilució límit des 10^{-3} fins 10^{-10} en placa de 96 pous. Es realitzen triplicats per minimitzar l'error. En els vectors portadors del gen GFP, la titulació es realitza en plaques de 96 pous, comptabilitzant les cèl·lules que expressen GFP mitjançant microscòpia de fluorescència (NIKON Inverted Microscope ECLIPSE TS100 / TS100-F). En els vectors portadors del gen β -gal, la titulació es realitza comptabilitzant l'activitat β -gal per colorimetria.

Reactius: Paraformaldehid 2% (PAA, H15-002), PBS, Solució X-Gal: 4 mM potassium hexacyanoferrate II; 4 mM potassium ferricyanide III; 2 mM MgCl; 0,4 mg/mL X-Gal (stock a 40 mg/mL en DMSO).

Procediment: La titulació es duu a terme en plaques de 24 pous. Les cèl·lules es fixen amb 300 μ l de solució de paraformaldehid al 2% en PBS, que es prepara al moment a partir de solució stock

al 37%, i s'incuba a temperatura ambient durant 10 minuts. Després s'aspira el medi de fixació i es realitza un rentat amb 1 mL de PBS. S'afegeix 300 µl de solució de tinció per β-gal i s'incuba a 37°C en un incubador sense CO₂ durant 60 minuts. S'aspira el medi quan es detecta tinció, i es conserva a 4°C en PBS.

2.4.2. Producció dels adenovirus quimera Ad5/40

El protocol de producció dels vectors quimera Ad5/40 ha estat desenvolupat en aquesta tesi, i per això es troba detallat extensament en l'apartat 1.2 de Resultats. Els procediments duts a terme en els experiments amb el virus Ad5/40s (determinació del seu cicle viral i condicions òptimes de producció) s'especifiquen en les pàgines 58-61 d'aquesta tesi. Al sobrenedant se li realitza un tractament amb sulfat amònic per tal de precipitar els adenovirus: s'afegeix 242,3 g de sulfat amònic per cada litre de sobrenedant, s'incuba a temperatura ambient durant 2,5 hores i es precipita centrifugant a 1620G durant 15 minuts a 25°C i es dissol en 20 mL de PBS sense Ca²⁺/Mg² (PAA, H15-002).

2.4.3. Infecció de cèl·lules amb vectors virals

Reactius: medi d'infecció (medi de cultiu habitual amb 2% de FBS)

Procediment: En el cas de cèl·lules adherents, el medi s'aspira i es substitueix per medi d'infecció. A continuació, s'afegeix el corresponent volum de vector viral. El càlcul depèn de les partícules físiques per cèl·lula (PP/cèl·lula), o les unitats infeccioses per cèl·lula (IU/cèl·lula), més conegut com MOI, amb el que es vulgui infectar les cèl·lules (normalment entre MOI=5 i MOI=40).

2.4.4. Extracció de DNA viral desde virus purificat

S'utilitza 10 µl de virus purificat en gradient de CsCl. S'afegeix 7 µl de 10% SDS, 3 µl de 0,5 M EDTA i 20 µl de proteïnasa K (20 mg/mL) (Roche, #31158790001). S'incuba durant 3 h a 55°C en un bany d'aigua. Posteriorment s'escalfa la mostra 5 minuts a 95°C. S'afegeix aigua MiliQ fins arribar a un volum total de 200 µl i s'afegeix 100 µl d'acetat amònic 7,5 M. S'extreu la mescla amb 300 µl de Feno/Cloroform/Isoamil alcohol (25:24:1). Es transfereix la fase superior a un nou tub, evitant entrar en contacte ni aspirar la interfase. S'afegeix 600 µl d'etanol 100% i s'incuba la mostra 30 min a -80°C per precipitar el DNA. Es centrifuga la mostra i es renta amb etanol al 70%. El precipitat es dissol en 50 µl d'aigua MiliQ.

2.4.5. Electroforesis no desnaturalitzant en gel d'agarosa

L'electroforesi no desnaturalitzant, igual que la desnaturalitzant, es fonamenta en la capacitat de mobilització de les partícules amb càrrega després de l'aplicació d'un camp elèctric. No obstant això, l'absència d'un agent desnaturalitzant fa que les proteïnes migren pel gel en funció de més factors a més del pes molecular. La mobilitat en aquest cas depèn de la mida, la conformació que adopti la proteïna i de les càrregues intrínseques, com el punt isoelèctric.

Reactius: Agarosa (p/v) (Amresco). Tampó d'electroforesi TAE 1X: 40 mm tris-acetat, pH = 8,0; 0,1 mm EDTA. Tampó de càrrega 10X: 50% glicerol (v/v) (Panreac), 0,1% Blau de bromofenol (p/v) (Sigma), 0,1% Xileno cianol (p/v). GeneRuler 1Kb DNA Ladder (Fermentas), Bromur d'etidi (Invitrogen).

Procediment: Es prepara un gel d'agarosa 0,8% (p/v) en tampó TAE (1x). Després de la polimerització, s'afegeix TAE (1x) fins a cobrir el gel. A continuació, es carreguen les mostres de virus en els pous juntament amb tampó de càrrega i s'aplica un corrent d'60-110V el temps necessari per a la separació dels fragments de DNA. Es submergeix el gel en una solució de Bromur d'etidi (6 µg/mL en TAE) durant 15 minuts i finalment es visualitza mitjançant llum UV en un transiluminador (Syngene).

2.4.6. Microscòpia electrònica de partícules adenovirals

Procediment: La microscòpia electrònica va ser realitzada pel servei de microscòpia electrònica de la UAB. Les mostres de virus (aproximadament 0,1 mg proteïna/mL) es van aplicar a una superfície de carboni en mica i es van tenyir negativament amb 2% de molibdat d'amoni, pH=7,4. Les fotografies es van prendre en condicions de baixa dosis amb el microscopi Tem Jeol 2011 a 100 kV.

2.4.7. Anàlisi de tropisme in vitro dels vectors quimèrics

Reactius: medi d'infecció medi de cultiu habitual amb 2% de FBS

Procediment: Les cèl·lules es sembren en plaques de 24 pous (3×10^5 cèl·lules/pou) i al cap de 24 hores es transfecten (125 PP/cèl·lula) amb els diferents vectors (Ad5, F/40SL, F/40S, F540 i F/405). 24 hores després s'analitza l'expressió de β -galactosidasa per luminometria).

2.4.8. Producció d'adenovirus marcats radioactivament

Reactius: L-metionina-free-a-MEM; 2 mCi de 35S-metionina; DMEM amb 10% de FBS

Procediment: S'infecten 10 plaques de 15 cm amb el vectors (Ad5, F/40S o F/540) amb 100 PP/cèl·lula. Al cap de 6 hores, s'aspira el medi i afegim 10 mL de medi L-metionina-free-a-MEM i 2 mCi de 35S-metionina, i 6 hores més tard, s'afegeix 10 mL de medi complet (DMEM +10%FBS). Els vectors es recullen a les 40 hores post-infecció (48 hores pels adenovirus quimèrics) i es purifiquen de manera habitual.

2.4.9. Anàlisi de la cinètica d'unió del virus a la membrana cel·lular (Binding)

Per fer el seguiment de la cinètica d'unió del virus a la membrana cel·lular, es deixa que els virus entrin en contacte amb les cèl·lules a 4°C, ja que a aquesta temperatura els virus s'uneixen al receptor però no es produeix l'entrada a la cèl·lula. A diferents temps, mitjançant un xoc tèrmic, es permet l'entrada simultània de tots els virus units al receptor al mateix temps, i posteriorment s'analitzen les cèl·lules

Reactius: medi d'infecció medi de cultiu habitual amb 2% de FBS

Procediment: El dia anterior es sembren plaques de 6 pous pretractades amb col·lagen amb HEK293. Es prepara una dilució del virus per a obtenir una MOI=5 en cada pou. Al inici de l'experiment, es canvia el medi de les plaques per medi a 4°C i es deixa refredar-les 15 min en a 4°C. Llavors s'aspira el medi i afegim la dilució del virus preparada anteriorment a 4°C. Es deixen les plaques a 4°C i a cada temps, es retira la placa corresponent de la nevera, s'aspira el medi amb el virus i s'afegeix el medi d'infecció (2% FBS) a 37°C. Incubar la placa a 37°C en un incubador de CO2 durant 24-48h (segons el virus) i analitzem la radioactivitat.

2.4.10. Determinació del cicle viral

Procediment: El cicle cel·lular dels vectors quimèrics es va estudiar en plaques de pous amb una MOI=1 utilitzant els adenovirus Ad5GFP, Ad5β-gal i F/40S. Es van recollir mostres des de les 10 hores fins a les 72 hores cada 4 hores, ja que la producció de virions abans de les 24 hores es nul·la o molt baixa. A cada temps es recull el sobrenedant, i s'afegeixen 500 µl de medi per recollir les cèl·lules. D'aquesta manera podem quantificar per separat el virus extracel·lular de l'intracel·lular. Es realitzen 3 cicles de congelació/descongelació per alliberar el virus intracel·lular. Es titula cada fracció.

2.4.11. Anàlisi de la resistència a pH àcid

Procediment: Per estudiar l'efecte de l'exposició al pH àcid en la viabilitat dels adenovirus quimèrics s'utilitzen cèl·lules HEK293 en plaques de 24 pous pre-tractades amb col·lagen al 80% de confluència.

En un eppendorf es diposita un 1 µl d'una solució del virus en aigua MiliQ a una concentració de $1,2 \times 10^5$ IU/µl. Després de fer un pols de centrifuga, s'afegeix 50 µl de la solució amb el pH que li pertoqui (HCl en aigua MiliQ a pH=2, HCl en aigua MQ a pH=4, medi d'infecció a pH=7). Els virus s'incuben en un bany a 37°C durant 3, 10 o 30 minuts. Passat aquests temps, s'afegeix 1'5 mL de medi d'infecció per tal de neutralitzar el pH àcid. De cada mostra es sembren 3 pous en una placa de 24 pous amb 500 µl, infectant les cèl·lules amb una MOI=0,2. Abans de finalitzar un cicle viral, les cèl·lules infectades s'analitzaven per luminometria (24 hores pels Ad5 i 40 hores pels Ad5/40 quimèrics), utilitzant el kit *Galacto-Light Plus™ beta-Galactosidase Reporter Gene Assay System* (Tropix, T1011).

Per l'anàlisi amb **luminometria**, s'aspira el medi de les plaques de 24 pous infectades, s'afegeix 100 µl de *Lysis Solution* i es congelen a -80°C. Es descongelen a temperatura ambient i de cada pou es pipeteja 8 µl en una placa blanca de 96 pous per luminometria. Posteriorment es prepara una dilució 1/100 de *GALACTON-Plus* en *Galacto Reaction Buffer Diluent*, es dispensen 100 µl d'aquesta solució en cada pou i es protegeix la placa de 96 pous blanca de la llum. Al cap de 1 hora, es procedeix a mesurar l'activitat de la β-gal en el luminòmetre Luminoskan RS (Labsystems), on s'afegeix 100 µl d'*Accelerator II*. El luminòmetre mesura la intensitat de la llum en unitats relatives de luminiscència (RLU), que correspon directament a l'activitat de l'enzim β-galactosidasa, i per tant és proporcional a la capacitat infectiva dels virus. Les condicions de lectura són 3 segons en mode Normal.

2.4.12. Anàlisi de la resistència a proteases

Reactius: SGF (USP): 7 mL 1N HCl, 2 g de NaCl, i pepsina 3.3 g/litre en 1 L de ddH₂O, pH 1.5.
Medi d'infecció: medi de cultiu habitual amb 2% de FBS

Procediment: El Simulated Gastric Fluid (SGF) es va preparar seguint el protocol de la United States Pharmacopeia (USP). Els vectors Ad5 i F/40S (MOI=1 1×10^7 IU/mL) s'incuben amb SGF durant 3 hores a 37 °C. A cada temps (de 0 a 180 min), s'agafen 15 µl de la mescla, es barregen amb 485 µl de DMEM amb 2% de FBS i s'infecten les cèl·lules que prèviament s'havien sembrat

en plaques de 24 pous fins al 80% de confluència. Al cap de 24 hores després s'analitza l'expressió de β -galactosidasa per luminometria.

2.4.13. Infecció de cèl·lules SKOV-3 amb adenovirus incubats amb Factor X

Reactius: SKOV-3 (ECACC; #91091004), McCoy's 5A (Invitrogen, 26600-023)+ 2mM de glutamina+15% de FBS, Factor X (Haematologic Technologies Inc., HCX-0050); paraformaldehid 2%

Procediment: Les cèl·lules es van créixer en plaques de 24 pous fins al 80% de confluència. Els vectors Ad5 i F/40S (100 PP/cèl·lula) es van incubar en medi sense FBS amb Factor X (8 μ g/mL) durant 3 hores a 37 °C. A les 24 hores les cèl·lules es van fixar amb paraformaldehid 2% es va analitzar l'expressió del transgen FACS (FACSCanto, Servei de Cultius Cel·lulars, Producció d'Anticossos i Citometria de la UAB).

2.4.14. Anàlisi de l'expressió de GFP per citometria de flux

Reactius: Citòmetre de flux (BD FACSCanto, BD FACSDiva 5.0 software), D-PBS, Paraformaldehid 2%.

Procediment: Les cèl·lules es centrifuguen 5 minuts a 200G i es resuspenen amb paraformaldehid al 2%. Es deixa actuar 3-5 minuts. A continuació, es tornen a centrifugar i es resuspenen amb D-PBS. Les mostres cel·lulars es mantenen a 2-8°C fins a la seva anàlisi per citometria de flux (mitjançant un FACSCanto, del Servei de Cultius Cel·lulars, Producció d'Anticossos i Citometria de la UAB), que analitzarà el percentatge de cèl·lules positives per GFP en cada condició.

2.5. Tècniques d'experimentació animal

Els experiments amb animals s'han dut a terme a l'Estabulari de la Universitat Autònoma de Barcelona, seguint el protocol aprovat pel CEEAH de la UAB.

2.5.1. Estudis de biodistribució d'adenovirus en ratolins sans

Reactius: ratolins CD1 femelles de 8-10 setmanes; sèrum fisiològic; Paraformaldehid 2%.

Procediment: Es van utilitzar ratolins CD1 femelles de 8-10 setmanes d'edat (26-28 g de pes corporal), sanes. Es van analitzar grups de 4-5 animals i se'ls va administrar els diferents vectors virals (Ad5, F/40SL, F/40S, F/540, F/405) per via oral, rectal o intravenosa (amb un volum final de 200 μ l complementat amb sèrum fisiològic).

Administració intravenosa: En la via intravenosa s'introdueix per la vena de la cua 200 µl de volum en 5-10 segons, prèvia exposició dels animals a un llum infraroig per facilitar la visualització dels vasos sanguinis. Els ratolins no s'anestesien i es recuperen ràpidament.

Administració oral: En la via oral, mitjançant l'ús d'una sonda metàl·lica intragàstrica per ratolí, s'administren 200 µl de volum. Prèviament els ratolins han de estar en dejú 6h per disminuir les possibles interferències del contingut gàstric. Els ratolins no s'anestesien i es recuperen ràpidament.

Administració rectal: Prèviament a l'administració rectal, els ratolins van estar en dejú durant 6 h i se'ls va inocular un enema de solució salina (1 mL) per via rectal. S'espera 30 minuts per a que els ratolins eliminin el contingut rectal. Per poder realitzar l'administració per aquesta via, els ratolins són primer anestesiats per injecció intraperitoneal d'una solució Ketamina 1% (Imalgene 1000, Merial Laboratorios S.A.) + Xylacina 0.1% (Rompun 2%, Bayer) (55mg/kg:15mg/kg; volum d'injecció 10 mL/kg) i posteriorment s'administren 200 µl de PBS o de la solució viral. Els ratolins es col·loquen durant 30 minuts en posició invertida inclinats sobre una manta calefactora (posició de Trendelenburg) per afavorir la retenció del volum inoculat. S'espera a que es despertin i es comprova que el seu estat sigui normal abans de retornar-los a la gàbia.

Eutanàsia: Al cap de 3 dies de l'administració es procedeix a l'eutanàsia dels animals. Els ratolins s'anestesien per inhalació (halotà o isoflurano), se'ls extreu la sang per punció intracardíaca i s'extreuen 15 òrgans d'interès per fer l'estudi de biodistribució (fetge, pulmó, melsa, intestí proximal, intestí distal, estómac, esòfag, pàncreas, úter, ovari, múscle, ronyó, cor, tràquea, colon). Els òrgans es fixen en formol per als estudis d'histologia, immunohistoquímica i immunofluorescència, o bé es congelen immediatament en gel sec més etanol per als estudis de luminometria.

2.5.2. Estudis de biodistribució d'adeno-associats en ratolins sans

Reactius: ratolins CD1 femelles de 8-10 setmanes; sèrum fisiològic; Paraformaldehid 2%.

Procediment: Es van utilitzar ratolins CD1 femelles sanes de 8-10 setmanes d'edat (n=5) i vectors adeno-associats AAV2 i AAV8 amb una dosi de 10^{11} vg/ratolí. A cada grup se li va administrar els diferents vectors virals (AAV2 i AAV8) o PBS per via rectal (veure 2.5.1) amb un volum final de 200 µl complementat amb sèrum fisiològic. Al cap de 7 dies (curt termini) o 1 mes (llarg termini) de l'administració es procedeix a l'eutanàsia dels animals. Els ratolins s'anestesien per inhalació

(halotano o isofluotano), se'ls extreu la sang per punció intracardíaca i s'extreuen els òrgans d'interès per fer l'estudi de biodistribució (fetge, melsa, còlon proximal, còlon medial i còlon distal). Els òrgans es fixen en formol per als estudis d'histologia, immunohistoquímica i immunofluorescència, o be es congelen immediatament en gel sec més etanol per als estudis de luminometria.

2.5.3. Estudis de biodistribució d'adenovirus en model murí de colitis induïda

Reactius: ratolins C57BL/6J; mascles de 5-6 mesos; DSS 4% (Dextran Sulphate Sodium 36-50kD, Biomedicals); sèrum fisiològic; Paraformaldehid 2%.

Dels vectors Ad5 β -gal i F/40S s'administrà una dosi de 3×10^8 IU per animal en grups de 5 ratolins.

Procediment: Es van analitzar grups de 5 animals i se'ls va administrar els diferents vectors virals (Ad5, F/40S) per via rectal o intravenosa (veure 2.5.1), amb un volum final de 200 μ l complementat amb sèrum fisiològic. Per a la inducció de colitis es van utilitzar ratolins C57BL/6J de 5-6 mesos. Se'ls va administrar 4% de DSS (dextran sulphate Sodium 36-50kD, Biomedicals) a l'aigua durant 5 dies consecutius. La solució de DSS es va preparar cada dos dies. Les característiques d'aquest model són la pèrdua de pes, mucositat rectal, diarrea i excrements sanguinolents. A més s'observen canvis en el comportament i l'aspecte extern dels animals. Per a la seva avaluació es va realitzar un seguiment diari de la ingesta d'aigua i menjar, així com del pes dels animals.

2.5.4. Extracció del material cel·lular i anàlisi per luminometria

Els òrgans extrets s'emmagatzemen a -80°C fins al seu processament, moment en que es talla un fragment de 5-10 mm de cada òrgan. Es realitza una disgregació mecànica en 100 μ l de *Lysis Solution* del kit *Galacto-Light Plus™ beta-Galactosidase Reporter Gene Assay System* (Tropix, T1011), fins obtenir un homogenat i es sotmeten a un cicle de congelació/descongelació per facilitar l'alliberació del contingut citoplasmàtic. Es descongelen a temperatura ambient i de cada pou es pipetegen 8 μ l en una placa blanca de 96 pous per luminometria. Posteriorment es prepara una dilució 1:100 de *GALACTON-Plus* en *Galacto Reaction Buffer Diluent*, es dispensen 100 μ l d'aquesta solució en cada pou i es protegeix la placa de 96 pous blanca de la llum. Al cap de 1 hora, es procedeix a mesurar l'activitat de la β -gal en el luminòmetre Luminoskan RS (Labsystems), on s'afegeix 100 μ l d'*Accelerator II*. El luminòmetre mesura la intensitat de la llum en unitats relatives de luminiscència (RLU), que correspon directament a l'activitat de l'enzim β -

galactosidasa, proporcional a la capacitat infectiva dels virus. Les condicions de lectura són 10 segons en estat High.

2.5.5. Estudis histopatològics

2.5.5.1. Hematoxilina-eosina (HE)

Els diferents òrgans dels experiments de biodistribució van ser tenyits amb la tècnica de Hematoxilina-Eosina. Per a això, un cop deshidratades les mostres amb dilucions decreixents d'etanol, van ser submergides en solució d'hematoxilina de Harris (Sigma) durant 5 minuts. A continuació, es va realitzar el viratge mitjançant 4 minuts en aigua corrent. Seguidament, es va procedir a la tinció amb eosina alcohòlica durant 30 segons. Finalment, les mostres van ser deshidrates amb dilucions ascendents d'etanol, es van aclarir amb xilol, i es van muntar amb DPX.

Les tincions de HE i la anàlisi immunohistoquímica van ser analitzades la Dra. Ester Fernández i la Dr. Carolina Romero de la Unitat de Fisiologia de la Universitat Autònoma de Barcelona.

2.5.5.2. *Immunohistoquímica*

Es van realitzar els següents marcatges immunohistoquímics (Taula 21):

Taula 21. Anticossos utilitzats en immunohistoquímica

ANTICUERPO PRIMARIO	MARCATGE	CASA COMERCIAL	REFERENCIA	ANTICUERPO SECUNDARIO
Anti β -galactosidasa	β -galactosidasa	Abcam	Ab616-1	Goat (Pierce, #31820)
Anti Somastatina	Cèl·lules enteroendocrines	Chemicon	AB5494	Goat (Santa Cruz, sc-2040)
Anti CD68	Macròfags	Santa Cruz	Sc-9139	Goat (Santa Cruz, sc-2040)

Es parteix de mostres d'intestí prim, colon, fetge, melsa, ronyó i pulmó prèviament fixades e incloses en parafina. Es fon la parafina a 60°C durant 15 minuts i es rehidraten en una successió decreixent d'alcohols (100%, 96%, 80%, 70% 50%), S'afegeix tampó citrat sòdic 10 mM (pH=6) en ebullició per reactivar la capacitat antigènica de les proteïnes. Després dels rentats amb PBS s'afegeix aigua oxigenada 30% en metanol per neutralitzar les peroxidases endògenes, i el complex avidina/biotina (de Vector) tot seguit d'un bloqueig amb sèrum de cabra al 4% en PBT (tampó salí fosfat + Tritò x100) més Tween 20 al 0,2%. S'incorpora l'anticòs primari policlonal obtingut en conill per a la β -gal de ratolí (abcam, ab616-1) (dilució 1:900) i es manté tota la nit en refrigeració a 4°C en una cambra humida. Posteriorment, i després de dos rentats amb PBS,

s'afegeix l'anticòs secundari biotinilat anti.IgG de ratolí obtingut en cabra (Pierce, #31820) (dilució 1:200) durant 2'5h a 37° C. Després d'incubar les mostres amb el reactiu Vectastain ABC Elite (PK-6100, Vector) durant 30 minuts a 37°C es va procedir a revelar amb DAB (Diaminobencidina, Vector) i a contra tenyir amb hematoxilina (1 segon) previs a la deshidratació (seqüència inversa a la descrita anteriorment).

2.5.6. Anàlisi fluorescència

Una vegada obtinguts els talls dels diferents teixits en silane, es procedeix a la seva rehidratació-deshidratació i muntatge en medi DPX, per a la posterior visualització al microscopi de fluorescència i confocal Leica Microsystems Heidelberg GmbH (estimulació 488 nm, emissió 500-600 nm). La observació dels talls dels diferents òrgans a permetre detectar les àrees i les cèl·lules transfectades pels virus amb GFP.

2.5.7. Anàlisi estadístic

Els resultats per als experiments *in vivo* s'expressen com la mitjana dels valors obtinguts \pm l'error estàndard de la mitjana ($SEM = SD \text{ (desviació estàndard)}/\sqrt{(n)}$). Les diferències entre grups es van analitzar bé per T-student o bé per ANOVA amb un test post-test . En tots els casos, les diferències per a valors de $p < 0,05$ es van considerar estadísticament significatives. Les anàlisis van ser realitzats amb el programa G-Stat 2.0 i Prism 5.04 per a Windows.

BIBLIOGRAFIA

Alba, R., Hearing, P., Bosch, A., and Chillon, M. (2007). Differential amplification of adenovirus vectors by flanking the packaging signal with attB/attP-PhiC31 sequences: implications for helper-dependent adenovirus production. *Virology* 367, 51–58.

Albinsson, B., and Kidd, A.H. (1999). Adenovirus type 41 lacks an RGD alpha(v)-integrin binding motif on the penton base and undergoes delayed uptake in A549 cells. *Virus Res.* 64, 125–136.

Amalfitano, A., Hauser, M.A., Hu, H., Serra, D., Begy, C.R., and Chamberlain, J.S. (1998). Production and characterization of improved adenovirus vectors with the E1, E2b, and E3 genes deleted. *J. Virol.* 72, 926–933.

Anderson, C.W. (1990). The proteinase polypeptide of adenovirus serotype 2 virions. *Virology* 177, 259–272.

Anderson, C.A., Boucher, G., Lees, C.W., Franke, A., D'Amato, M., Taylor, K.D., Lee, J.C., Goyette, P., Imielinski, M., Latiano, A., et al. (2011). Meta-analysis identifies 29 additional ulcerative colitis risk loci, increasing the number of confirmed associations to 47. *Nat. Genet.* 43, 246–252.

Anderson, C.W., Baum, P.R., and Gesteland, R.F. (1973). Processing of adenovirus 2-induced proteins. *J. Virol.* 12, 241–252.

Apparailly, F., Millet, V., Noël, D., Jacquet, C., Sany, J., and Jorgensen, C. (2002). Tetracycline-inducible interleukin-10 gene transfer mediated by an adeno-associated virus: application to experimental arthritis. *Hum. Gene Ther.* 13, 1179–1188.

Ardizzone, S., and Bianchi Porro, G. (2002). Comparative tolerability of therapies for ulcerative colitis. *Drug Saf.* 25, 561–582.

Armentano, D., Zabner, J., Sacks, C., Sookdeo, C.C., Smith, M.P., St George, J.A., Wadsworth, S.C., Smith, A.E., and Gregory, R.J. (1997). Effect of the E4 region on the persistence of transgene expression from adenovirus vectors. *J. Virol.* 71, 2408–2416.

Bai, M., Campisi, L., and Freimuth, P. (1994). Vitronectin receptor antibodies inhibit infection of HeLa and A549 cells by adenovirus type 12 but not by adenovirus type 2. *J. Virol.* 68, 5925–5932.

Balazs, A.B., Chen, J., Hong, C.M., Rao, D.S., Yang, L., and Baltimore, D. (2012). Antibody-based protection against HIV infection by vectored immunoprophylaxis. *Nature* 481, 81–84.

Bamias, G., Marini, M., Moskaluk, C.A., Odashima, M., Ross, W.G., Rivera-Nieves, J., and Cominelli, F. (2002). Down-regulation of intestinal lymphocyte activation and Th1 cytokine production by antibiotic therapy in a murine model of Crohn's disease. *J. Immunol.* 169, 5308–5314.

Bansal, P., and Sonnenberg, A. (1996). Risk factors of colorectal cancer in inflammatory bowel disease. *Am. J. Gastroenterol.* 91, 44–48.

Barbara, G., Xing, Z., Hogaboam, C.M., Gauldie, J., and Collins, S.M. (2000). Interleukin 10 gene transfer prevents experimental colitis in rats. *Gut* 46, 344–349.

- Barnett, B.G., Crews, C.J., and Douglas, J.T. (2002). Targeted adenoviral vectors. *Biochim. Biophys. Acta* 1575, 1–14.
- Berrebi, D., Besnard, M., Fromont-Hankard, G., Paris, R., Mougenot, J.F., De Lagausie, P., Emilie, D., Cezard, J.P., Navarro, J., and Peuchmaur, M. (1998). Interleukin-12 expression is focally enhanced in the gastric mucosa of pediatric patients with Crohn's disease. *Am. J. Pathol.* 152, 667–672.
- Boirivant, M., Fuss, I.J., Chu, A., and Strober, W. (1998). Oxazolone colitis: A murine model of T helper cell type 2 colitis treatable with antibodies to interleukin 4. *J. Exp. Med.* 188, 1929–1939.
- Bongartz, T., Sutton, A.J., Sweeting, M.J., Buchan, I., Matteson, E.L., and Montori, V. (2006). Anti-TNF antibody therapy in rheumatoid arthritis and the risk of serious infections and malignancies: systematic review and meta-analysis of rare harmful effects in randomized controlled trials. *JAMA* 295, 2275–2285.
- Bongianino, R., and Priori, S.G. (2015). Gene therapy to treat cardiac arrhythmias. *Nat. Rev. Cardiol. advance on.*
- Bosani, M., Ardizzone, S., and Porro, G.B. (2014). Biologic targeting in the treatment of inflammatory bowel diseases [Retraction]. *Biologics* 3, 39.
- Brodi, S.L., and Crystal, R.G. (1994). Adenovirus-Mediated in Vivo Gene Transfer. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 716, 90–103.
- Brown, M. (1985). Selection of nonfastidious adenovirus species in 293 cells inoculated with stool specimens containing adenovirus 40. *J. Clin. Microbiol.* 22, 205–209.
- Brunetti-Pierri, N., Palmer, D.J., Beaudet, A.L., Carey, K.D., Finegold, M., and Ng, P. (2004). Acute toxicity after high-dose systemic injection of helper-dependent adenoviral vectors into nonhuman primates. *Hum. Gene Ther.* 15, 35–46.
- Brunetti-Pierri, N., Nichols, T.C., McCorquodale, S., Merricks, E., Palmer, D.J., Beaudet, A.L., and Ng, P. (2005). Sustained phenotypic correction of canine hemophilia B after systemic administration of helper-dependent adenoviral vector. *Hum. Gene Ther.* 16, 811–820.
- Bukrinsky, M.I., and Haffar, O.K. (1999). HIV-1 nuclear import: in search of a leader. *Front. Biosci.* 4, D772–D781.
- Burisch, J., Jess, T., Martinato, M., and Lakatos, P.L. (2013). The burden of inflammatory bowel disease in Europe. *J. Crohns. Colitis* 7, 322–337.
- Cantorna, M.T., Munsick, C., Bemiss, C., and Mahon, B.D. (2000). 1,25-Dihydroxycholecalciferol prevents and ameliorates symptoms of experimental murine inflammatory bowel disease. *J. Nutr.* 130, 2648–2652.
- Cascallo, M., Alonso, M.M., Rojas, J.J., Perez-Gimenez, A., Fueyo, J., and Alemany, R. (2007). Systemic toxicity-efficacy profile of ICOVIR-5, a potent and selective oncolytic adenovirus based on the pRB pathway. *Mol. Ther.* 15, 1607–1615.

- Cavanaugh, J. (2001). International collaboration provides convincing linkage replication in complex disease through analysis of a large pooled data set: Crohn disease and chromosome 16. *Am. J. Hum. Genet.* 68, 1165–1171.
- Chang, A.G., and Wu, G.Y. (1994). Gene therapy: applications to the treatment of gastrointestinal and liver diseases. *Gastroenterology* 106, 1076–1084.
- Chartier, C., Degryse, E., Gantzer, M., Dieterle, A., Pavirani, A., and Mehtali, M. (1996). Efficient generation of recombinant adenovirus vectors by homologous recombination in *Escherichia coli*. *J. Virol.* 70, 4805–4810.
- Cheng, H., and Leblond, C.P. (1974). Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. V. Unitarian Theory of the origin of the four epithelial cell types. *Am. J. Anat.* 141, 537–561.
- Cheng, D.Y., Kolls, J.K., Lei, D., and Noel, R.A. (1997). In vivo and in vitro gene transfer and expression in rat intestinal epithelial cells by E1-deleted adenoviral vector. *Hum. Gene Ther.* 8, 755–764.
- Chillon, M., and Alemany, R. (2011). Methods to construct recombinant adenovirus vectors. *Methods Mol. Biol.* 737, 117–138.
- Chillon, M., Bosch, A., Zabner, J., Law, L., Armentano, D., Welsh, M.J., and Davidson, B.L. (1999). Group D adenoviruses infect primary central nervous system cells more efficiently than those from group C. *J. Virol.* 73, 2537–2540.
- Cho, J.H., Nicolae, D.L., Gold, L.H., Fields, C.T., LaBuda, M.C., Rohal, P.M., Pickles, M.R., Qin, L., Fu, Y., Mann, J.S., et al. (1998). Identification of novel susceptibility loci for inflammatory bowel disease on chromosomes 1p, 3q, and 4q: evidence for epistasis between 1p and IBD1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 7502–7507.
- Chroboczek, J., Ruigrok, R.W., and Cusack, S. (1995). Adenovirus fiber. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 199 (Pt 1, 163–200.
- Cong, Y., Brandwein, S.L., McCabe, R.P., Lazenby, A., Birkenmeier, E.H., Sundberg, J.P., and Elson, C.O. (1998). CD4⁺ T cells reactive to enteric bacterial antigens in spontaneously colitic C3H/HeJBir mice: increased T helper cell type 1 response and ability to transfer disease. *J. Exp. Med.* 187, 855–864.
- Crosnier, C., Stamatakis, D., and Lewis, J. (2006). Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control. *Nat. Rev. Genet.* 7, 349–359.
- Croyle, M. a, Stone, M., Amidon, G.L., and Roessler, B.J. (1998). In vitro and in vivo assessment of adenovirus 41 as a vector for gene delivery to the intestine. *Gene Ther.* 5, 645–654.
- D'Halluin, J.C. (1995). Virus assembly. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 199 (Pt 1, 47–66.
- Danthinne, X., and Imperiale, M.J. (2000). Production of first generation adenovirus vectors: a review. *Gene Ther.* 7, 1707–1714.

Devaux, C., Caillet-Boudin, M.L., Jacrot, B., and Boulanger, P. (1987). Crystallization, enzymatic cleavage, and the polarity of the adenovirus type 2 fiber. *Virology* 161, 121–128.

Diaconu, I., Denby, L., Pesonen, S., Cerullo, V., Bauerschmitz, G.J., Guse, K., Rajceki, M., Dias, J.D., Taari, K., Kanerva, A., et al. (2009). Serotype Chimeric and Fiber-Mutated Adenovirus Ad5/19p-HIT for Targeting Renal Cancer and Untargeting the Liver. *Hum. Gene Ther.* 20, 611–620.

Dombal FT, M.J., Bouchier IAD, Watkinson G, S.A. (1993). OMGE Research Committee Team. Definitions and descriptions of inflammatory bowel disease.

During, M.J., Xu, R., Young, D., Kaplitt, M.G., Sherwin, R.S., and Leone, P. (1998). Peroral gene therapy of lactose intolerance using an adeno-associated virus vector. *Nat. Med.* 4, 1131–1135.

Edvardsson, B., Everitt, E., Jörnvall, H., Prage, L., and Philipson, L. (1976). Intermediates in adenovirus assembly. *J. Virol.* 19, 533–547.

Einfeld, D.A., Schroeder, R., Roelvink, P.W., Lizonova, A., King, C.R., Kovesdi, I., and Wickham, T.J. (2001). Reducing the Native Tropism of Adenovirus Vectors Requires Removal of both CAR and Integrin Interactions. 75, 11284–11291.

Elson, C.O., Sartor, R.B., Tennyson, G.S., and Riddell, R.H. (1995). Experimental models of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 109, 1344–1367.

Fallaux, F.J., Bout, A., van der Velde, I., van den Wollenberg, D.J., Hehir, K.M., Keegan, J., Auger, C., Cramer, S.J., van Ormondt, H., van der Eb, A.J., et al. (1998). New helper cells and matched early region 1-deleted adenovirus vectors prevent generation of replication-competent adenoviruses. *Hum. Gene Ther.* 9, 1909–1917.

Farrokhyar, F., Swarbrick, E.T., and Irvine, E.J. (2001). A critical review of epidemiological studies in inflammatory bowel disease. *Scand. J. Gastroenterol.* 36, 2–15.

Favier, A.L., Burmeister, W.P., and Chroboczek, J. (2004). Unique physicochemical properties of human enteric Ad41 responsible for its survival and replication in the gastrointestinal tract. *Virology* 322, 93–104.

Favier, A.-L., Schoehn, G., Jaquinod, M., Harsi, C., and Chroboczek, J. (2002). Structural studies of human enteric adenovirus type 41. *Virology* 293, 75–85.

Fehse, B., and Roeder, I. (2008). Insertional mutagenesis and clonal dominance: biological and statistical considerations. *Gene Ther.* 15, 143–153.

Feng, T., Qin, H., Wang, L., Benveniste, E.N., Elson, C.O., and Cong, Y. (2011). Th17 cells induce colitis and promote Th1 cell responses through IL-17 induction of innate IL-12 and IL-23 production. *J. Immunol.* 186, 6313–6318.

Fields, B. (2007). *Fields virology* (Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins).

Foreman, P.K., Wainwright, M.J., Aliche, B., Kovesdi, I., Wickham, T.J., Smith, J.G., Meier-Davis, S., Fix, J.A., Daddona, P., Gardner, P., et al. (1998). Adenovirus-Mediated Transduction of Intestinal Cells In Vivo. *Hum. Gene Ther.* 9, 1313–1321.

Franchimont, D. (2004). Deficient host-bacteria interactions in inflammatory bowel disease? The toll-like receptor (TLR)-4 Asp299gly polymorphism is associated with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Gut* 53, 987–992.

Franke, A., McGovern, D.P.B., Barrett, J.C., Wang, K., Radford-Smith, G.L., Ahmad, T., Lees, C.W., Balschun, T., Lee, J., Roberts, R., et al. (2010). Genome-wide meta-analysis increases to 71 the number of confirmed Crohn's disease susceptibility loci. *Nat. Genet.* 42, 1118–1125.

Gall, J., Kass-Eisler, a, Leinwand, L., and 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.

Gálvez, J. (2014). Role of Th17 Cells in the Pathogenesis of Human IBD. *ISRN Inflamm.* 2014, 928461.

Gassull, M.A., Gomollon, F., Hinojosa, J., and Obrador, A. (2007). Una visión integrada de la fisiopatología de la enfermedad inflamatoria intestinal (Edn Aran).

Gent, A.E., Hellier, M.D., Grace, R.H., Swarbrick, E.T., and Coggon, D. (1994). Inflammatory bowel disease and domestic hygiene in infancy. *Lancet* 343, 766–767.

Glasgow, J.N., Kremer, E.J., Hemminki, A., Siegal, G.P., Douglas, J.T., and Curiel, D.T. (2004). An adenovirus vector with a chimeric fiber derived from canine adenovirus type 2 displays novel tropism. *Virology* 324, 103–116.

Graham, F.L., and van der Eb, A.J. (1973). A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* 52, 456–467.

Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C., and Nairn, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* 36, 59–72.

Gratz, R., Becker, S., Sokolowski, N., Schumann, M., Bass, D., and Malnick, S.D.H. (2002). Murine monoclonal anti-tNF antibody administration has a beneficial effect on inflammatory bowel disease that develops in IL-10 knockout mice. *Dig. Dis. Sci.* 47, 1723–1727.

Green, N.M., Wrigley, N.G., Russell, W.C., Martin, S.R., and McLachlan, A.D. (1983). Evidence for a repeating cross-beta sheet structure in the adenovirus fibre. *EMBO J.* 2, 1357–1365.

Guo, X., Deng, Y., Chen, H., Lan, J., Wang, W., Zou, X., Hung, T., Lu, Z., and Tan, W. (2015). Systemic and mucosal immunity in mice elicited by a single immunization with human adenovirus type 5 or 41 vector-based vaccines carrying the spike protein of Middle East respiratory syndrome coronavirus. *Immunology* 145, 476–484.

Hall, P.A., Coates, P.J., Ansari, B., and Hopwood, D. (1994). Regulation of cell number in the mammalian gastrointestinal tract: the importance of apoptosis. *J. Cell Sci.* 107 (Pt 1, 3569–3577.

Hampe, J., Schreiber, S., Shaw, S.H., Lau, K.F., Bridger, S., Macpherson, A.J., Cardon, L.R., Sakul, H., Harris, T.J., Buckler, A., et al. (1999). A genomewide analysis provides evidence for novel linkages in inflammatory bowel disease in a large European cohort. *Am. J. Hum. Genet.* *64*, 808–816.

Hanauer, S.B., and Sandborn, W. (2001). Management of Crohn's disease in adults. *Am. J. Gastroenterol.* *96*, 635–643.

Hartmann, G., Bidlingmaier, C., Siegmund, B., Albrich, S., Schulze, J., Tschoep, K., Eigler, A., Lehr, H.A., and Endres, S. (2000). Specific type IV phosphodiesterase inhibitor rolipram mitigates experimental colitis in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *292*, 22–30.

Hashimoto, S., Sakakibara, N., Kumai, H., Nakai, M., Sakuma, S., Chiba, S., and Fujinaga, K. (1991). Fastidious human adenovirus type 40 can propagate efficiently and produce plaques on a human cell line, A549, derived from lung carcinoma. *J. Virol.* *65*, 2429–2435.

Hay, R.T., Freeman, A., Leith, I., Monaghan, A., and Webster, A. (1995). Molecular interactions during adenovirus DNA replication. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* *199 (Pt 2)*, 31–48.

He, T.C., Zhou, S., da Costa, L.T., Yu, J., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1998). A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *95*, 2509–2514.

Hearing, P., Samulski, R.J., Wishart, W.L., and Shenk, T. (1987). Identification of a repeated sequence element required for efficient encapsidation of the adenovirus type 5 chromosome. *J. Virol.* *61*, 2555–2558.

Heath, J.P. (1996). Epithelial cell migration in the intestine. *Cell Biol. Int.* *20*, 139–146.

Heller, F., Florian, P., Bojarski, C., Richter, J., Christ, M., Hillenbrand, B., Mankertz, J., Gitter, A.H., Bürgel, N., Fromm, M., et al. (2005). Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution. *Gastroenterology* *129*, 550–564.

Hermiston, M.L., and Gordon, J.I. (1995). Inflammatory bowel disease and adenomas in mice expressing a dominant negative N-cadherin. *Science* *270*, 1203–1207.

Hesse, A., Kosmides, D., Kontermann, R.E., and Nettelbeck, D.M. (2007). Tropism modification of adenovirus vectors by peptide ligand insertion into various positions of the adenovirus serotype 41 short-fiber knob domain. *J. Virol.* *81*, 2688–2699.

Hogaboam, C.M., Vallance, B.A., Kumar, A., Addison, C.L., Graham, F.L., Gauldie, J., and Collins, S.M. (1997). Therapeutic effects of interleukin-4 gene transfer in experimental inflammatory bowel disease. - PubMed - NCBI. *J. Clin. Invest.* *100*, 2766–2776.

Hommes, D.W., Mikhajlova, T.L., Stoinov, S., Stimac, D., Vucelic, B., Lonovics, J., Zákuciová, M., D'Haens, G., Van Assche, G., Ba, S., et al. (2006). Fontolizumab, a humanised anti-interferon gamma antibody, demonstrates safety and clinical activity in patients with moderate to severe Crohn's disease. *Gut* *55*, 1131–1137.

Honda, T., Saitoh, H., Masuko, M., Katagiri-Abe, T., Tominaga, K., Kozakai, I., Kobayashi, K., Kumanishi, T., Watanabe, Y.G., Odani, S., et al. (2000). The coxsackievirus-adenovirus receptor protein as a cell adhesion molecule in the developing mouse brain. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 77, 19–28.

Howitt, J., Anderson, C.W., and Freimuth, P. (2003). Adenovirus interaction with its cellular receptor CAR. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 272, 331–364.

Hueber, W., Sands, B.E., Lewitzky, S., Vandemeulebroecke, M., Reinisch, W., Higgins, P.D.R., Wehkamp, J., Feagan, B.G., Yao, M.D., Karczewski, M., et al. (2012). Secukinumab, a human anti-IL-17A monoclonal antibody, for moderate to severe Crohn's disease: unexpected results of a randomised, double-blind placebo-controlled trial. *Gut* 61, 1693–1700.

Hugot, J., Chamaillard, M., Zouali, H., Lesage, S., Ce, J., and Macry, J. (2001a). Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. 599–603.

Hugot, J.P., Laurent-Puig, P., Gower-Rousseau, C., Olson, J.M., Lee, J.C., Beaugier, L., Naom, I., Dupas, J.L., Van Gossum, A., Orholm, M., et al. (1996). Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16. *Nature* 379, 821–823.

Hugot, J.P., Chamaillard, M., Zouali, H., Lesage, S., Cézard, J.P., Belaiche, J., Almer, S., Tysk, C., O'Morain, C.A., Gassull, M., et al. (2001b). Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 411, 599–603.

Jijon, H.B., Churchill, T., Malfair, D., Wessler, A., Jewell, L.D., Parsons, H.G., and Madsen, K.L. (2000). Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase attenuates inflammation in a model of chronic colitis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 279, G641–G651.

Johansson, M.E. V, Gustafsson, J.K., Holmén-Larsson, J., Jabbar, K.S., Xia, L., Xu, H., Ghishan, F.K., Carvalho, F.A., Gewirtz, A.T., Sjövall, H., et al. (2014). Bacteria penetrate the normally impenetrable inner colon mucus layer in both murine colitis models and patients with ulcerative colitis. *Gut* 63, 281–291.

De Jong, R.N., and van der Vliet, P.C. (1999). Mechanism of DNA replication in eukaryotic cells: cellular host factors stimulating adenovirus DNA replication. *Gene* 236, 1–12.

De Jong, J.C., Wigand, R., Kidd, A.H., Wadell, G., Kapsenberg, J.G., Muzerie, C.J., Wermenbol, A.G., and Firtzlaff, R.G. (1983). Candidate adenoviruses 40 and 41: fastidious adenoviruses from human infant stool. *J. Med. Virol.* 11, 215–231.

De Jong, R.N., Meijer, L.A.T., and van der Vliet, P.C. (2003). DNA binding properties of the adenovirus DNA replication priming protein pTP. *Nucleic Acids Res.* 31, 3274–3286.

Jung, H.C., Eckmann, L., Yang, S.K., Panja, A., Fierer, J., Morzycka-Wroblewska, E., and Kagnoff, M.F. (1995). A distinct array of proinflammatory cytokines is expressed in human colon epithelial cells in response to bacterial invasion. *J. Clin. Invest.* 95, 55–65.

Kesisoglou, F., Chamberlain, J.R., Schmiedlin-Ren, P., Kaz, A., Fleisher, D., Roessler, B., and Zimmermann, E.M. (2005). Chimeric Ad5 vectors expressing the short fiber of Ad41 show reduced affinity for human intestinal epithelium. *Mol. Pharm.* 2, 500–508.

- Kidd, A.H., Banatvala, J.E., and de Jong, J.C. (1983). Antibodies to fastidious faecal adenoviruses (species 40 and 41) in sera from children. *J. Med. Virol.* *11*, 333–341.
- Kidd, A.H., Chroboczek, J., Cusack, S., and Ruigrok, R.W. (1993). Adenovirus type 40 virions contain two distinct fibers. *Virology* *192*, 73–84.
- Kirman, I., Whelan, R.L., and Nielsen, O.H. (2004). Infliximab: mechanism of action beyond TNF- α neutralization in inflammatory bowel disease. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* *16*, 639–641.
- Klotz, U. (2000). The role of aminosalicylates at the beginning of the new millennium in the treatment of chronic inflammatory bowel disease. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* *56*, 353–362.
- Kuhbacher, T., and Fölsch, U.R. (2007). Practical guidelines for the treatment of inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol.* *13*, 1149–1155.
- Kühn, R., Löhler, J., Rennick, D., Rajewsky, K., and Müller, W. (1993). Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* *75*, 263–274.
- Kwon, K.H., Murakami, A., Tanaka, T., and Ohigashi, H. (2005). Dietary rutin, but not its aglycone quercetin, ameliorates dextran sulfate sodium-induced experimental colitis in mice: attenuation of pro-inflammatory gene expression. *Biochem. Pharmacol.* *69*, 395–406.
- Lau, C., Soriano, H.E., Ledley, F.D., Finegold, M.J., Wolfe, J.H., Birkenmeier, E.H., and Henning, S.J. (1995). Retroviral gene transfer into the intestinal epithelium. *Hum. Gene Ther.* *6*, 1145–1151.
- Leach, M.W., Bean, A.G., Mauze, S., Coffman, R.L., and Powrie, F. (1996). Inflammatory bowel disease in C.B-17 scid mice reconstituted with the CD45RB^{high} subset of CD4⁺ T cells. *Am. J. Pathol.* *148*, 1503–1515.
- Ledley, F.D. (1992). Somatic gene therapy in gastroenterology: approaches and applications. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* *14*, 328–337.
- Levenstein, S., Prantera, C., Varvo, V., Scribano, M.L., Andreoli, A., Luzi, C., Arcà, M., Berto, E., Milite, G., and Marcheggiano, A. (2000). Stress and exacerbation in ulcerative colitis: a prospective study of patients enrolled in remission. *Am. J. Gastroenterol.* *95*, 1213–1220.
- Li, M.-C.C., and He, S.-H.H. (2004). IL-10 and its related cytokines for treatment of inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol.* *10*, 620–625.
- Lindsay, J.O., Ciesielski, C.J., Scheinin, T., Hodgson, H.J., and Brennan, F.M. (2001). The prevention and treatment of murine colitis using gene therapy with adenoviral vectors encoding IL-10. *J. Immunol.* *166*, 7625–7633.
- Lindsay, J.O., Sandison, A., Cohen, P., Brennan, F.M., Hodgson, H.J.F., and Al, L.E.T. (2004). IL-10 Gene Therapy Is Therapeutic for Dextran Sodium Sulfate-Induced Murine Colitis. *49*, 1327–1334.
- Loftus, E. V (2006). A practical perspective on ulcerative colitis: patients' needs from aminosalicylate therapies. *Inflamm. Bowel Dis.* *12*, 1107–1113.

- Loher, F., Schmall, K., Freytag, P., Landauer, N., Hallwachs, R., Bauer, C., Siegmund, B., Rieder, F., Lehr, H.-A., Dauer, M., et al. (2003). The specific type-4 phosphodiesterase inhibitor mesopram alleviates experimental colitis in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 305, 549–556.
- Lu, Z.-Z., Zou, X.-H., Dong, L.-X., Qu, J.-G., Song, J.-D., Wang, M., Guo, L., and Hung, T. (2009). Novel recombinant adenovirus type 41 vector and its biological properties. *J. Gene Med.* 11, 128–138.
- Lügering, A., and Kucharzik, T. (2006). Induction of intestinal lymphoid tissue: the role of cryptopatches. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1072, 210–217.
- MacPherson, B.R., and Pfeiffer, C.J. (1978). Experimental production of diffuse colitis in rats. *Digestion* 17, 135–150.
- Maizel, J. V., White, D.O., and Scharff, M.D. (1968). The polypeptides of adenovirus. I. Evidence for multiple protein components in the virion and a comparison of types 2, 7A, and 12. *Virology* 36, 115–125.
- Mannon, P.J., Fuss, I.J., Mayer, L., Elson, C.O., Sandborn, W.J., Present, D., Dolin, B., Goodman, N., Groden, C., Hornung, R.L., et al. (2004). Anti-interleukin-12 antibody for active Crohn's disease. *N. Engl. J. Med.* 351, 2069–2079.
- Marel, S. van der (2011). Gene and cell therapy based treatment strategies for inflammatory bowel diseases. *World J. Gastrointest. Pathophysiol.* 2, 114.
- Marini, M., Bamias, G., Rivera-Nieves, J., Moskaluk, C.A., Hoang, S.B., Ross, W.G., Pizarro, T.T., and Cominelli, F. (2003). TNF-alpha neutralization ameliorates the severity of murine Crohn's-like ileitis by abrogation of intestinal epithelial cell apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 8366–8371.
- Marlow, G.J., van Gent, D., and Ferguson, L.R. (2013). Why interleukin-10 supplementation does not work in Crohn's disease patients. *World J. Gastroenterol.* 19, 3931–3941.
- Mathias, P., Wickham, T., Moore, M., and Nemerow, G. (1994). Multiple adenovirus serotypes use alpha v integrins for infection. *J. Virol.* 68, 6811–6814.
- Matsumoto, H., Kimura, T., Haga, K., Kasahara, N., Anton, P., and McGowan, I. (2010). Effective in vivo and ex vivo gene transfer to intestinal mucosa by VSV-G-pseudotyped lentiviral vectors. *BMC Gastroenterol.* 10, 44.
- Mautner, V., Mackay, N., and Steinthorsdottir, V. (1989). Complementation of enteric adenovirus type 40 for lytic growth in tissue culture by E1B 55K function of adenovirus types 5 and 12. *Virology* 171, 619–622.
- Mautner, V., Steinthorsdottir, V., and Bailey, A. (1995). Enteric adenoviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 199 (Pt 3, 229–282.
- Mautner, V., Bailey, a, Steinthorsdottir, V., Ullah, R., and Rinaldi, a (1999). Properties of the adenovirus type 40 E1B promoter that contribute to its low transcriptional activity. *Virology* 265, 10–19.

- McCormack, W.M., Seiler, M.P., Bertin, T.K., Ubhayakar, K., Palmer, D.J., Ng, P., Nichols, T.C., and Lee, B. (2006). Helper-dependent adenoviral gene therapy mediates long-term correction of the clotting defect in the canine hemophilia A model. *J. Thromb. Haemost.* 4, 1218–1225.
- Meier, O., and Greber, U.F. (2004). Adenovirus endocytosis. *J. Gene Med.* 6 *Suppl 1*, S152–S163.
- Melgar, S., Karlsson, L., Rehnström, E., Karlsson, A., Utkovic, H., Jansson, L., and Michaëlsson, E. (2008). Validation of murine dextran sulfate sodium-induced colitis using four therapeutic agents for human inflammatory bowel disease. *Int. Immunopharmacol.* 8, 836–844.
- Mestecky, J. (1987). The common mucosal immune system and current strategies for induction of immune responses in external secretions. *J. Clin. Immunol.* 7, 265–276.
- Miller, D.G., Adam, M.A., and Miller, A.D. (1990). Gene transfer by retrovirus vectors occurs only in cells that are actively replicating at the time of infection. *Mol. Cell. Biol.* 10, 4239–4242.
- Miralles, M., Segura, M.M., Puig, M., Bosch, A., and Chillón, 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.
- Mittereder, N., March, K.L., and Trapnell, B.C. (1996). Evaluation of the concentration and bioactivity of adenovirus vectors for gene therapy. *J. Virol.* 70, 7498–7509.
- Miyazawa, N., Leopold, P.L., Hackett, N.R., Ferris, B., Worgall, S., Falck-Pedersen, E., and Crystal, R.G. (1999). Fiber swap between adenovirus subgroups B and C alters intracellular trafficking of adenovirus gene transfer vectors. *J. Virol.* 73, 6056–6065.
- Mizuguchi, H., and Hayakawa, T. (2004). Targeted adenovirus vectors. *Hum. Gene Ther.* 15, 1034–1044.
- Mizuguchi, H., Kay, M.A., and Hayakawa, T. (2001). Approaches for generating recombinant adenovirus vectors. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 52, 165–176.
- Mombaerts, P., Mizoguchi, E., Grusby, M.J., Glimcher, L.H., Bhan, A.K., and Tonegawa, S. (1993). Spontaneous development of inflammatory bowel disease in T cell receptor mutant mice. *Cell* 75, 274–282.
- Monahan, P.E., and Samulski, R.J. (2000). Adeno-associated virus vectors for gene therapy: more pros than cons? *Mol. Med. Today* 6, 433–440.
- Monteleone, G., Trapasso, F., Parrello, T., Biancone, L., Stella, A., Iuliano, R., Lizza, F., Fusco, A., and Pallone, F. (1999). Bioactive IL-18 expression is up-regulated in Crohn's disease. *J. Immunol.* 163, 143–147.
- Morris, G.P., Beck, P.L., Herridge, M.S., Depew, W.T., Szewczuk, M.R., and Wallace, J.L. (1989). Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology* 96, 795–803.

- Mu, W., Ouyang, X., Agarwal, A., Zhang, L., Long, D.A., Cruz, P.E., Roncal, C.A., Glushakova, O.Y., Chiodo, V.A., Atkinson, M.A., et al. (2005). IL-10 suppresses chemokines, inflammation, and fibrosis in a model of chronic renal disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* 16, 3651–3660.
- Murano, M., Maemura, K., Hirata, I., Toshina, K., Nishikawa, T., Hamamoto, N., Sasaki, S., Saitoh, O., and Katsu, K. (2000). Therapeutic effect of intracolonicly administered nuclear factor kappa B (p65) antisense oligonucleotide on mouse dextran sulphate sodium (DSS)-induced colitis. *Clin. Exp. Immunol.* 120, 51–58.
- Nagabhushan Kalburgi, S., Khan, N.N., and Gray, S.J. (2013). Recent gene therapy advancements for neurological diseases. *Discov. Med.* 15, 111–119.
- Nakamura, T., Sato, K., and 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.
- Nakayama, M., Both, G.W., Banizs, B., Tsuruta, Y., Yamamoto, S., Kawakami, Y., Douglas, J.T., Tani, K., Curiel, D.T., and Glasgow, J.N. (2006). An adenovirus serotype 5 vector with fibers derived from ovine atadenovirus demonstrates CAR-independent tropism and unique biodistribution in mice. *Virology* 350, 103–115.
- Nations, U. (2007). World population 2006.
- Neurath, M.F., Pettersson, S., Meyer zum Büschenfelde, K.H., and Strober, W. (1996). Local administration of antisense phosphorothioate oligonucleotides to the p65 subunit of NF-kappa B abrogates established experimental colitis in mice. *Nat. Med.* 2, 998–1004.
- Nicol, C. (2004). Effect of adenovirus serotype 5 fiber and penton modifications on in vivo tropism in rats. *Mol. Ther.* 10, 344–354.
- Nikolaus, S., Fölsch, U., and Schreiber, S. Immunopharmacology of 5-aminosalicylic acid and of glucocorticoids in the therapy of inflammatory bowel disease. *HepatoGastroenterology.* 47, 71–82.
- Noel, R.A., Shukla, P., and Henning, S.J. (1994). Optimization of gene transfer into intestinal epithelial cells using a retroviral vector. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 19, 43–49.
- Ogura, Y., Bonen, D.K., Inohara, N., Nicolae, D.L., Chen, F.F., Ramos, R., Britton, H., Moran, T., Karaliuskas, R., Duerr, R.H., et al. (2001a). A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 411, 603–606.
- Ogura, Y., Inohara, N., Benito, a, Chen, F.F., Yamaoka, S., and Nunez, G. (2001b). Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB. *J. Biol. Chem.* 276, 4812–4818.
- Okayasu, I., Hatakeyama, S., Yamada, M., Ohkusa, T., Inagaki, Y., and Nakaya, R. (1990). A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology* 98, 694–702.
- Van Oostrum, J., and Burnett, R.M. (1985). Molecular composition of the adenovirus type 2 virion. *J. Virol.* 56, 439–448.

- Ostapchuk, P., and Hearing, P. (2005). Control of adenovirus packaging. *J. Cell. Biochem.* 96, 25–35.
- Parker, A.L., White, K.M., Lavery, C.A., Custers, J., Waddington, S.N., and Baker, A.H. (2013). Pseudotyping the adenovirus serotype 5 capsid with both the fibre and penton of serotype 35 enhances vascular smooth muscle cell transduction. *Gene Ther.* 20, 1158–1164.
- Parkes, M., Satsangi, J., Lathrop, G.M., Bell, J.I., and Jewell, D.P. (1996). Susceptibility loci in inflammatory bowel disease. *Lancet* 348, 1588.
- Parronchi, P., Romagnani, P., Annunziato, F., Sampognaro, S., Becchio, a, Giannarini, L., Maggi, E., Pupilli, C., Tonelli, F., and Romagnani, S. (1997). Type 1 T-helper cell predominance and interleukin-12 expression in the gut of patients with Crohn's disease. *Am. J. Pathol.* 150, 823–832.
- Peyrin-Biroulet, L., Bigard, M.-A., Malesci, A., and Danese, S. (2008). Step-up and top-down approaches to the treatment of Crohn's disease: early may already be too late. *Gastroenterology* 135, 1420–1422.
- Pieniazek, D., Pieniazek, N.J., Macejak, D., Coward, J., Rayfield, M., and Luftig, R.B. (1990a). Differential growth of human enteric adenovirus 41 (TAK) in continuous cell lines. *Virology* 174, 239–249.
- Pieniazek, N.J., Slemenda, S.B., Pieniazek, D., Velarde, J., and Luftig, R.B. (1990b). Human enteric adenovirus type 41 (Tak) contains a second fiber protein gene. *Nucleic Acids Res.* 18, 1901.
- Piña, M., and Green, M. (1965). Biochemical studies on adenovirus multiplication. IX. Chemical and base composition analysis of 28 human adenoviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 54, 547–551.
- Pizarro, T.T., Michie, M.H., Bentz, M., Woraratanadharm, J., Smith, M.F., Foley, E., Moskaluk, C.A., Bickston, S.J., and Cominelli, F. (1999). IL-18, a novel immunoregulatory cytokine, is up-regulated in Crohn's disease: expression and localization in intestinal mucosal cells. *J. Immunol.* 162, 6829–6835.
- Pizarro, T.T., Arseneau, K.O., Bamias, G., and Cominelli, F. (2003). Mouse models for the study of Crohn's disease. *Trends Mol. Med.* 9, 218–222.
- Plevy, S., Salzberg, B., Van Assche, G., Regueiro, M., Hommes, D., Sandborn, W., Hanauer, S., Targan, S., Mayer, L., Mahadevan, U., et al. (2007). A phase I study of visilizumab, a humanized anti-CD3 monoclonal antibody, in severe steroid-refractory ulcerative colitis. *Gastroenterology* 133, 1414–1422.
- Polyak, S., Mah, C., Porvasnik, S., Herlihy, J.-D., Campbell-Thompson, M., Byrne, B.J., and 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. *Dig. Dis. Sci.* 53, 1261–1270.
- Reif, S., Klein, I., Lubin, F., Farbstein, M., Hallak, A., and Gilat, T. (1997). Pre-illness dietary factors in inflammatory bowel disease. *Gut* 40, 754–760.

- Rennick, D.M., and Fort, M.M. (2000). Lessons from genetically engineered animal models. XII. IL-10-deficient (IL-10^{-/-}) mice and intestinal inflammation. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 278, G829–G833.
- Rentsendorj, a, Xie, J., MacVeigh, M., Agadjanian, H., Bass, S., Kim, D.-H., Rossi, J., Hamm-Alvarez, S.F., and Medina-Kauwe, L.K. (2006). Typical and atypical trafficking pathways of Ad5 penton base recombinant protein: implications for gene transfer. *Gene Ther.* 13, 821–836.
- Rivera-Nieves, J., Bamias, G., Vidrich, A., Marini, M., Pizarro, T.T., McDuffie, M.J., Moskaluk, C.A., Cohn, S.M., and Cominelli, F. (2003). Emergence of perianal fistulizing disease in the SAMP1/YitFc mouse, a spontaneous model of chronic ileitis. *Gastroenterology* 124, 972–982.
- Rodríguez, E., Romero, C., Río, A., Miralles, M., Raventós, A., Planells, L., Burgueño, J.F., Hamada, H., Perales, J.C., Bosch, A., et al. (2013). Short-fiber protein of ad40 confers enteric tropism and protection against acidic gastrointestinal conditions. *Hum. Gene Ther. Methods* 24, 195–204.
- Roelvink, P.W., Lizonova, a, Lee, J.G., Li, Y., Bergelson, J.M., Finberg, R.W., Brough, D.E., Kovessi, I., and Wickham, T.J. (1998). The coxsackievirus-adenovirus receptor protein can function as a cellular attachment protein for adenovirus serotypes from subgroups A, C, D, E, and F. *J. Virol.* 72, 7909–7915.
- Rubin, D.T., and Hanauer, S.B. (2000). Smoking and inflammatory bowel disease. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 12, 855–862.
- Russell, W.C. (2000). Update on adenovirus and its vectors. *J. Gen. Virol.* 81, 2573–2604.
- Rutgeerts, P., Sandborn, W.J., Feagan, B.G., Reinisch, W., Olson, A., Johanns, J., Travers, S., Rachmilewitz, D., Hanauer, S.B., Lichtenstein, G.R., et al. (2005). Infliximab for induction and maintenance therapy for ulcerative colitis. *N. Engl. J. Med.* 353, 2462–2476.
- Rux, J.J., and Burnett, R.M. (2004). Adenovirus structure. *Hum. Gene Ther.* 15, 1167–1176.
- Sadlack, B., Merz, H., Schorle, H., Schimpl, A., Feller, A.C., and Horak, I. (1993). Ulcerative colitis-like disease in mice with a disrupted interleukin-2 gene. *Cell* 75, 253–261.
- Sandborn, W.J., Yednock, T.A., and Ph, D. (2003). Novel approaches to treating inflammatory bowel disease: targeting alpha-4 integrin. *Am. J. Gastroenterol.* 98, 2372–2382.
- Sandborn, W.J., Rutgeerts, P., Enns, R., Hanauer, S.B., Colombel, J.-F., Panaccione, R., D’Haens, G., Li, J., Rosenfeld, M.R., Kent, J.D., et al. (2007a). Adalimumab induction therapy for Crohn disease previously treated with infliximab: a randomized trial. *Ann. Intern. Med.* 146, 829–838.
- Sandborn, W.J., Hanauer, S.B., Rutgeerts, P., Fedorak, R.N., Lukas, M., MacIntosh, D.G., Panaccione, R., Wolf, D., Kent, J.D., Bittle, B., et al. (2007b). Adalimumab for maintenance treatment of Crohn’s disease: results of the CLASSIC II trial. *Gut* 56, 1232–1239.
- Sands, B.E. (2001). Biological therapies for ulcerative colitis. *Acta Gastroenterol. Belg.* 64, 205–209.

- Sartor, R.B. (2006). Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Nat. Clin. Pract. Gastroenterol. Hepatol.* 3, 390–407.
- Satoh, H., Sato, F., Takami, K., and Szabo, S. (1997). New ulcerative colitis model induced by sulfhydryl blockers in rats and the effects of antiinflammatory drugs on the colitis. *J. Pharmacol.* 73, 299–309.
- Satsangi, J., Parkes, M., Louis, E., Hashimoto, L., Kato, N., Welsh, K., Terwilliger, J.D., Lathrop, G.M., Bell, J.I., and Jewell, D.P. (1996). Two stage genome-wide search in inflammatory bowel disease provides evidence for susceptibility loci on chromosomes 3, 7 and 12. *Nat. Genet.* 14, 199–202.
- Scaldaferri, F., Gerardi, V., Lopetuso, L.R., Del Zompo, F., Mangiola, F., Boškoski, I., Bruno, G., Petito, V., Laterza, L., Cammarota, G., et al. (2013). Gut microbial flora, prebiotics, and probiotics in IBD: their current usage and utility. *Biomed Res. Int.* 2013, 435268.
- Schiedner, G., Hertel, S., and Kochanek, S. (2000). Efficient transformation of primary human amniocytes by E1 functions of Ad5: generation of new cell lines for adenoviral vector production. *Hum. Gene Ther.* 11, 2105–2116.
- Schmiedlin-Ren, P., Kesisoglou, F., Mapili, J.A., Sabek, S.E., Barnett, J.L., Chey, W.D., Roessler, B., and Zimmermann, E.M. (2005). Increased transduction of human intestinal epithelial cells by adenoviral vectors in inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 11, 464–472.
- Schnepf, B.C., Clark, K.R., Klemanski, D.L., Pacak, C.A., and Johnson, P.R. (2003). Genetic fate of recombinant adeno-associated virus vector genomes in muscle. *J. Virol.* 77, 3495–3504.
- Schoehn, G., Fender, P., Chroboczek, J., and Hewat, E.A. (1996). Adenovirus 3 penton dodecahedron exhibits structural changes of the base on fibre binding. *EMBO J.* 15, 6841–6846.
- Schoggins, J.W., Gall, J.G.D., and Falck-pedersen, E. (2003a). Subgroup B and F Fiber Chimeras Eliminate Normal Adenovirus Type 5 Vector Transduction In Vitro and In Vivo. 77, 1039–1048.
- Schoggins, J.W., Gall, J.G.D., and Falck-Pedersen, E. (2003b). Subgroup B and F fiber chimeras eliminate normal adenovirus type 5 vector transduction in vitro and in vivo. *J. Virol.* 77, 1039–1048.
- Schröder, A.R.W., Shinn, P., Chen, H., Berry, C., Ecker, J.R., and Bushman, F. (2002). HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell* 110, 521–529.
- Seth, P., Fitzgerald, D., Ginsberg, H., Willingham, M., and Pastan, I. (1984). Evidence that the penton base of adenovirus is involved in potentiation of toxicity of *Pseudomonas* exotoxin conjugated to epidermal growth factor. *Mol. Cell. Biol.* 4, 1528–1533.
- Seth, P., Pastan, I., and Willingham, M.C. (1987). Adenovirus-dependent changes in cell membrane permeability: role of Na⁺, K⁺-ATPase. *J. Virol.* 61, 883–888.

Shao, G., Greathouse, K., Huang, Q., Wang, C.-M., and Sferra, T.J. (2006). Gene Transfer to the Gastrointestinal Tract After Peroral Administration of Recombinant Adeno-associated Virus Type 2 Vectors. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 43, 168–179.

Shayakhmetov, D.M., and Lieber, a (2000). Dependence of adenovirus infectivity on length of the fiber shaft domain. *J. Virol.* 74, 10274–10286.

Shayakhmetov, D.M., Li, Z., Ternovoi, V., Gaggar, A., and Gharwan, H. (2003). The Interaction between the Fiber Knob Domain and the Cellular Attachment Receptor Determines the Intracellular Trafficking Route of Adenoviruses. 77, 3712–3723.

Shintani, N., Nakajima, T., Okamoto, T., Kondo, T., Nakamura, N., and Mayumi, T. (1998). Involvement of CD4+ T cells in the development of dextran sulfate sodium-induced experimental colitis and suppressive effect of IgG on their action. *Gen. Pharmacol.* 31, 477–481.

Shivananda, S., Lennard-Jones, J., Logan, R., Fear, N., Price, a, Carpenter, L., and van Blankenstein, M. (1996). Incidence of inflammatory bowel disease across Europe: is there a difference between north and south? Results of the European Collaborative Study on Inflammatory Bowel Disease (EC-IBD). *Gut* 39, 690–697.

Smith, T., Idamakanti, N., Kylefjord, H., Rollence, M., King, L., Kaloss, M., Kaleko, M., and Stevenson, S.C. (2002). In vivo hepatic adenoviral gene delivery occurs independently of the coxsackievirus-adenovirus receptor. *Mol. Ther.* 5, 770–779.

Stecher, H., Shayakhmetov, D.M., Stamatoyannopoulos, G., and Lieber, A. (2001). A capsid-modified adenovirus vector devoid of all viral genes: assessment of transduction and toxicity in human hematopoietic cells. *Mol. Ther.* 4, 36–44.

Steinhoff, U., Brinkmann, V., Klemm, U., Aichele, P., Seiler, P., Brandt, U., Bland, P.W., Prinz, I., Zügel, U., and Kaufmann, S.H. (1999). Autoimmune intestinal pathology induced by hsp60-specific CD8 T cells. *Immunity* 11, 349–358.

Stevenson, S.C., Rollence, M., Marshall-Neff, J., and McClelland, a (1997). Selective targeting of human cells by a chimeric adenovirus vector containing a modified fiber protein. *J. Virol.* 71, 4782–4790.

Stewart, P.L., Chiu, C.Y., Huang, S., Muir, T., Zhao, Y., Chait, B., Mathias, P., and Nemerow, G.R. (1997). Cryo-EM visualization of an exposed RGD epitope on adenovirus that escapes antibody neutralization. *EMBO J.* 16, 1189–1198.

Stokkers, P.C.F., and Hommes, D.W. (2004). New cytokine therapeutics for inflammatory bowel disease. *Cytokine* 28, 167–173.

Sundberg, J.P., Elson, C.O., Bedigian, H., and Birkenmeier, E.H. (1994). Spontaneous, heritable colitis in a new substrain of C3H/HeJ mice. *Gastroenterology* 107, 1726–1735.

Sutherland, L.R. (2000). Prevention of relapse of Crohn's disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 6, 321–328; discussion 329.

- Sutherland, L., Roth, D., Beck, P., May, G., and Makiyama, K. (2002). Oral 5-aminosalicylic acid for maintenance of remission in ulcerative colitis. *Cochrane Database Syst. Rev.* CD000544.
- Sweeney, J.A., and Hennessey, J.P. (2002). Evaluation of accuracy and precision of adenovirus absorptivity at 260 nm under conditions of complete DNA disruption. *Virology* 295, 284–288.
- Sweetser, D.A., Hauff, S.M., Hoppe, P.C., Birkenmeier, E.H., and Gordon, J.I. (1988). Transgenic mice containing intestinal fatty acid-binding protein-human growth hormone fusion genes exhibit correct regional and cell-specific expression of the reporter gene in their small intestine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85, 9611–9615.
- Takiff, H.E., Straus, S.E., and Garon, C.F. (1981). Propagation and in vitro studies of previously non-cultivable enteral adenoviruses in 293 cells. *Lancet (London, England)* 2, 832–834.
- Tang, S.-C., Sambanis, A., and Sibley, E. (2005). Proteasome modulating agents induce rAAV2-mediated transgene expression in human intestinal epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 331, 1392–1400.
- Tibbetts, C., and Giam, C.Z. (1979). In vitro association of empty adenovirus capsids with double-stranded DNA. *J. Virol.* 32, 995–1005.
- Tiemessen, C.T., and Kidd, a H. (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.
- Tiemessen, C.T., and Kidd, A.H. (1988). Helper function of adenovirus 2 for adenovirus 41 antigen synthesis in semi-permissive and non-permissive cells. *Arch. Virol.* 103, 207–218.
- Tiemessen, C.T., and Kidd, A.H. (1995a). The subgroup F adenoviruses. *J. Gen. Virol.* 76 (Pt 3), 481–497.
- Tiemessen, C.T., and Kidd, A.H. (1995b). Review article The subgroup F adenoviruses. 40.
- Tiemessen, C.T., Nel, M.J., and Kidd, a H. (1996). Adenovirus 41 replication: cell-related differences in viral gene transcription. *Mol. Cell. Probes* 10, 279–287.
- Tollefson, A.E., Scaria, A., Hermiston, T.W., Ryerse, J.S., Wold, L.J., and Wold, W.S. (1996a). The adenovirus death protein (E3-11.6K) is required at very late stages of infection for efficient cell lysis and release of adenovirus from infected cells. *J. Virol.* 70, 2296–2306.
- Tollefson, A.E., Ryerse, J.S., Scaria, A., Hermiston, T.W., and Wold, W.S. (1996b). The E3-11.6-kDa adenovirus death protein (ADP) is required for efficient cell death: characterization of cells infected with adp mutants. *Virology* 220, 152–162.
- Tomko, R.P., Xu, R., and Philipson, L. (1997). HCAR and MCAR: the human and mouse cellular receptors for subgroup C adenoviruses and group B coxsackieviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 3352–3356.
- Truelove, S.C., and Witts, L.J. (1955). Cortisone in ulcerative colitis; final report on a therapeutic trial. *Br. Med. J.* 2, 1041–1048.

Vellinga, J., Van der Heijdt, S., and Hoeben, R.C. (2005). The adenovirus capsid: major progress in minor proteins. *J. Gen. Virol.* *86*, 1581–1588.

Veltkamp, C., Tonkonogy†, S.L., de Jong§, Y.P., Albright, C., Grenther‡, W.B., Balish||, E., Terhorst§, C., and Sartor, R.B. (2001). Continuous stimulation by normal luminal bacteria is essential for the development and perpetuation of colitis in Tgε26 mice. *Gastroenterology* *120*, 900–913.

Van der Vliet, P.C. (1995). Adenovirus DNA replication. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* *199 (Pt 2)*, 1–30.

Walter, E., Croyle, M.A., Roessler, B.J., and Amidon, G.L. (1997). The absence of accessible vitronectin receptors in differentiated tissue hinders adenoviral-mediated gene transfer to the intestinal epithelium in vitro. *Pharm. Res.* *14*, 1216–1222.

Walters, R.W., Freimuth, P., Moninger, T.O., Ganske, I., Zabner, J., and Welsh, M.J. (2002). Adenovirus fiber disrupts CAR-mediated intercellular adhesion allowing virus escape. *Cell* *110*, 789–799.

Watanabe, M., Ueno, Y., Yajima, T., Okamoto, S., Hayashi, T., Yamazaki, M., Iwao, Y., Ishii, H., Habu, S., Uehira, M., et al. (1998). Interleukin 7 transgenic mice develop chronic colitis with decreased interleukin 7 protein accumulation in the colonic mucosa. *J. Exp. Med.* *187*, 389–402.

Weber, J. (1976). Genetic analysis of adenovirus type 2 III. Temperature sensitivity of processing viral proteins. *J. Virol.* *17*, 462–471.

Weber, J.M. (1995). Adenovirus endopeptidase and its role in virus infection. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* *199 (Pt 1)*, 227–235.

Weber, J.M. (2003). Adenain, the adenovirus endoprotease (a review). *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* *50*, 95–101.

Weber, J.M., Talbot, B.G., and Delorme, L. (1989). The orientation of the adenovirus fiber and its anchor domain identified through molecular mimicry. *Virology* *168*, 180–182.

Wickham, T.J., Mathias, P., Cheresch, D.A., and Nemerow, G.R. (1993). Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 promote adenovirus internalization but not virus attachment. *Cell* *73*, 309–319.

Wirtz, S., and Neurath, M.F. (2007). Mouse models of inflammatory bowel disease. *Adv. Drug Deliv. Rev.* *59*, 1073–1083.

Wirtz, S., Galle, P.R., and Neurath, M.F. (1999). Efficient gene delivery to the inflamed colon by local administration of recombinant adenoviruses with normal or modified fibre structure. *Gut* *44*, 800–807.

Witt, D.J., and Bousquet, E.B. (1988). Comparison of enteric adenovirus infection in various human cell lines. *J. Virol. Methods* *20*, 295–308.

Wu, Q., and Tikoo, S.K. (2004). Altered tropism of recombinant bovine adenovirus type-3 expressing chimeric fiber. *Virus Res.* *99*, 9–15.

- Wu, X., Li, Y., Crise, B., and Burgess, S.M. (2003). Transcription start regions in the human genome are favored targets for MLV integration. *Science* 300, 1749–1751.
- Xu, Z., Qiu, Q., Tian, J., Smith, J.S., Conenello, G.M., Morita, T., and Byrnes, A.P. (2013). Coagulation factor X shields adenovirus type 5 from attack by natural antibodies and complement. *Nat. Med.* 19, 452–457.
- Yamada, T., Deitch, E., Specian, R.D., Perry, M.A., Sartor, R.B., and Grisham, M.B. (1993). Mechanisms of acute and chronic intestinal inflammation induced by indomethacin. *Inflammation* 17, 641–662.
- Yamasaki, S., Miura, Y., Brown, E., Davydova, J., and Yamamoto, M. (2010). Development of a method for effective amplification of human adenovirus 40. *Arch. Virol.* 155, 1059–1068.
- Yamasaki, S., Miura, Y., Davydova, J., Vickers, S.M., and Yamamoto, M. (2013). A Single Intraduodenal Administration of Human Adenovirus 40 Vaccine Effectively Prevents Anaphylactic Shock. *Clin. Vaccine Immunol.* 20, 1508–1516.
- Yeh, H.Y., Pieniazek, N., Pieniazek, D., Gelderblom, H., and Luftig, R.B. (1994). Human adenovirus type 41 contains two fibers. *Virus Res.* 33, 179–198.
- Zennou, V., Petit, C., Guetard, D., Nerhbass, U., Montagnier, L., and Charneau, P. (2000). HIV-1 genome nuclear import is mediated by a central DNA flap. *Cell* 101, 173–185.
- Zhang, W., and Arcos, R. (2005). Interaction of the adenovirus major core protein precursor, pVII, with the viral DNA packaging machinery. *Virology* 334, 194–202.
- Zhang, Y., and Bergelson, J.M. (2005). Adenovirus receptors. *J. Virol.* 79, 12125–12131.
- Zhang, W., Low, J.A., Christensen, J.B., and Imperiale, M.J. (2001). Role for the adenovirus IVa2 protein in packaging of viral DNA. *J. Virol.* 75, 10446–10454.
- Zhao, Y., Li, Y., Wang, Q., Wang, L., Yang, H., and Li, M. (2011). Increased antitumor capability of fiber-modified adenoviral vector armed with TRAIL against bladder cancers. *Mol. Cell. Biochem.* 353, 93–99.
- Zimmerman, M.J., and Jewell, D.P. (1996). Cytokines and mechanisms of action of glucocorticoids and aminosalicylates in the treatment of ulcerative colitis and Crohn's disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 10 Suppl 2, 93–98; discussion 99.

ANNEXES

Short-Fiber Protein of Ad40 Confers Enteric Tropism and Protection Against Acidic Gastrointestinal Conditions

Ester Rodríguez,^{1,*} Carolina Romero,^{2,3,*} Adolfo Río,^{3,4} Marta Miralles,¹ Aida Raventós,^{3,4}
Laura Planells,¹ Joan F. Burgueño,³ Hirofumi Hamada,⁵ Jose Carlos Perales,⁶
Assumpció Bosch,¹ Miguel Angel Gassull,^{3,4} Ester Fernández,^{2,3} and Miguel Chillon^{1,7}

Abstract

The lack of vectors for selective gene delivery to the intestine has hampered the development of gene therapy strategies for intestinal diseases. We hypothesized that chimeric adenoviruses of Ad5 (species C) displaying proteins of the naturally enteric Ad40 (species F) might hold the intestinal tropism of the species F and thus be useful for gene delivery to the intestine. As oral–fecal dissemination of enteric adenovirus must withstand the conditions encountered in the gastrointestinal tract, we studied the resistance of chimeric Ad5 carrying the short-fiber protein of Ad40 to acid milieu and proteases and found that the Ad40 short fiber confers resistance to inactivation in acidic conditions and that AdF/40S was further activated upon exposure to low pH. In contrast, the chimeric AdF/40S exhibited only a slightly higher protease resistance compared with Ad5 to proteases present in simulated gastric juice. Then, the biodistribution of different chimeric adenoviruses by oral, rectal, and intravenous routes was tested. Expression of reporter β -galactosidase was measured in extracts of 15 different organs 3 days after administration. Our results indicate that among the chimeric viruses, only intrarectally given AdF/40S infected the colon (preferentially enteroendocrine cells and macrophages) and to a lesser extent, the small intestine, whereas Ad5 infectivity was very poor in all tissues. Additional *in vitro* experiments showed improved infectivity of AdF/40S also in different human epithelial cell lines. Therefore, our results point at the chimeric adenovirus AdF/40S as an interesting vector for selective gene delivery to treat intestinal diseases.

Introduction

INTESTINAL EPITHELIUM HAS BEEN PROVEN a difficult target for gene therapy strategies despite the use of different viral and nonviral vectors. The difficulty in transducing the intestine can be associated, at the cellular level, to inefficient vector binding, internalization, and endocytosis. In fact, polarized epithelial cells are more permissive to basolateral than to apical transduction, suggesting different vector binding and trafficking pathways between the apical and the basolateral membranes (Duan *et al.*, 2000; Esclatine *et al.*, 2001; Tang *et al.*, 2005). In addition, pre-existing immunity may neutralize viral vectors (Manno *et al.*, 2006) and limit intestinal gene transfer.

Finally, protective extracellular barriers such as mucus, proteases, and acidic gastric pH can reduce vector stability of orally administered vectors (Shao *et al.*, 2006; Tang and Sibley, 2006).

Initial studies with DNA plasmids and liposomes (Schmid *et al.*, 1994; Westbrook *et al.*, 1994; Schmid *et al.*, 1997a) reported limited transduction of the intestine lasting only for a short period. More recent studies using naked DNA in mice in which colitis was induced by dextran sulfate sodium showed transduction of mucosal layer, lamina propria, and muscularis mucosae after intrarectal administration (Kanbe *et al.*, 2006). Similarly, other nonviral vectors such as orally given chitosan–DNA nanoparticles (Chen *et al.*, 2004), or

¹Centre de Biotecnologia Animal i Teràpia Gènica (CBATEG), Departament Bioquímica i Biologia Molecular, Universitat Autònoma Barcelona, Barcelona 08193, Spain.

²Departament Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, Universitat Autònoma Barcelona, 08193 Barcelona, Spain.

³Centro de Investigación Biomédica en Red- Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBER-ehd), Instituto de Salud Carlos III, Spain.

⁴Institut d'Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol, 08916 Badalona, Spain.

⁵Department of Molecular Medicine, University of Sapporo, 060-8556 Sapporo, Japan.

⁶Biophysics Unit, Departament de Ciències Fisiològiques II, IDIBELL-Universitat de Barcelona, 08907 Barcelona, Spain.

⁷Institució Catalana de Recerca i Estudis Avançats (ICREA), 08010 Barcelona, Spain.

*These two authors contributed equally to this work.

cationic liposomes given intrarectally using a double-balloon catheter (Schmid *et al.*, 1997b) also allowed transduction of intestinal epithelium. However, in all cases transduction efficiency was low. Other gene transfer vectors as the retroviral (Lozier *et al.*, 1997; Seppen *et al.*, 2000) and adeno-associated (Tang *et al.*, 2005; Shao *et al.*, 2006) viruses also exhibit a poor transduction efficiency of intestinal epithelial cells both in culture and *in vivo*, even after intracolonic administration in a mouse model of colitis (Farlow *et al.*, 2007). However, though inefficiently, AAV2 vectors allow persistent expression of the transgene in both gut epithelial and lamina propria cells, suggesting transduction of few crypt progenitor cells (Polyak *et al.*, 2008). Unfortunately, the stability of AAV2 vectors is strongly reduced by the normal luminal milieu encountered in the proximal gastrointestinal tract (Shao *et al.*, 2006).

Adenoviral vectors have also been explored for intestinal gene transfer. However, although in neonates or undifferentiated intestinal cells adenovirus-mediated gene transfer was relatively more efficient (Hamilton *et al.*, 1997; Kesiosoglou *et al.*, 2006), the lack of sufficient binding and internalization receptors led to a poor and inefficient transduction of differentiated intestinal cells. Similarly, after oropharyngeal administration, adenovirus-mediated transgene expression was seen in the epithelial cells of the villi but not in the cells lining the crypts either in fetal (Wu *et al.*, 1999) or in adult gut (Foreman *et al.*, 1998). In contrast, direct injection into various regions of the small and large intestine allowed higher transduction efficiencies in rats and rabbits (Foreman *et al.*, 1998). In all cases, enterocytes were the primary targets, and transgene expression was similar regardless of the intestinal segment, that is, duodenum, ileum, or colon, to which the adenovirus was delivered. Notably, Lecollinet *et al.* (2006) have recently suggested that gene transfer to digestive epithelium could be substantially improved by exploiting the tropism of existing types of human adenoviruses. In particular, chimeric adenovirus vectors carrying fibers from types of species B and D are able to transduce efficiently the apical pole of human epithelium in a manner independent of coxsackievirus and adenovirus receptor (CAR), which is a cell receptor for several adenovirus types, such as Ad5 (Lecollinet *et al.*, 2006).

Several groups have analyzed the potential of adenovirus with natural enteric tropism, such as Ad40 and Ad41, as gene transfer vectors for specific transduction of the gastrointestinal tract. Thus, Croyle *et al.* (1998) showed that Ad41 was considerably more efficient than Ad5 in its ability to bind differentiated Caco-2 cells, while no significant differences were observed in undifferentiated Caco-2. These results were consistent with those observed *in vivo* in rat jejunum (Croyle *et al.*, 1998). Unfortunately, proteomes of wild-type Ad40 and Ad41 are not yet fully characterized; therefore, the risk of oncogenicity from their proteins cannot be ruled out. In addition, Ad40 and Ad41 (species F) have been described as fastidious or noncultivable because of their poor growth in cultured cell lines, with a productivity of only 1–15 infectious units per cell, and high particle to infectious unit ratios (Takiff *et al.*, 1981; Pieniazek *et al.*, 1990; Brown *et al.*, 1992; Favier *et al.*, 2002). Interestingly, enteric viruses have two fiber proteins in equal ratio: a long fiber (L) that interacts with CAR and a short fiber (S) that interacts with an unknown receptor and might be responsible of the

gastrointestinal tropism. To circumvent problems associated with inefficient virus amplification and with the limited knowledge of its proteome, chimeric vectors (AdF/40S) formed by Ad5 virion carrying different combinations of Ad40 and Ad41 fiber proteins have been developed (Nakamura *et al.*, 2003). However, intravenous administration of these AdF/40S chimeric vectors did not allow intestinal transduction, and therefore oral and rectal administration should be tested for these vectors. Here, we show how the Ad40 short-fiber protein confers to the Ad5 capsid, not only an enteric tropism after oral and rectal administration but also an increased resistance to pH exposure.

Materials and Methods

Adenovirus generation, production, and purification

First-generation Ad5-GFP and Ad5- β gal vectors were produced, purified, and manipulated in the biosafety level 2 facilities of the Centre de Biotecnologia Animal i Teràpia Gènica of the Universitat Autònoma Barcelona, Spain, as previously described (Alba *et al.*, 2007; Chillón and Alemany, 2010). Briefly, *Pac1*-linearized plasmids (6 μ g) were transfected into 1×10^6 HEK293 cells and virus recovered 8–10 days post-transfection. Then, viruses were sequentially amplified until the infection of 4×10^8 HEK293 cells. Viral production of chimeric Ad5 carrying different combinations of fiber-40 proteins was performed by starting from a prestock of purified virus from Nakamura *et al.* (2003). Briefly, HEK293 cells were cultured in a 15 cm plate until 70% confluence was reached, and subsequently infected in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 2% fetal bovine serum (FBS) with the viral prestock (multiplicity of infection, MOI, = 100). Four days later, viruses were harvested and subjected to three freeze–thaw cycles. The cell lysate was centrifuged 5 min at 1400 g and the supernatant used to infect three new 15 cm plates. Then, the amplification process was repeated to infect ten 15 cm plates and finally thirty 15 cm plates. In the last amplification cycle, cells were harvested after cytopathic effect, and centrifuged 5 min at 1400 g. Afterward, pellets were resuspended in 20 ml DMEM and passed through three freeze–thaw cycles. Viral particles were purified by two consecutive CsCl gradients (an initial step gradient followed by an isopycnic gradient) and finally purified using a Sephadex G-25 desalting column (Amersham Biosciences; 17-0851-01). Fiber composition of the different vectors was confirmed by Western blot. Viral particles were measured by absorbance of disrupted virions at 260 nm where 1 optical density unit equals 1×10^{12} particles/ml, while infective particles were measured by end-point dilution assay counting the number of hexon-producing cells in triplicate (Chillón and Alemany, 2010).

Infection of SKOV-3 cells after incubation with coagulation Factor X

SKOV-3 cells (ECACC; #91091004) were cultured with McCoy's 5A (Invitrogen; 26600-023) + 2 mM glutamine + 15% FBS, in 24-well plates at 80% confluence. Ad5-GFP y AdF/40S-GFP vectors (100 vp/cell) were incubated in serum-free media containing 8 μ g/ml of Factor X (Haematologic Technologies Inc.) as described by Waddington and collaborators (Waddington *et al.*, 2008). Incubation was performed at 37°C

for 3 hr, and then added to the cells. Twenty-four hours later, cells were fixed with 2% paraformaldehyde. Infected cells expressing GFP were analyzed using a FACS-cytometer (FACSCanto, Cytometry Service of Institute of Biochemistry and Biotechnology of UAB).

Effect of acid exposure and protease exposure on virus viability

HEK-293 cells were cultured in 24-well plates (pretreated with collagen) until they reached 80% confluence. (A) Acid exposure: Solutions of pH 2 and pH 4 were prepared (MilliQ water and HCl) and filtrated using a 0.22 μm filter (Millipore; SLGS033SS). Purified viruses were diluted in MilliQ water to reach a concentration of 1.2×10^5 IU/ μl , and then 1 μl of the dilution (MOI=0.2) was exposed to 50 μl of the pH solution (1 μl of DMEM was used as a control). The mix was incubated at 37°C for 3, 10, and 30 min at 37°C. Then, pH was neutralized with 1.5 ml DMEM+0.2% FBS and 500 μl of each mix was used to infect three wells (procedure adapted from Favier *et al.*, 2004). (B) Protease exposure: Ad5 and AdF/40S vectors (1×10^7 IU) were incubated at 37°C in 1 ml of simulated gastric fluid (SGF), prepared according to the United States Pharmacopeia (USP): 7 ml 1 N HCl, 2 g NaCl, and 3.2 g pepsin in 1 liter of ddH₂O, pH 1.2. At different time points from 0 to 180 min, 15 μl of the vector containing solution was mixed with 485 μl of DMEM+2% FBS. Then, 150 μl was added to 1 million HEK293 cells seeded in six-well plates. Experiments were performed in triplicate. Cells were collected 6–8 hr before the end of the viral cycle, and infectivity was estimated by luminometry. Results (in percentage) show the activation or inhibition of the infection after exposure to acid or SGF, where 100% is the level of infection for the virus exposed to DMEM (acid exposure) or the level of infection for the virus at time 0 min (protease exposure).

In vivo distribution in mouse

Animal protocols were reviewed and approved by the Ethics Committee of the Universitat Autònoma de Barcelona. All experimental procedures were performed in the university Central Experimental Animal Facilities, according to the current regulations. Eight- to 10-week-old female CD1 mice (Charles River Laboratories) received single doses of adenovirus vectors expressing βgal (Ad5, AdF/40S, AdF/40SL, AdF/540, AdF/405) or GFP (Ad5, AdF/40S) by intravenous (lateral tail vein), oral, or intrarectal route. In the oral and enema groups, a sterile 24G \times 1.5 inch (38 mm) \times 1.25 mm bulb-type needle was inserted into the stomach or into the rectum, respectively. At 72 hr postadministration, mice were euthanized and samples of liver, lung, spleen, heart, kidneys, ovaries, skeletal muscle, stomach, esophagus, small intestine, and colon were collected, snap-frozen, and stored at -80°C . Approximately 25 mm³ fragments of each frozen organ were mechanically homogenized in 2 ml microtubes with 100 μl of lysis solution (Galacto-Light Plus kit; Tropix; T1011) until an homogeneous mix was obtained. Afterward, the uniform mix was subjected to a freeze-thaw cycle to facilitate the release of the cytoplasmic content. β -galactosidase activity was measured as relative luminescence units by luminometry using the Galacto-Light Plus kit, and was normalized by protein concentration in the tissue lysates. For immunohistochemistry, organs were paraffin-embedded and sections

were incubated with rabbit anti-somatostatin (Chemicon; #AB5494) or rabbit anti-CD68 (Santa Cruz Biotechnology; #sc-9139) antibodies and further analyzed by confocal microscopy.

Adenovirus-mediated gene transfer experiments in human intestinal epithelial cell lines

For gene transfer experiments, adherent human intestinal cell lines HT29 (ECACC 91072201), Caco2 (ECACC 86010202), SW480 (ATCC CCL-231), LS174T (ATCC CL-188), LS411N (ATCC CRL-2159), and SW1116 (ATCC CCL-233) were grown in six-well plates (70–80% of confluency) and transduced ($n=3$ per experiment) with 10 vp/cell of Ad5-GFP or AdF/40S-GFP. Cells were incubated at 37°C and 5% CO₂ during 48 hr in DMEM (41965-039 Gibco), 2% FBS (A15-151PAA), 1% NEAA (11140-035 Gibco), and 100 units/ml penicillin and 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin (15070-063, Gibco). After transduction with the adenoviral vector, cells were fixed with 2% paraformaldehyde and GFP-positive cells were quantified using a FACSCanto-II cytometer and analyzed with FACSDiva software (BD Biosciences).

Statistical analysis

Data were presented as mean values \pm standard deviation. Statistical calculations were performed using the G-Stat version 2.0 and Prism 5.04 for windows statistical programs. Statistical significance between individual groups was determined by Student's *t*-test (unpaired, two-tailed) or one-way analysis of variance followed by Tukey *post hoc* analysis. Data are presented as mean \pm SEM. In all the statistical analyses, $p < 0.05$ was considered significant.

Results

Short-Fiber-40 protein lengthens adenovirus life cycle

The chimeric Ad5/40 vectors used in this work are based on the Ad5 virion carrying different combinations of the Ad5 and Ad40 fiber proteins (Table 1). Thus, the F/40SL vector carries the two fibers of Ad40, the short and the long, while the F40S vector contains only the short fiber of Ad40. The AdF/540 vector is composed of the tail and shaft domains of the Ad5 fiber and the knob domain of the Ad40 short fiber, while the AdF/405 is composed of the tail and shaft domains of the Ad40 short fiber and the knob domain of Ad5 fiber. All these viruses code for the βGal marker gene.

First, Ad5/40 chimeric vectors (Nakamura *et al.*, 2003) were produced using standard Ad5 procedures. Vector prestocks were amplified through serial amplifications until cytopathic effect was observed, followed by a final amplification step of 36 hr to facilitate subsequent virus purification by cesium chloride gradients and ultracentrifugation. However, production of viral particles was very inefficient. Since several authors have reported that, apart from mediating the binding of the virus to the cell surface, the fiber protein likely modulates intracellular trafficking as well (Miyazawa *et al.*, 1999; Shayakhmetov *et al.*, 2003), we studied whether the incorporation of the Ad40 fiber proteins into the Ad5 capsids affected the viral life cycle. For this purpose, HEK-293 cells were infected at MOI=1 with either Ad5 or chimeric Ad5/40 vectors. Infected cells were harvested every 12 hr, and vector

TABLE 1. THE CHIMERIC AD5/40 VECTORS USED IN THIS WORK

	Tail + shaft	Knob	Tail + shaft	Knob
Ad5	5	5		
Ad F/40S	40S	40S		
Ad F/540	5	40S		
Ad F/405	40S	5		
Ad F/40SL	40S	40S	40L	40L

These vectors are based on the Ad5 virion and carry different combinations of the Ad5 and Ad40 fiber proteins.

particles recovered and quantified by end-point dilution (Chillón and Alemany, 2010).

As observed in Fig. 1, Ad5 follows a 36-hr-long viral life cycle, while the chimeric Ad5 carrying the Ad40 short-fiber protein (AdF/40S vector) has a cycle between 48 and 60 hr. In addition, at 36 hr, the productivity of the AdF/40S vector is 20 times lower than at the end of its viral life cycle, explaining why the amplification of chimeric Ad5/40 vectors is inefficient when using the standard amplification procedures for Ad5. Whether the cause of the delayed viral life cycle is a lack of virus binding, alteration of virus entry, or other, we modified the vector production protocol by harvesting producer cells at 60 hr instead of 36 hr as before.

Short-Fiber-40 protein does not affect viability of the adenovirus capsid

As observed in Table 2, after vector production, Ad5 vectors carrying part or all the F40S protein (AdF/40S, AdF/540, and AdF/405) have a poor viral particle-to-infectious unit ratio (vp:IU), worse than 250:1, while for Ad5 the ratio is about 20:1 and for AdF/40SL (carrying also the Ad40 long fiber) is 50:1. This phenomenon has been described for both adenovirus of the species F, Ad40 and Ad41 (Brown *et al.*, 1992), as well as when using new cell lines generated to improve virus yield (Sherwood *et al.*, 2007; Lu *et al.*, 2009).

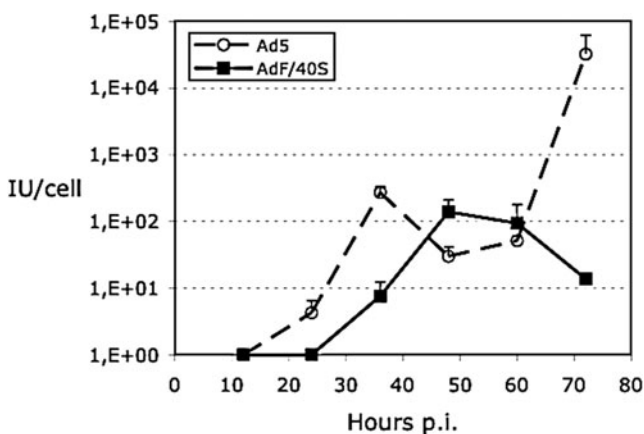


FIG. 1. Viral life cycles of Ad5 and AdF/40S. About 4×10^8 HEK 293 cells were infected with the different vectors at an MOI=1. Media and infected HEK293 cells were collected every 12 hr during 3 days. Vectors (from three independent experiments) were freeze-thawed and titered in triplicate in HEK293 cells by endpoint dilution counting the number of hexon-producing cells. MOI, multiplicity of infection.

TABLE 2. TITERS OF THE CHIMERIC ADENOVIRUS VECTORS CARRYING THE β -GALACTOSIDASE GENE USED IN THIS WORK

	pp/ml	IU/ml	Ratio pp:IU
Ad5	4.5×10^{12}	2.5×10^{11}	18:1
Ad F/40S	5.6×10^{12}	1.3×10^{10}	430:1
Ad F/540	1.8×10^{12}	6.4×10^9	280:1
Ad F/405	2.5×10^{12}	4.0×10^9	625:1
Ad F/40SL	1.5×10^{12}	2.9×10^{10}	51:1

All vectors were produced sequentially and purified by cesium chloride ultracentrifugation. Vectors were titered at the same time in HEK293 cells by endpoint dilution in triplicate counting the number of hexon-producing cells. Viral particles were measured by absorbance of disrupted virions at 260 nm.

However, Kesisoglou *et al.* (2005) have recently reported a particle-to-infectious unit ratio of 30:1 for a chimeric Ad5/41S vector when using a HEK-293 cell line carrying the Ad5 polymerase and preterminal proteins.

To determine whether the low vp:IU ratios observed for capsids carrying the F40 protein were because of the absence in HEK293 cells of an efficient receptor of the Ad40 short fiber, or to a poor interaction between the short F40 fiber and the Ad5 penton base, we used CAR-negative SKOV-3 cells as Ad5 particles can infect them only through the interaction between the hexon protein of the capsid and coagulation factor X (Waddington *et al.*, 2008). Thus, Ad5 and AdF/40S virions were incubated with factor X (FX) before infection of SKOV-3 cells. As observed in Fig. 2, efficient infection of SKOV-3 cells only occurred after incubation with FX, both with Ad5 and AdF/40S. Of note, infection levels were similar for both vectors, indicating that poor vp:IU ratios of AdF/40S in HEK293 cells are likely because of inefficient entry of the AdF/40S viral capsids.

Short-Fiber-40 protein confers protection against pH exposure

Ad40 and Ad41 enteric adenoviruses must overcome stomach conditions in order to infect the intestine. In this regard, it has been reported that, in most cases, short

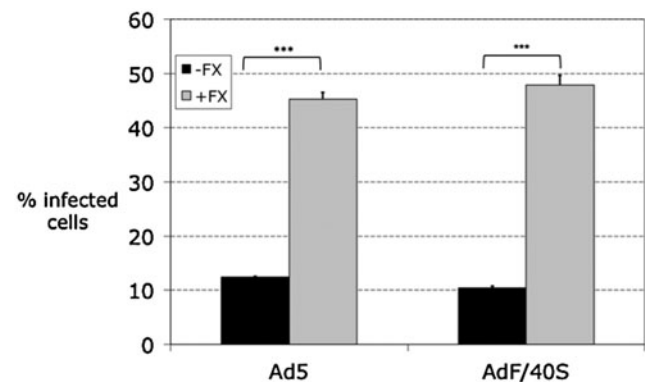


FIG. 2. Virus infection of SKOV-3 cells in the presence or absence of coagulation factor X. Ad5-GFP and AdF/40S-GFP capsids were incubated for 30 min with FX and then added to SKOV-3 cells at a proportion of 100 vp/cell. Cells were harvested 24 hr later, and the percentage of infected cells was quantified in triplicate by flow cytometry. *** $p < 0.001$.

exposure (1 min) of Ad41 to hydrochloric acid at pH 2 can slightly increase its viability, while Ad2 is inactivated in these conditions (Favier *et al.*, 2004; Lu *et al.*, 2009). Similarly, longer exposure to acid conditions found in the upper gastrointestinal tract (pH 2 and pH 4) also resulted in significantly higher viability of Ad41 compared with Ad2 vectors (Favier *et al.*, 2004). To assess if Ad5/40 chimeric vectors also behave like Ad41, we exposed them to acidic conditions.

Before infection, we calculated the predicted isoelectric points (pIs) of adenoviral fiber proteins using the EMBL WWW Gateway to Isoelectric Point Service. Interestingly, the Ad40 short fiber has a pI of 7.16, which is similar to that of the Ad40 long fiber (pI 7.07) and considerably higher than the pI of 6.00 of the Ad5 fiber (Table 3). In addition, as it happens for Ad41 (Favier *et al.*, 2004), the short-fiber protein of Ad40 has a distinct distribution of the basic and acid regions, with tail and shaft domains rich in basic amino acids (pI of 9.08) and a more neutral head domain with a pI of 6.08 (Table 3). To further analyze the role of the different domains of the Ad40 short-fiber protein in the resistance to acid conditions, we used virus particles carrying different combinations of (tail+shaft) and head domains from Ad5 fiber and Ad40 short-fiber proteins (Fig. 3A). Purified viruses were incubated at 37°C for 3, 10, and 30 min at 37°C in solutions of pH 2, pH 4, or pH 7. Then, the pH was neutralized with DMEM+0.2% FBS and HEK293 cells infected at MOI=0.4 (procedure adapted from Favier *et al.*, 2004). Six to eight hours before the end of the viral life cycle, cells lysates were analyzed, and resistance of each vector to acid exposure was represented as the percentage of infection obtained at a given pH compared with that obtained when the vector had been exposed to pH 7. As shown in Fig. 3B and C, chimeric Ad5/40 vectors carrying the tail and shaft domains of the Ad40 short-fiber protein (AdF/40S and AdF/405) resisted exposure at both pH 2 and pH 4, while particles carrying the Ad5 fiber protein (Ad5) were rapidly inactivated. Moreover, only chimeric vectors carrying the knob domain of the Ad40 short-fiber protein (AdF/40S and AdF/540) enhanced their infectivity after short exposure times (3 min) at low pH. Finally, AdF/40S, but not Ad5, can resist more acidic conditions (pH 1) particularly at short exposure times (3 min) (data not shown).

TABLE 3. PREDICTED ISOELECTRIC POINTS OF ADENOVIRAL FIBER PROTEINS WERE CALCULATED USING THE EMBL WWW GATEWAY TO ISOELECTRIC POINT SERVICE

	pI	pI (head)	pI (tail + shaft)
Fiber 5	6.00	6.33	6.11
Long-fiber Ad41	7.07	8.76	5.37
Long-fiber Ad40	7.07	8.40	5.83
Short-fiber Ad41	7.83	7.98	9.08
Short-fiber Ad40	7.16	6.92	9.10

Fiber head sequences (based on sequence alignment by Seiradake and Cusack, 2005) were nt 369–547 for Ad40 long fiber; nt 229–387 for Ad40 short fiber; nt 397–581 for Ad5 fiber; nt 384–562 for Ad41 long fiber; and 228–387 for Ad41 short fiber. Accession numbers used for the calculation of the isoelectric point (pI) of the adenoviral fibers are P18047 (Ad40 long fiber); P18048 (Ad40 short fiber); P11818 (Ad5 fiber); P14267 (Ad41 long fiber); and P16883 (Ad41 short fiber).

Ad5/40 vectors are not protected against proteases

In its normal access to the gastrointestinal tract, Ad40 is exposed to proteases. To study whether the Ad40 short-fiber protein can also protect the Ad5 capsid from the attack of the gastrointestinal proteases, Ad5 and AdF/40S were incubated for 180 min in the presence of SGF USP, and added to HEK293 cells. Then, virus infectivity was estimated by luminometry 6–8 hr before the end of the viral cycle. As observed in Fig. 4, both Ad5 and AdF/40S vectors are inactivated by the SGF even at short times (10 min), indicating that the presence of the short-fiber protein may to some extent delay, but not eliminate, the inactivation of the capsid by proteases.

Transduction of human enteric cell lines by Ad5/40 vectors

To study whether the addition of the entire Ad40 short-fiber protein facilitates the entry of Ad5 particles into human intestinal epithelial cells, we transduced different human enteric cell lines and plotted the levels of transduction of these cell lines with respect to those observed in HEK293 cells. As observed in Fig. 5, except in one case, AdF/40S showed similar or higher infection efficiency than the Ad5 vector, while it hardly transduces HEK293 cells or HeLa cells.

In vivo enteric tropism of AdF/40S

Chimeric Ad5/40 vectors were engineered to target intestinal cells. To confirm that the hepatic tropism of Ad5 vectors after intravenous administration is abolished by fiber pseudotyping, we analyzed the biodistribution of the chimeric vectors. To this end, 10¹⁰ viral particles of each vector were intravenously administered into CD1 mice. Animals were euthanized 3 days and 2 weeks later, and 15 different organs were collected. Vector tropism was measured by analyzing β-galactosidase expression in the harvested organs. Results are shown in relative luminescence units, which corresponds to β-galactosidase activity and is proportional to the ability of each vector to infect target cells. As shown in Fig. 6A, after intravenous administration, Ad5 vectors transacted the liver much more efficiently than any of the chimeric vectors, as described by Nakamura and collaborators (Nakamura *et al.*, 2003). As expected, for this route of inoculation, chimeric Ad5/40 vectors were very inefficient to infect organs other than the liver, including the gastrointestinal tract, while Ad5 vectors were able to infect also spleen and muscle though at lower level than in liver. Of note, after intravenous administration, only animals receiving Ad5 (but not chimeric Ad5/40 vectors) showed splenomegaly. Taking into account the natural enteric tropism of wild-type Ad40 virus, we administered a dose of 1×10¹⁰ viral particles of each vector (oral and rectal routes). Three days or 2 weeks later, animals were euthanized, organs were collected, and β-galactosidase expression was quantified by luminometry. As observed in Fig. 6B and C, none of the vectors were able to infect efficiently the nongastrointestinal organs. Interestingly, transgene expression was observed in colon particularly after rectal administration of the chimeric Ad F/40S, which carries the whole short-fiber-40 protein. In contrast to intravenous administration, none of the transduced animals showed symptoms of cytotoxicity or splenomegaly. As expected, the transgene expression at 2 weeks was greatly

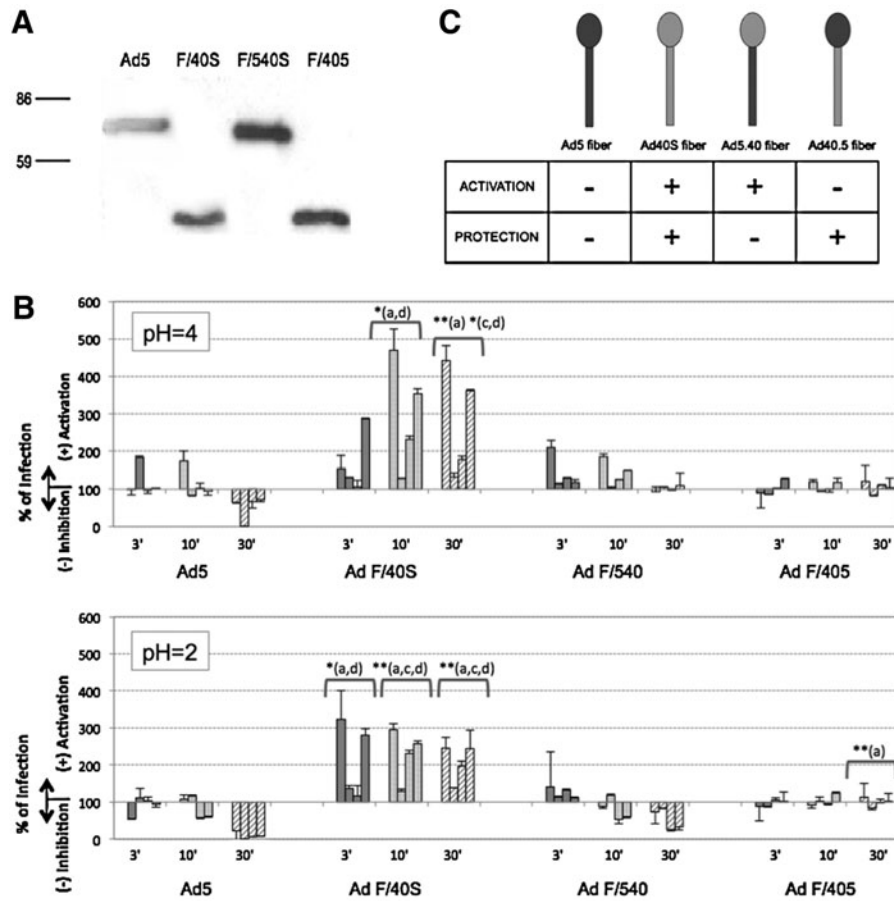


FIG. 3. Inactivation of adenovirus vectors after exposure to low pH. **(A)** HEK293 cells were infected with vectors at an MOI=0.4. One microliter of every Ad was incubated (1.2×10^5 IU/ μ l) during 3, 10, or 30 min at 37°C with 50 μ l of a HCl solution (pH 2.0 or pH 4.0) or with Dulbecco's modified Eagle's medium (pH 7.0). Afterward, HEK293 cells seeded in a 24-well plate were infected with 500 μ l of the viral solution exposed to acid. The infectivity was estimated by luminometry in triplicate from four independent experiments. Results (in percentage) show the activation or inhibition of the infection after exposure to acid, where 100% is the level of infection for the virus incubated in Dulbecco's modified Eagle's medium. **(B)** Hypothetical role of the different parts of the Ad40 short-fiber protein in the protection or activation of the viral capsid when exposed to low pH conditions. Error bars represent the standard deviation. Values were analyzed by one-way analysis of variance test with Tukey's honestly significant difference post-test. NS means that no statistical differences were found among the same time-point samples after one-way analysis of variance test. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. (a) Compared to Ad5; (c) compared to Ad F/540; (d) compared to Ad F/405. **(C)** Identification of the fiber protein of Ad5 and AdF/40S virus. About 5×10^9 physical particles of each virus were loaded on sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis and Western blotted using the monoclonal antibody 4D2, which recognizes the first 17 amino acids of the Ad5 fiber tail. Although not completely homologous, the antibody also recognizes the tail region of the chimeric fiber. As expected, the fiber F/540 has a similar size to the fiber F5 (61.5 kDa), while the fiber F/405 has a similar size to the fiber F/40S (41.4 kDa).

reduced (about 500 \times) and close to background, though β -galactosidase expression from Ad5/F40S was still about three times higher than that from Ad5 (data not shown).

To identify the cell types mainly infected by AdF/40S in colon, a dose of 1×10^{10} viral particles of Ad5 and AdF/40S carrying the GFP marker gene was given by intrarectal administration. Three days later, samples from colon, stomach, and thin intestine were taken and analyzed by immunohistochemistry. As seen in Fig. 7, strong GFP expression was observed mainly in colon, especially in animals transduced with AdF/40S-GFP, and in less degree in animals transduced with Ad5-GFP. Interestingly, transgene expression was not detected in epithelial cells, but in cells of the mucosa. Further analysis using antibodies against somatostatin as a marker for enteroendocrine cells showed that most of the

GFP-expressing cells (Fig. 7A) are endocrine cells, though also local macrophages of the intestinal mucosa were also efficiently transduced by AdF/40S (Fig. 7B).

Discussion

Ad40 viruses have two fiber proteins in equal ratio: a long fiber (F40L), which interacts with CAR, and a short fiber (F40S), which has an unknown role, although it might be responsible of the gastrointestinal tropism (Favier *et al.*, 2004). In contrast, chimeric AdF/40S vectors have only the F40S protein, while the rest of the proteins are from Ad5. In this regard, an inefficient or unstable interaction between the F40S protein and the Ad5 penton base could lead to the loss of infectivity and explain the poor vp:IU ratio observed for

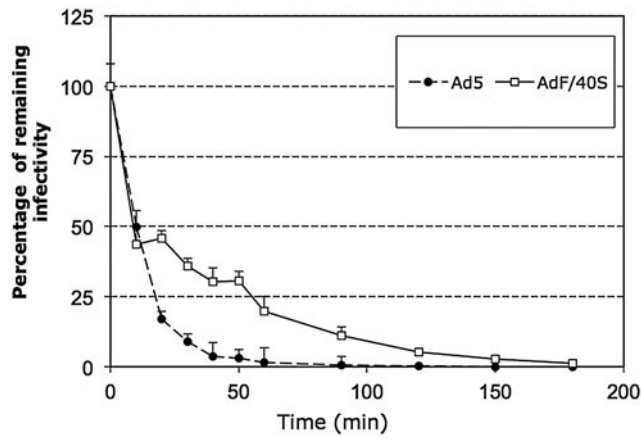


FIG. 4. Effect of exposure to proteases on the virus viability. Ad5 and AdF/40S were incubated for 180 min at 37°C with simulated gastric fluid and then infected HEK293 at an MOI=1. The infectivity was calculated by luminometry (n=3). Results (in percentage) show the inhibition of the infection after exposure to simulated gastric fluid, where 100% is the level of infection at time 0 min.

chimeric AdF/40S vectors. However, we have demonstrated that chimeric Ad5/F40S capsids keep their infectivity by forcing their entry into the cell through the hexon-FX bridge and not through the fiber protein. If capsid were unstable, the infectivity of the chimeric vectors would be poor regardless the viral protein used to enter into the cell. These results are in agreement with the Ad3/F5 chimeric adenovirus, where Ad5 fiber is efficiently incorporated into the penton base of Ad3 particles (Von Seggern *et al.*, 1998).

The fiber protein of adenoviruses allows the interaction with specific receptors of the cell membrane and facilitates the entry of the virion into the cell. However, it has been hypothesized that the short-fiber protein of Ad40 and Ad41 might play a second role by protecting the viral capsid from the low pH conditions found within the gastrointestinal tract (Favier *et al.*, 2004). Thus, Favier and collaborators have demonstrated that Ad41 vectors are able to resist a low pH

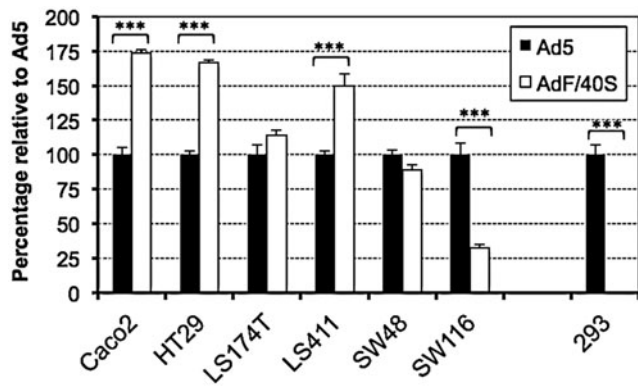


FIG. 5. Infection of different human intestinal cell lines by Ad5-GFP and AdF/40S-GFP vectors (10 vp/cell). Infection values per cell line were normalized to 100% for Ad5-GFP. Results from two independent experiments and n=3 per condition. Error bars represent the standard deviation. Values were analyzed by Student's t-test. ***p<0.001.

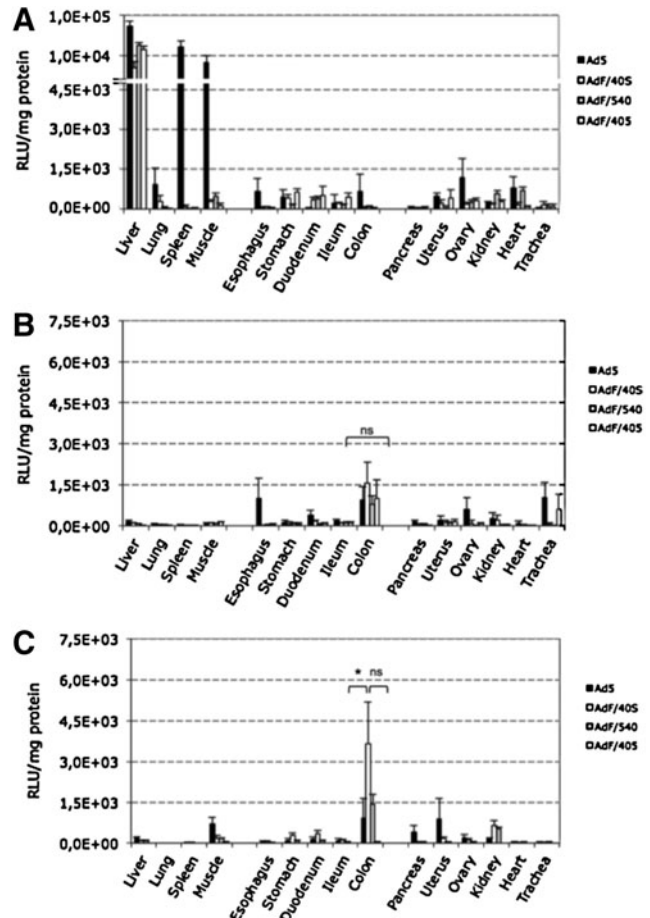


FIG. 6. Biodistribution of pseudotyped Ad5/40 vectors in mice. β -galactosidase activity (relative light units/mg protein) in 15 different organs (n=4 or 5) after intravenous (A), oral (B), or rectal (C) administration of 1×10^{10} viral particles containing the β -galactosidase gene. *p<0.05; ns, not statistically significant.

(Nakamura *et al.*, 2003) and can even be slightly activated, by short time exposure to low pH (Favier *et al.*, 2004). Since the few reports published thus far have been performed using full Ad41 particles, we decided to use chimeric Ad5 vectors carrying combinations of different domains of the short-fiber protein to ascertain whether or not this protective role toward the gastrointestinal lumen milieu is attributable to the short protein.

Unexpectedly, chimeric vectors (AdF/40S and AdF/540) carrying the knob domain of the Ad40 short protein increased their infectivity when exposed to low pH, which could be because of conformational changes of the knob domain at low pH. Since the knob domain is mainly involved in the interaction with receptors at the cell membrane, viruses Ad41 and Ad40 may have evolved to take advantage of the aggressive environmental conditions found during their transit through the gastrointestinal tract. Interestingly, chimeric Ad5 vectors carrying the tail and shaft domains (AdF/40S and AdF/405) were still active after exposure to pH 2 for 30 min, while particles carrying the Ad5 fiber protein were rapidly inactivated. This suggests that regions rich in basic aminoacids of the tail and shaft domains could

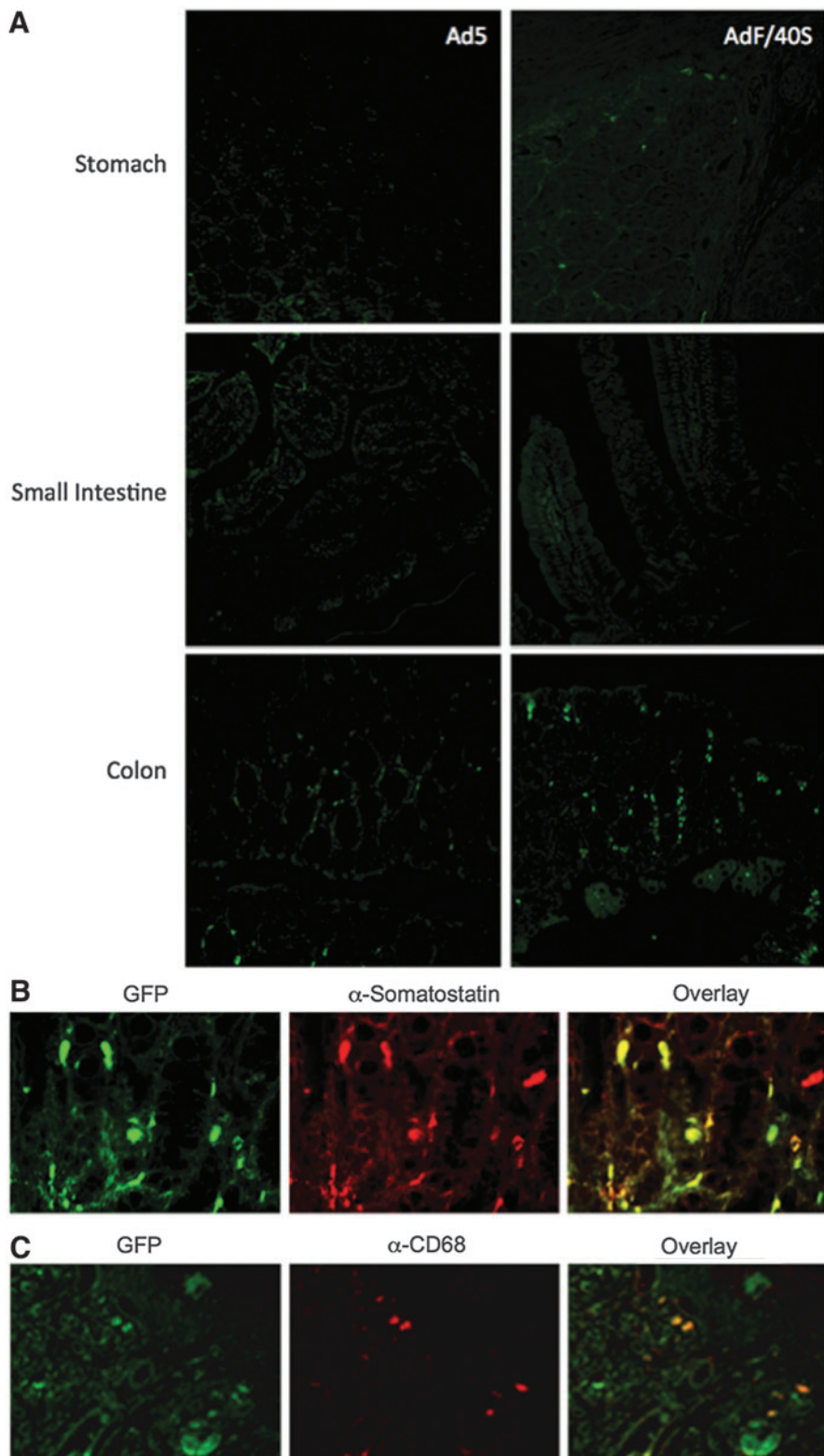


FIG. 7. Immunohistochemistry analysis. Mice received 1×10^{10} viral particles of Ad5-GFP or AdF/40S-GFP by rectal administration. **(A)** Sections from stomach, colon, and small intestine. Samples were obtained 3 days later and analyzed by confocal microscopy. Enteroendocrine cells **(B)** and local macrophages **(C)** were the main types expressing the GFP transgene. GFP expression was visualized directly. Antibodies against somatostatin or CD68 were used to detect enteroendocrine cells or macrophages respectively. Color images available online at www.liebertpub.com/hgtb

buffer the low pH conditions of the gastrointestinal tract. In this regard, though the genetic origin of the short fiber is unknown, it is attractive to consider the short-fiber gene as a result of an ancient gene duplication followed by gain of a new function, which led to an adaptive advantage increasing the chances of infecting the gastrointestinal tract of the host,

a niche not successfully targeted by other adenovirus types. However, by incubation with SGF, we have demonstrated that the presence of the Ad40 short-fiber protein is not sufficient to protect the Ad5 capsid against the action of the proteases from the gastric fluid, and therefore protease resistance of Ad40 virus must come from other viral proteins.

Apart from the aggressive environmental conditions, the presence of protective extracellular barriers or the unavailability of specific receptors in the apical membrane of intestinal cells makes the intestinal epithelium a difficult target for gene therapy strategies. In this regard, Nakamura and collaborators had previously demonstrated that intravenous administration of the AdF/40S vector results mainly in liver and spleen transduction, as shown by the presence of viral DNA and transgene expression, while the virus was hardly detected in the intestine (Favier *et al.*, 2004). However, though some liver transduction by AdF/40S has been found, it occurs with an efficiency much lower than that of Ad5 vectors (as shown in Fig. 6A).

To analyze the intestinal tropism of Ad5/40 vectors, we administered the chimeric vectors directly into the gastrointestinal tract of healthy mice and demonstrated how, especially after rectal administration, AdF/40S vectors are able to infect the colon and, to a lesser extent, the small intestine, without signs of cytotoxicity or splenomegaly. Interestingly, AdF/40S preferentially transduced enteroendocrine cells and local macrophages, which, compared with epithelial cells, have a longer cell turnover and therefore are more attractive as target cells for gene therapy strategies. In addition, we have also demonstrated that AdF/40S vectors are able to infect different human intestinal cells (HT29, Caco2, HCT116, and SW480, though not SW1116) in a similar or higher efficiency than Ad5 vectors, pointing out the chimeric adenovirus AdF/40S as very interesting vectors to selectively deliver genes to treat intestinal diseases. Surprisingly, in spite of the very high homology between Ad40 and Ad41 fiber proteins (Kidd *et al.*, 1990), the short-fiber protein of Ad41 does not appear to mediate the intestinal tropism of Ad41 in human intestinal biopsy (Favier *et al.*, 2004). Discrepancies in the model used, the administration system, or the small discordances in the sequence between the short fibers of Ad40 and Ad41 vectors may explain the observed differences. However, it is necessary to highlight that, thus far, only those adenovirus types having two types of fiber proteins [Ad40, Ad41, and the recently described Ad52 (Jones *et al.*, 2007) of the species G] exhibit an intestinal tropism. Since the generation of chimeric AdF/40S mutants has shown to ablate CAR binding while conferring a novel tropism to Ad5 viral vectors (Favier *et al.*, 2004), and since the Ad40 long-fiber protein is hypothesized to interact with the CAR receptor, the short-fiber protein should be responsible not only for the protection against the low pH conditions in the gastrointestinal tract, but also for the intestinal tropism.

In fact, our results show that the Ad40 short-fiber protein seems to be responsible also for the extended duration of viral life cycle for adenovirus Ad40 in HEK-293 cells, since the AdF/40S vector has a cycle between 48 and 60 hr, compared with the 36-hr-long cycle of Ad5. Moreover, the Ad40 short-fiber protein also seems to account for the poor infectivity ratio (infectious unit per viral particle) in HEK-293 cells. Indeed, the chimeric AdF/40S capsid is still as infective as Ad5 capsids in SKOV-3 cells, which are devoid of CAR and can only be infected upon FX-hexon interaction (Waddington *et al.*, 2008). Tiemessen and Kidd (1994) have suggested that the growth defectiveness shown by species F adenoviruses is a multifactorial phenomenon, while Leung and Brown (2011) reported that the poor infectivity of Ad40 and Ad41 vectors in HEK293 cells would be caused by a blockade of the entry

and trafficking of the viral particle into the cell. Our results indicate that, at least for Ad40, the short-fiber protein is a crucial player in both poor infectivity and inefficient growth in permissive HEK-293 cells; therefore, strategies to improve the amplification of chimeric Ad5/40 and Ad5/41 vectors should take into account this fact. In conclusion, our results point at the chimeric adenovirus AdF/40S as an attractive gene therapy vector for diseases affecting the intestine.

Acknowledgments

The authors wish to thank Dr. Mercè Monfar for critically reading the manuscript. This work is supported by ISCIII-PI1000561, SGR2009-1300, SGR 2009-0997, Marato de TV3, and Association Francaise contre les Myopathies (AFM#12277). E.R., C.R., M.M., and J.F.B. have been recipients of FPU-Ministerio de Educación fellowships.

Author Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

References

- Alba, R., Hearing, P., Bosch, A., and Chillon, M. (2007). Differential amplification of adenovirus vectors by flanking the packaging signal with attB/attP-PhiC31 sequences: implications for helper-dependent adenovirus production. *Virology* 367, 51–58.
- Brown, M., Wilson-Friesen, H.L., and Doane, F. (1992). A block in release of progeny virus and a high particle-to-infectious unit ratio contribute to poor growth of enteric adenovirus types 40 and 41 in cell culture. *J. Virol.* 66, 3198–3205.
- Chen, J., Yang, W.L., Li, G., *et al.* (2004). Transfection of mEpo gene to intestinal epithelium *in vivo* mediated by oral delivery of chitosan-DNA nanoparticles. *World J. Gastroenterol.* 10, 112–116.
- Chillón, M., and Alemany, R. (2010). *Methods to Construct Recombinant Adenovirus Vectors* (Humana Press, New York).
- Croyle, M.A., Stone, M., Amidon, G.L., and Roessler, B.J. (1998). *In vitro* and *in vivo* assessment of adenovirus 41 as a vector for gene delivery to the intestine. *Gene Ther.* 5, 645–654.
- Duan, D., Yue, Y., Yan, Z., *et al.* (2000). Endosomal processing limits gene transfer to polarized airway epithelia by adeno-associated virus. *J. Clin. Invest.* 105, 1573–1587.
- Esclatine, A., Bellon, A., Michelson, S., *et al.* (2001). Differentiation-dependent redistribution of heparan sulfate in epithelial intestinal Caco-2 cells leads to basolateral entry of cytomegalovirus. *Virology* 289, 23–33.
- Farlow, S.J., Jerusalmi, A., and 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.* 7, 83.
- Favier, A.L., Schoehn, G., Jaquinod, M., *et al.* (2002). Structural studies of human enteric adenovirus type 41. *Virology* 293, 75–85.
- Favier, A.L., Burmeister, W.P., and Chroboczek, J. (2004). Unique physicochemical properties of human enteric Ad41 responsible for its survival and replication in the gastrointestinal tract. *Virology* 322, 93–104.
- Foreman, P.K., Wainwright, M.J., Alicke, B., *et al.* (1998). Adenovirus-mediated transduction of intestinal cells *in vivo*. *Hum. Gene Ther.* 9, 1313–1321.
- Hamilton, T., Dematteo, R., McClane, S., *et al.* (1997). Adenoviral-mediated gene transfer to murine small intestine is more efficient in neonates than adults. *J. Pediatr. Surg.* 32, 373–377.

- Jones, M.S., II, Harrach, B., Ganac, R.D., *et al.* (2007). New adenovirus species found in a patient presenting with gastroenteritis. *J. Virol.* 81, 5978–5984.
- Kanbe, T., Murai, R., Mukoyama, T., *et al.* (2006). Naked gene therapy of hepatocyte growth factor for dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 345, 1517–1525.
- Kesisoglou, F., Chamberlain, J.R., Schmiedlin-Ren, P., *et al.* (2005). Chimeric Ad5 vectors expressing the short fiber of Ad41 show reduced affinity for human intestinal epithelium. *Mol. Pharm.* 2, 500–508.
- Kesisoglou, F., Schmiedlin-Ren, P., Fleisher, D., *et al.* (2006). Restituting intestinal epithelial cells exhibit increased transducibility by adenoviral vectors. *J. Gene Med.* 8, 1379–1392.
- Kidd, A.H., Erasmus, M.J., and Tiemessen, C.T. (1990). Fiber sequence heterogeneity in subgroup F adenoviruses. *Virology* 179, 139–150.
- Lecollinet, S., Gavard, F., Havenga, M.J., *et al.* (2006). Improved gene delivery to intestinal mucosa by adenoviral vectors bearing subgroup B and d fibers. *J. Virol.* 80, 2747–2759.
- Leung, T.K., and Brown, M. (2011). Block in entry of enteric adenovirus type 41 in HEK293 cells. *Virus Res.* 156, 54–63.
- Lozier, J.N., Yankaskas, J.R., Ramsey, W.J., *et al.* (1997). Gut epithelial cells as targets for gene therapy of hemophilia. *Hum. Gene Ther.* 8, 1481–1490.
- Lu, Z.Z., Zou, X.H., Dong, L.X., *et al.* (2009). Novel recombinant adenovirus type 41 vector and its biological properties. *J. Gene Med.* 11, 128–138.
- Manno, C.S., Pierce, G.F., Arruda, V.R., *et al.* (2006). Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response. *Nat. Med.* 12, 342–347.
- Miyazawa, N., Leopold, P.L., Hackett, N.R., *et al.* (1999). Fiber swap between adenovirus subgroups B and C alters intracellular trafficking of adenovirus gene transfer vectors. *J. Virol.* 73, 6056–6065.
- Nakamura, T., Sato, K., and 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.
- Pieniasek, D., Pieniasek, N.J., Macejak, D., *et al.* (1990). Differential growth of human enteric adenovirus 41 (TAK) in continuous cell lines. *Virology* 174, 239–249.
- Polyak, S., Mah, C., Porvasnik, S., *et al.* (2008). Gene delivery to intestinal epithelial cells *in vitro* and *in vivo* with recombinant adeno-associated virus types 1, 2 and 5. *Dig. Dis. Sci.* 53, 1261–1270.
- Seiradake E., and Cusack, S. (2005). Crystal structure of enteric adenovirus serotype 41 short fiber head. *J. Virol.* 79, 14088–14094.
- Schmid, R.M., Weidenbach, H., Draenert, G.F., *et al.* (1994). Liposome mediated *in vivo* gene transfer into different tissues of the gastrointestinal tract. *Z. Gastroenterol.* 32, 665–670.
- Schmid, R.M., Weidenbach, H., Draenert, G.F., *et al.* (1997a). Liposome mediated gene transfer into the rat oesophagus. *Gut* 41, 549–556.
- Schmid, R.M., Weidenbach, H., Liptay, S., and Adler, G. (1997b). Direct gene transfer into the colon using a double-balloon catheter. *Endoscopy* 29, 39–43.
- Seppen, J., Barry, S.C., Klinkspoor, J.H., *et al.* (2000). Apical gene transfer into quiescent human and canine polarized intestinal epithelial cells by lentivirus vectors. *J. Virol.* 74, 7642–7645.
- Shao, G., Greathouse, K., Huang, Q., *et al.* (2006). Gene transfer to the gastrointestinal tract after peroral administration of recombinant adeno-associated virus type 2 vectors. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 43, 168–179.
- Shayakhmetov, D.M., Li, Z.Y., Ternovoi, V., *et al.* (2003). The interaction between the fiber knob domain and the cellular attachment receptor determines the intracellular trafficking route of adenoviruses. *J. Virol.* 77, 3712–3723.
- Sherwood, V., Burgert, H.G., Chen, Y.H., *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.
- Takiff, H.E., Straus, S.E., and Garon, C.F. (1981). Propagation and *in vitro* studies of previously non-cultivable enteric adenoviruses in 293 cells. *Lancet* 2, 832–834.
- Tang, S.C., and Sibley, E. (2006). Genetic modification of somatic gut mucosa: an adeno-associated virus approach. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 43, 158–159.
- Tang, S.C., Sambanis, A., and Sibley, E. (2005). Proteasome modulating agents induce rAAV2-mediated transgene expression in human intestinal epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 331, 1392–1400.
- Tiemessen, C.T., and Kidd, A.H. (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.
- Von Seggern, D.J., Kehler, J., Endo, R.I., and Nemerow, G.R. (1998). Complementation of a fibre mutant adenovirus by packaging cell lines stably expressing the adenovirus type 5 fibre protein. *J. Gen. Virol.* 79 (Pt 6), 1461–1468.
- Waddington, S.N., Mcvey, J.H., Bhella, D., *et al.* (2008). Adenovirus serotype 5 hexon mediates liver gene transfer. *Cell* 132, 397–409.
- Westbrook, C.A., Chmura, S.J., Arenas, R.B., *et al.* (1994). Human APC gene expression in rodent colonic epithelium *in vivo* using liposomal gene delivery. *Hum. Mol. Genet.* 3, 2005–2010.
- Wu, Y., Liu, J., Woo, S., *et al.* (1999). Prenatal orogastric gene delivery results in transduction of the small bowel in the fetal rabbit. *Fetal Diagn. Ther.* 14, 323–327.

Address correspondence to:

Dr. Ester Fernández
 Departament Biologia Cel·lular
 Fisiologia i Immunologia
 Universitat Autònoma Barcelona
 08193 Barcelona
 Spain

E-mail: ester.fernandez@uab.es

Dr. Miguel Chillón
 Institució Catalana de Recerca i Estudis Avançats
 Centre de Biotecnologia Animal i Teràpia Gènica
 Universitat Autònoma Barcelona
 Edifici H, Campus UAB
 Barcelona 08193
 Spain

E-mail: miguel.chillon@uab.es

Received for publication May 11, 2012;
 accepted after revision March 20, 2013.

Published online: June 7, 2013.



Método para la producción de adenovirus mosaico

WO 2012085322 A1

ABSTRACT

La presente invención, se relaciona con un método para la producción de adenovirus híbridos mosaico, que presenta la cápside de un primer tipo de adenovirus y fibras de dicho primer tipo y de un segundo, en especial la producción del adenovirus Ad5/40, que comprende: i) infectar células permisivas adaptadas al crecimiento en suspensión que expresan la fibra del primer tipo, con un adenovirus que presenta la cápside del primer tipo y la fibra del segundo, en presencia de un policatión (preferentemente polibreno); ii) cultivar dichas células; iii) recuperar las partículas virales híbridas mosaico. Por último, se pueden amplificar las partículas en células adaptadas al crecimiento en suspensión que no expresan la fibra del primer tipo de adenovirus, recuperándose las partículas del adenovirus híbrido. También se incluyen los kits y usos de dicho método.

DESCRIPTION

MÉTODO PARA LA PRODUCCIÓN DE ADENOVIRUS MOSAICO

CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCIÓN La presente invención se relaciona con un método para la producción de adenovirus mosaico y con los kits y usos de dicho método.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN La terapia génica es una de las disciplinas de la biomedicina que ha permitido desarrollar técnicas y protocolos con potencial terapéutico para tratar enfermedades de origen genético. La terapia génica consiste en la introducción de ácidos nucleicos (ADN y ARN) con finalidad terapéutica en una célula diana, para aumentar o disminuir la expresión génica de un gen específico. En general, el tratamiento de la mayoría de enfermedades genéticas por terapia génica somática requiere la expresión de un gen terapéutico durante toda la vida del paciente. Por ello, el desarrollo de vectores seguros que permitan la expresión del gen o genes de interés codificados por el ácido nucleico introducido (el transgén) durante largos periodos de tiempo, y que evite la respuesta inmune del paciente, es imprescindible para que estos vectores puedan utilizarse en protocolos de terapia génica in vivo.

Actualmente, los adenovirus (a los que se alude también mediante la abreviatura Ad) se han convertido en uno de los vectores más utilizados en ensayos clínicos en humanos, debido a los siguientes factores: el Ad puede infectar un elevado número de tipos celulares, tanto células quiescentes como células en división; las técnicas actuales de producción de Ad permiten modificar su cápside y de esta manera su tropismo celular; además, son fáciles de producir a títulos altos (hasta 10¹³ partículas/mlilitro); y son virus no integrativos, con lo que se evita la mutagénesis insercional.

Los adenovirus son virus de doble cadena de ADN que protegen su material genético mediante una cápside proteica de geometría icosaédrica, sin envuelta exterior, de cuyos vértices parten unas delgadas prolongaciones llamadas fibras. Su genoma viral contiene aproximadamente 36 Kb, flanqueado por dos ITR (repeticiones terminales invertidas) de entre 100 y 140 pb, cada una de las cuales constituye uno de los extremos del genoma adenoviral y tiene como función principal el inicio de la replicación del virus. Muy próxima a una de estas ITR se localiza la señal de empaquetamiento (ψ), que es la que dirige la encapsidación del genoma viral dentro de la cápside gracias a la interacción con diferentes proteínas adeno virales, y que se caracteriza por contener repeticiones de tipo A (TTGN8CG) en un número variable, que depende del serotipo. Al extremo del genoma del adenovirus cerca del cual se localiza la señal de empaquetamiento se le suele considerar como el extremo 5', pues es también el

Publication number	WO2012085322 A1
Publication type	Application
Application number	PCT/ES2011/070897
Publication date	Jun 28, 2012
Filing date	Dec 22, 2011
Priority date	Dec 24, 2010
Inventors	MERINO Assumpció BOSCH , 3 More »
Applicant	Institut Català De Recerca I Estudis Avançats , 1 More »
Export Citation	BiBTeX , EndNote , RefMan
Non-Patent Citations	(5) , Classifications (3) , Legal Events (3)
External Links:	Patentscope , Espacenet

CLAIMS (1)

1. REIVINDICACIONES

Un método para la obtención de un adenovirus híbrido mosaico que comprende una cápside de un primer tipo de adenovirus y fibras de dicho primer tipo de adenovirus y de al menos un segundo tipo de adenovirus que comprende

(i) infectar células permisivas que expresan la fibra de un primer tipo de adenovirus con un adenovirus que comprende la cápside de dicho primer tipo de adenovirus y fibras de un segundo tipo de adenovirus distinto al primer tipo de adenovirus,

(ii) cultivar las células obtenidas en la etapa (i) en condiciones que permitan la amplificación del adenovirus durante al menos un ciclo de replicación del adenovirus y/o de la célula permisiva,

(iii) recuperar las partículas virales del adenovirus híbrido mosaico a partir de las células obtenidas en la etapa (ii) y,

(iv) opcionalmente, repetir las etapas (i) a (iii) en donde las partículas virales obtenidas en la etapa (iii) se utilizan para la infección en la etapa (i) del siguiente ciclo de amplificación,

en donde las células permisivas son células adaptadas al crecimiento en suspensión y en donde la etapa (i) se lleva a cabo en presencia de un policatión.

Un método según la reivindicación 1 en el que las partículas virales del adenovirus híbrido mosaico recuperadas en la etapa (iii) o (iv) son sometidas a una etapa final de amplificación en células adaptadas al crecimiento en suspensión que no expresan la fibra del primer tipo de adenovirus, recuperándose partículas virales del adenovirus híbrido no mosaico.

Un método según la reivindicación 2 en el que la etapa final de amplificación en células adaptadas al crecimiento en suspensión que no expresan la fibra del primer tipo de adenovirus se lleva a cabo en presencia de un policatión.

extremo que tiene más próxima la región E1, que contiene los genes que se expresan en primer lugar. El genoma está dividido en genes tempranos (E1-E4), que se transcriben en las primeras fases del ciclo, justo antes de la replicación del ADN viral, y en genes tardíos (L1-L5), transcritos en una fase posterior (producción proteica y encapsidación). Se han identificado más de 100 serotipos de adenovirus, de los cuales unos son capaces de infectar mamíferos y otros aves. Entre los adenovirus que infectan mamíferos se encuentran adenovirus capaces de afectar a los seres humanos, organismos cuya principal diana es el tracto respiratorio, en el que es típico que provoquen resfriados o incluso faringitis.

Algunos adenovirus pueden causar también distintos tipos de conjuntivitis y, con menor frecuencia, cistitis y gastroenteritis. Los adenovirus son capaces de infectar otros órganos, aunque es habitual que den lugar en ellos a infecciones asintomáticas. Con la finalidad de mejorar el tropismo de algunos de estos serotipos, se han creado adenovirus quiméricos que presentan la cápside de un tipo de adenovirus y la fibra de otro tipo de adenovirus. O incluso fibras quimera formadas por fragmentos de diferentes tipos de adenovirus. Un caso particular es el del adenovirus humano de serotipo 40, que es un adenovirus entérico que forma parte del subgrupo F (AdF). Este serotipo adenoviral es un importante agente etiológico de gastroenteritis en niños (Cunliffe NA y cois. *Emerg Infect Dis* 2010, 16:55-62; Uhnou I y cois. *J Clin Microbiol* 1984, 20:365-372; Wilhelmi I y cois. *Clin Microbiol Infect* 2003, 9:247-262), y un vector muy interesante para terapia génica en enfermedades intestinales, tales como la enfermedad de Crohn, puesto que presenta un tropismo entérico. Ad40 no puede crecer en HeLa y en otras líneas celulares, pero sí puede propagarse en células HEK-293 (Brown M y cois. *J Virol* 1992, 66:3198-3205; Hashimoto S y cois. *J Virol* 1991; 65:429-2435). Habitualmente, la primera interacción del adenovirus con la célula huésped se produce entre la proteína de la fibra del adenovirus y el receptor de coxsackievirus y adenovirus (CAR) de la superficie celular a infectar. Se ha descrito que Ad40 contiene dos fibras diferentes: una larga y otra corta. La fibra larga se une a CAR, mientras que la fibra corta no lo hace y se ha sugerido que es la responsable del tropismo entérico de dicho adenovirus.

Aunque el Ad40 es capaz de infectar células HEK-293, su producción in vitro aún no es lo suficientemente eficiente, ya que Ad40 se produce en bajos títulos en comparación con otros subgrupos adenovirales (Sherwood V y cois. *J Gen Virol* 2007, 88:71-6). Para superar la dificultad en la producción de Ad40 y el amplio tropismo de la vía de entrada dependiente de CAR, se han diseñado vectores quiméricos Ad5/40S, compuestos por la cápside del Ad5 y la proteína de la fibra corta del Ad40 (F40S). Estos vectores quiméricos tienen la ventaja de aunar el hipotético tropismo entérico de F40S junto con la caracterización exhaustiva del genoma/proteoma de Ad5, debido a su uso en ensayos clínicos humanos (*Journal of Genetic Medicine Website*, www.wiley.co.uk/genmed/clinical). Como se ha demostrado recientemente, los vectores quiméricos Ad5/40S conservan el tropismo intestinal conferido por la proteína de la fibra corta del Ad40 y la resistencia a pH ácidos (Rodríguez E y cois. *Mol Ther* 2006, 12:S5), que es esencial en la administración oral, ya que los vectores han de atravesar el estómago exponiéndose a pH ácidos antes de llegar al intestino.

Diferentes grupos de investigación han desarrollado protocolos para amplificar vectores quiméricos incluyendo Ad5/41 y Ad5/40 (Tiemessen CT y cois. *J Virol* 1994 68: 1239-1244). Sin embargo, aunque la producción in vitro del adenovirus quimérico Ad5/40S es más eficiente que la del Ad40 salvaje, la productividad por célula aún no es lo suficientemente alta y los protocolos son largos y consumen tiempo. Por lo tanto, sería deseable disponer de un protocolo de amplificación de adenovirus híbridos o quiméricos, y en particular de vectores quiméricos Ad5/40S, que permita su producción a gran escala. COMPENDIO DE LA INVENCIÓN

En un primer aspecto, la invención se relaciona con un método para la obtención de un adenovirus híbrido mosaico que comprende una cápside de un primer tipo de adenovirus y fibras de dicho primer tipo de adenovirus y de al menos un segundo tipo de adenovirus que comprende

(i) infectar células permisivas que expresan la fibra de un primer tipo de adenovirus con un adenovirus que comprende la cápside de dicho primer tipo de adenovirus y fibras de un segundo tipo de adenovirus distinto al primer tipo de adenovirus,

(ii) cultivar las células obtenidas en la etapa (i) en condiciones que permitan la amplificación del adenovirus durante al

4. Un método según las reivindicaciones 2 ó 3 donde las células adaptadas al crecimiento en suspensión que no expresan la fibra del primer tipo de adenovirus son células HEK293S.

5. Un método según las reivindicaciones 2 ó 3 donde las células adaptadas al crecimiento en suspensión que no expresan la fibra del primer tipo de adenovirus son células 293F.

6. Un método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde el policondición es polibreno. 7. Un método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que el primer tipo de adenovirus pertenece al subgrupo C y/o el segundo tipo de adenovirus pertenece al subgrupo F.

8. Un método según la reivindicación 7 donde el adenovirus que pertenece al subgrupo C es adenovirus tipo 5 y/o el adenovirus que pertenece al subgrupo F es adenovirus tipo 40.

9. Un método según la reivindicación 8 en donde cada ciclo de amplificación tiene una duración de entre 44 y 64 horas.

10. Un método según la reivindicación 9 en donde cada ciclo de amplificación tiene una duración de entre 48 y 56 horas.

11. Un método según la reivindicación 10 en donde cada ciclo de amplificación tiene una duración de 56 horas.

12. Un kit para la amplificación de un adenovirus híbrido mosaico comprendiendo dicho adenovirus una cápside de un primer tipo de adenovirus y fibras de al menos dos tipos de adenovirus, siendo uno de los tipos de adenovirus de las fibras del mismo tipo que la cápside, donde dicho kit comprende:

a) al menos una línea celular permisiva que expresa la fibra del primer tipo de adenovirus apta para el cultivo en suspensión y b) un policondición

13. Un kit según la reivindicación 12 que adicionalmente comprende un adenovirus híbrido o al menos un polinucleótido que permita generar dicho adenovirus.

14. Un kit según cualquiera de las reivindicaciones 12 ó 13 que adicionalmente comprende al menos una línea celular adaptada al crecimiento en suspensión que no expresa la fibra del primer tipo de adenovirus. 15. Un kit según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14 donde el policondición es polibreno.

16. Un kit según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15 donde el primer tipo de adenovirus pertenece al subgrupo C y/o el segundo tipo de adenovirus pertenece al subgrupo F.

17. Un kit según la reivindicación 16 donde el adenovirus que pertenece al subgrupo C es adenovirus tipo 5 y/o el adenovirus que pertenece al subgrupo F es adenovirus tipo 40.

18. Uso de un kit según las reivindicaciones 12 a 17 para la amplificación de un adenovirus híbrido mosaico.

menos un ciclo de replicación del adenovirus y/o de la célula permisiva, (iii) recuperar las partículas virales del adenovirus híbrido mosaico a partir de las células obtenidas en la etapa (ii) y,

(iv) opcionalmente, repetir las etapas (i) a (iii) en donde las partículas virales obtenidas en la etapa (iii) se utilizan para la infección en la etapa (i) del siguiente ciclo de amplificación,

en donde las células permisivas son células adaptadas al crecimiento en suspensión y en donde la etapa (i) se lleva a cabo en presencia de un policatión.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un kit para la amplificación de un adenovirus híbrido mosaico comprendiendo dicho adenovirus una cápside de un primer tipo de adenovirus y fibras de al menos dos tipos de adenovirus, siendo uno de los tipos de adenovirus de las fibras del mismo tipo que la cápside, donde dicho kit comprende:

a) al menos una línea celular permisiva que expresa la fibra del primer tipo de adenovirus apta para el cultivo en suspensión y

b) un policatión. Aún en otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de un kit según la invención para la amplificación de un adenovirus híbrido mosaico.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. A) Curva de crecimiento celular y viabilidad de las células 21 IBS adaptadas al crecimiento en suspensión. B) Tiempo de duplicación de la línea celular 21 IBS adaptada al crecimiento en suspensión. Figura 2. Eficiencia de infección de las células 21 IBS por Ad5/40S con polibreno. Se muestra el porcentaje de las células infectadas mediante la cuantificación de la expresión de GFP (proteína verde fluorescente).

Figura 3. A) Esquema de la producción de adenovirus quiméricos Ad5/40S según el método de la invención. B) Características de los diferentes tipos de adenovirus relacionados con la producción de Ad5/40S. N.T.: No Testado.

Figura 4. Ciclo de los adenovirus mosaico Ad5/40S en células 21 IBS. IU: Unidades Infecciosas del virus.

Figura 5. Diagrama (A) y tabla (B) comparativos entre el protocolo nuevo y el clásico. IU: Unidades Infecciosas del virus; PP: partículas físicas.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Los autores de la presente invención han desarrollado un método que, de forma sorprendente, permite una amplificación eficiente y escalable de adenovirus híbridos de difícil obtención y, especialmente, de adenovirus híbridos Ad5/40, reduciendo a un tercio el número de etapas de amplificación, el tiempo y el coste, así como reduciendo también el riesgo de generación de virus competentes en replicación.

Para ello, los inventores han utilizado células permisivas adaptadas al crecimiento en suspensión que expresan la fibra de un tipo de adenovirus distinto al de la fibra del adenovirus híbrido que se pretende amplificar y del mismo tipo que la cápside de dicho adenovirus, y han realizado la infección de dichas células en presencia de un policatión. Las partículas virales del adenovirus híbrido mosaico recuperadas pueden someterse posteriormente a una etapa final de amplificación en células que no expresan la fibra del tipo de adenovirus anterior para recuperar las partículas virales del adenovirus híbrido original, es decir, de adenovirus híbrido no mosaico.

MÉTODO DE LA INVENCION

Por tanto, en un primer aspecto, la invención se relaciona con un método para la obtención de un adenovirus híbrido mosaico que comprende una cápside de un primer tipo de adenovirus y fibras de dicho primer tipo de adenovirus y de al menos un segundo tipo de adenovirus que comprende

(i) infectar células permisivas que expresan la fibra de un primer tipo de adenovirus con un adenovirus que comprende la cápside de dicho primer tipo de adenovirus y fibras de un segundo tipo de adenovirus distinto al primer tipo de adenovirus,

(ii) cultivar las células obtenidas en la etapa (i) en condiciones que permitan la amplificación del adenovirus durante al menos un ciclo de replicación del adenovirus y de la célula permisiva,

(iii) recuperar las partículas virales del adenovirus híbrido mosaico a partir de las células obtenidas en la etapa (ii) y,

(iv) opcionalmente, repetir las etapas (i) a (iii) en donde las partículas virales obtenidas en la etapa (iii) se utilizan para la infección en la etapa (i) del siguiente ciclo de amplificación,

en donde las células permisivas son células adaptadas al crecimiento en suspensión y en donde la etapa (i) se lleva a cabo en presencia de un policatión.

Por "adenovirus" se entiende en la presente invención todos aquellos virus pertenecientes a la familia Adenoviridae, que poseen un genoma de ADN bicatenario lineal, carecen de envoltura y tienen forma icosaédrica. Los adenovirus son capaces de infectar tanto a humanos como a animales. Los adenovirus de la presente invención incluyen, sin limitación, adenovirus aviar, caninos, equinos, bovinos, ovinos, porcinos, humanos o de la rana. En una realización preferida los adenovirus de la invención son adenovirus humanos.

Por "adenovirus quiméricos", "adenovirus quimera" o "adenovirus híbridos" según se utiliza indistintamente en este

documento, se entienden adenovirus formados a partir de la combinación de elementos procedentes de distintos serotipos. En el contexto de la presente invención son adenovirus cuyo genoma codifica para una cápside de un serotipo y fibras de al menos un serotipo distinto al de la cápside. Cada una de las fibras del adenovirus quimera o híbrido puede proceder de un único serotipo wild-type o de una variante funcionalmente equivalente que presenta al menos el 60%, 65%, 70%, 72%, 74%, 76%, 78%, 80%, 90%, 95%, 97%, 99% de similitud o identidad con la secuencia proteica de la fibra del serotipo wild-type. El grado de identidad entre dos polipéptidos se determina usando algoritmos implementados en ordenador y métodos que son ampliamente conocidos por los expertos en la materia. La identidad entre dos secuencias de aminoácidos se determina preferiblemente usando el algoritmo BLASTP (BLAST Manual, Altschul, S. et al, NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894, Altschul, S., et al, J., 1990, Mol. Biol. 215:403-410). Dichas variantes funcionalmente equivalentes pueden ser el producto de deleciones, inserciones, inversiones, repeticiones y sustituciones de aminoácidos. La variante puede consistir en cambios conservativos, en los que se ha sustituido un aminoácido por otro con propiedades estructurales y químicas similares, por ejemplo, el reemplazamiento de leucina por isoleucina; o cambios no conservativos, por ejemplo cuando se reemplaza una glicina por un triptófano.

Otras variantes contempladas en la presente invención son aquellas en las que se ha producido la inserción de una secuencia heteróloga en la cabeza de la fibra (Krasnykh V y cois. J. Virol 1998, 72: 1844-1852).

Las fibras de los adenovirus híbridos o adenovirus quimera también pueden ser fibras híbridas o quiméricas, que han sido modificadas incorporando a su extremo C-terminal motivos que facilitan la interacción del adenovirus con la célula huésped (Michael SI y cois. Gene Therapy 1995, 2:660-668; Wickham TJ y cois. J Virol 1997, 71 :8221-8229), o eliminando el dominio globular y sustituyéndolo por otras secuencias de unión (según se describe en las solicitudes de patente internacional WO01/81607 y WO01/02431). Los adenovirus quimera o adenovirus híbridos contemplados en la invención también pueden incluir fibras quiméricas formadas por segmentos procedentes de diferentes serotipos. Ejemplos de adenovirus con fibras quiméricas procedentes de diferentes serotipos se encuentran, por ejemplo, en la solicitud de patente internacional WO9850053, donde se describen adenovirus recombinantes Ad5 en los que la cabeza de la proteína fibra original ha sido sustituida por la perteneciente a Ad3.

Estos adenovirus quimera o adenovirus híbridos son vectores adenovirales recombinantes que pueden generarse por técnicas de biología molecular conocidas en el estado de la técnica (Horwitz MS, "Adenoviruses", en Fields Virology, tercera edición, editado por B.N. Fields y cois., Lippincott-Raven Publishers: Philadelphia, Pa (1996)).

La partícula del adenovirus consiste en una cápside que encapsula la molécula de ADN vírico. El término "cápside" se refiere a la cubierta externa del adenovirus, que está formada por subunidades llamadas capsómeros, que pueden ser hexagonales y pentagonales. La mayor parte de la cápside está constituida por la proteína hexona, y en cada vértice hay un complejo formado por las proteínas base pentona y fibra. El término "fibra", según se utiliza en el presente documento, se refiere a la proteína fibra asociada a cada base pentona de la cápside del adenovirus, y cuya función es facilitar la unión del adenovirus a la superficie de la célula que infecta (Philipson y cois. J Virol 1968, 2: 1064-1075). Las fibras de adenovirus son proteínas triméricas que consisten en un dominio globular C-terminal o cabeza, que contiene la putativa región de unión al receptor celular; un eje fibroso central; y una parte N-terminal o cola, que se une a la cápside viral. En presencia del dominio C-terminal globular, que es necesario para la correcta trimerización, el segmento central adopta una conformación beta-espiral triple. Las proteínas de la fibra se incorporan como trímeros en la estructura de la cápside, constituyendo proyecciones delgadas que parten de los vértices del icosaedro. Hay 12 homotrímeros de fibra por cada partícula viral.

El término "adenovirus híbrido mosaico" o "adenovirus quimera mosaico" según se utiliza en el presente documento se refiere a "adenovirus quimeras" o "adenovirus híbridos" que comprenden una cápside de un primer tipo de adenovirus y fibras de dicho primer tipo de adenovirus y de al menos un segundo tipo de adenovirus y donde las fibras del primer tipo de adenovirus no han sido codificadas por el genoma de dicho adenovirus, sino que han sido proporcionadas in trans por las células en las que se ha propagado. Por "primer tipo de adenovirus" y "segundo tipo de adenovirus" se entiende un primer y un segundo serotipo de adenovirus, que deben ser distintos entre sí y pueden seleccionarse de cualquiera de los serotipos de adenovirus conocidos. Por "fibras de al menos un segundo tipo de adenovirus" se entiende que dichas fibras pueden ser fibras formadas íntegramente por un segundo tipo de adenovirus o bien fibras quimeras, formadas por fragmentos de un segundo tipo de adenovirus y fragmentos de uno o más tipos diferentes de este segundo tipo. Además, el adenovirus híbrido mosaico de la invención podrá incluir fibras de tipos de adenovirus adicionales. Según la presente invención se entiende por "serotipo" cada uno de los tipos de adenovirus inmunitariamente distintos. Existen 51 serotipos de adenovirus humanos distintos procedentes de 6 subgrupos (subgrupos A a F). La invención contempla el uso de cualquier serotipo adenoviral conocido en el estado de la técnica incluyendo, sin ninguna limitación, cualquiera de los serotipos definidos en la tabla 1.

Tabla 1: Algunos ejemplos de subgrupos y serotipos adenovirales adecuados para su uso en la presente invención.

Subgrupo	Serotipos
A	12, 18, 31
B	3, 7, 11, 14, 16, 21, 34, 35
C	1, 2, 5, 6
D	8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 22-30, 32, 33, 36-39, 42-47
E	4
F	40,41

En una realización preferida de la invención el primer y el segundo tipo de adenovirus de la cápside y las fibras del adenovirus híbrido mosaico proceden de diferentes subgrupos. En otra realización particular el primer tipo de adenovirus

pertenece al subgrupo C y/o el segundo tipo de adenovirus pertenece al subgrupo F.

La expresión "adenovirus del subgrupo C", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo de adenovirus que produce infecciones del tracto respiratorio y que incluye los serotipos 1, 2, 5 y 6. Cada uno de estos serotipos posee un único tipo de proteína fibra. La invención puede llevarse a cabo con un adenovirus híbrido que contenga elementos de cualquier serotipo del subgrupo C conocido en el estado de la técnica. De los distintos serotipos capaces de infectar a seres humanos, el más utilizado en los ensayos de terapia génica es el serotipo 5 (Ad5), que está asociado principalmente con infecciones respiratorias suaves, cuya secuencia genómica está disponible en la base de datos de GenBank con el código AC-000008 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=genome&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=23238>). Por lo tanto, en una realización preferida de la invención, el adenovirus híbrido posee el genoma y la cápside del adenovirus de serotipo 5 (Ad5). La expresión "adenovirus del subgrupo F", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo de virus conocido como adenovirus entéricos, que incluye a los serotipos 40 y 41, caracterizado porque, a diferencia de otros adenovirus, la entrada en la célula a infectar no depende de la interacción entre los motivos RGD de la base pentona del adenovirus y el receptor de integrinas de la superficie de la célula. En su lugar, los adenovirus del subgrupo F pueden usar un mecanismo alternativo para facilitar la endocitosis. En contraste con el resto de especies de adenovirus humanos, los adenovirus entéricos también se caracterizan porque poseen dos proteínas fibra diferentes, que se encuentran en cada virión en aproximadamente el mismo número. Concretamente, poseen una fibra larga, que se une al receptor CAR y, adicionalmente, una fibra corta que no se une a CAR, y que tiene una función desconocida. Otras características de los adenovirus entéricos son el punto isoeléctrico relativamente elevado de sus proteínas estructurales, el aumento de su viabilidad después de la exposición a un entorno ácido (como sucede en algunas partes del tracto gastrointestinal), y su habilidad para unirse a ciertos lípidos de la mucosa gástrica, especialmente después de la exposición a pH bajos. La invención puede llevarse a cabo usando cualquier adenovirus del subgrupo F conocido en el estado de la técnica, y más particularmente la proteína de la fibra corta de los serotipos Ad40 (SEQ ID NO: 1) o del Ad41 (SEQ ID NO: 2). En una realización preferida el adenovirus híbrido posee la proteína de la fibra corta del Ad40.

Así, en una realización particular de la invención el adenovirus que pertenece al subgrupo C es adenovirus tipo 5 y/o el adenovirus que pertenece al subgrupo F es adenovirus tipo 40.

En otra realización todavía más particular, el adenovirus híbrido es un adenovirus conocido como Ad5/40, preferiblemente Ad5/40S. En el contexto de la presente invención el adenovirus Ad5/40S es un adenovirus híbrido que se obtiene al reemplazar la proteína de la fibra del Ad5 completa por la fibra corta completa del Ad40. El método de la invención permite obtener adenovirus híbrido mosaico mediante la infección de células permisivas con adenovirus híbridos y su posterior cultivo.

La primera etapa del método consiste en infectar células permisivas que expresan la fibra de un tipo de adenovirus con un adenovirus que comprende la cápside de un tipo de adenovirus y fibras de un tipo de adenovirus distinto al tipo de adenovirus cuya fibra se expresa en las células permisivas.

Por "infección" o "infectar", en el contexto de la presente invención, se entiende el procedimiento por el cual los adenovirus penetran en las células. Dicha infección puede ser más o menos rápida y depende del tipo de crecimiento celular o de la expresión de los receptores que usan los adenovirus para internalizarse.

La entrada del adenovirus en la célula implica tres tipos de interacciones. La primera interacción se produce cuando la protuberancia o cabeza de la proteína fibra del adenovirus se une específicamente a un receptor de la superficie celular. Los dos receptores actualmente conocidos son el receptor CD46 para los serotipos de adenovirus humano del grupo B y el receptor coxsackie adenovirus (CAR) para los demás serotipos. A continuación se produce la interacción secundaria, en la cual la proteína de la base pentona viral interactúa con una molécula de integrina alfaV de la célula. Un tercer lugar de unión a receptor se localiza en la tercera repetición beta-espiral del cuerpo de la fibra que se une a glicosaminoglicano heparan sulfato. Estas interacciones estimulan la señalización celular e inducen la polimerización de actina dando lugar a la introducción del virión en la célula huésped a través de un endosoma.

Por tanto, es la fibra, principalmente, la que define los tipos celulares que cada adenovirus es capaz de infectar, que serán aquellos que posean los receptores adecuados para que la fibra del adenovirus interactúe con ellos.

La infección se realiza poniendo en contacto el adenovirus híbrido y la célula permisiva durante un tiempo determinado por cualquier método conocido en el estado de la técnica. Por "células permisivas" se entienden células que expresan en su superficie los receptores y co-receptores necesarios para permitir el reconocimiento e infección de un virus dado, pero que además poseen toda la maquinaria metabólica que el virus necesita para replicarse y carecen de factores que inhiban la replicación de dicho adeno virus. Es decir, una célula permisiva para los adeno virus de la invención es cualquier célula capaz de ser infectada por dichos adenovirus y de permitir que dichos adenovirus se repliquen. En el contexto de la presente invención las células permisivas deben, además, expresar la fibra de un tipo de adenovirus distinto al tipo de adenovirus de la fibra del adenovirus híbrido con el que se van a infectar dichas células, y también deben ser capaces de crecer en suspensión. Pueden utilizarse líneas celulares comerciales o conocidas que expresan la fibra de un adenovirus, o bien dichas líneas pueden generarse en el laboratorio por métodos conocidos en el estado de la técnica, como se detalla, por ejemplo en Von Seggem (Von Seggem DJ y cois. J Gen Virol 1998, 79: 1461-1468). Las células permisivas de la invención se elegirán en función del serotipo del adenovirus híbrido con el que se pretende infectar y se seleccionan, sin limitación, de células permisivas que expresan la fibra de un adenovirus de cualquier serotipo conocido desde el 1 al 51. Preferiblemente, en una realización de la invención dichas células permisivas son células que expresan la fibra del adenovirus Ad5. Ejemplos de líneas celulares conocidas que expresan la proteína de la fibra del Ad5 son la línea 21 IB, 211A y 21 IR (Von Seggem DJ y cois. J Gen Virol 1998, 79: 1461-1468; la patente estadounidense US 7,232,899 B2), las

líneas 601 y 633 (Von Seggern DJ y cois. J Virol 2000, 74:354- 362). Sin embargo, todas estas líneas celulares crecen en adherencia, y un requisito indispensable en el método de la invención es que la línea celular permisiva debe crecer en suspensión. Por ello, los inventores han adaptado la línea celular 21 IB al crecimiento en suspensión, obteniendo una nueva línea celular a la que han denominado 21 IBS. La caracterización de esta línea celular ha demostrado que su viabilidad se mantiene a lo largo de los días, incluso en concentraciones celulares elevadas, su crecimiento es eficiente y su tiempo de duplicación es de 2,1 días.

El adenovirus con el que se infectan las células permisivas comprende la cápside de un tipo de adenovirus y fibras de un tipo de adenovirus distinto al tipo de adenovirus cuya fibra se expresa en las células permisivas. En una realización particular, los adenovirus que pueden utilizarse para infectar son adenovirus Ad5 modificados en los que la proteína fibra ha sido reemplazada total o parcialmente por la fibra de otro serotipo, seleccionados de Ad5.Fib1, Ad5.Fib2, Ad5.Fib3, Ad5.Fib4, Ad5.Fib6, Ad5.Fib7, Ad5.Fib8, Ad5.Fib9, Ad5.Fib10, Ad5.Fib11, Ad5.Fib12, Ad5.Fib13, Ad5.Fib14, Ad5.Fib15, Ad5.Fib16, Ad5.Fib17, Ad5.Fib18, Ad5.Fib19, Ad5.Fib20, Ad5.Fib21, Ad5.Fib22, Ad5.Fib23, Ad5.Fib24, Ad5.Fib25, Ad5.Fib26, Ad5.Fib27, Ad5.Fib28, Ad5.Fib29, Ad5.Fib30, Ad5.Fib31, Ad5.Fib32, Ad5.Fib33, Ad5.Fib34, Ad5.Fib35, Ad5.Fib36, Ad5.Fib37, Ad5.Fib38, Ad5.Fib39, Ad5.Fib40-L, Ad5.Fib40-S, Ad5.Fib41-L, Ad5.Fib41-S, Ad5.Fib42, Ad5.Fib43, Ad5.Fib44, Ad5.Fib45, Ad5.Fib46, Ad5.Fib47, Ad5.Fib48, Ad5.Fib49, Ad5.Fib50, Ad5.Fib51. Ejemplos de estos adenovirus híbridos se describen en las solicitudes de patente internacional WO0304661 y WO0227006. En una realización particular los adenovirus híbridos son adenovirus Ad5 en los que la fibra ha sido sustituida por la fibra corta o larga de Ad40 o Ad41, seleccionados de Ad5.Fib40-S, Ad5.Fib40-L, Ad5.Fib41-S y Ad5.Fib41-L, donde S y L hacen referencia a la fibra corta y larga, respectivamente. En una realización particular de la invención los adenovirus con los que se infectan las células permisivas son adenovirus Ad5/40S que tienen la cápside del Ad5 y la fibra corta del Ad40.

Posteriormente, las células obtenidas en la etapa (i) se cultivan en condiciones que permiten la amplificación del adenovirus durante al menos un ciclo de replicación del adenovirus y de la célula permisiva.

Por "cultivar las células obtenidas en la etapa (i)" se entiende la propagación de las células infectadas con el adenovirus híbrido en un medio de crecimiento apropiado y en unas condiciones de temperatura y mezcla de gases adecuados. Las condiciones de cultivo varían ampliamente dependiendo del tipo celular, pero en el contexto de esta invención el cultivo de las células se realiza siempre en suspensión. La composición del medio de crecimiento varía en cuanto a concentración de glucosa, factores de crecimiento y otros componentes nutritivos, y también varía el pH. El medio de crecimiento se seleccionará en función de la línea celular y contendrá soluciones salinas equilibradas, aminoácidos, vitaminas, otros suplementos orgánicos de bajo peso molecular, y, opcionalmente, hormonas y factores de crecimiento (suero) e inhibidores del crecimiento de los contaminantes (como antibióticos y antifúngicos). Se utilizarán medios de cultivo aptos para el cultivo en suspensión. Ejemplos de medios de crecimiento que pueden utilizarse para el cultivo de células en suspensión son medios libres de suero como SFMII no suplementado o suplementado con pequeñas cantidades de suero, más concretamente es medio SFMII suplementado con 0,5% de suero bovino fetal.

Por "amplificación del adenovirus" se entiende el aumento del número de copias del adeno virus. Esta amplificación se realiza al menos durante un ciclo de replicación del adenovirus. Por "ciclo de replicación del adenovirus" o "ciclo de replicación adenoviral" se entiende, en el contexto de esta invención, el conjunto de procesos por los cuales el adenovirus reconoce una célula, entra en ella, libera su genoma, se replica y arma partículas virales progenie que permanecen en las células hasta que estas son Usadas para su recogida.

El ciclo de replicación del adenovirus consta de diferentes etapas: unión a la célula, que como se ha explicado anteriormente se realiza a través de la interacción de la proteína fibra con los receptores celulares; internalización, que implica la interacción de la pentona con las integrinas V3 y V5; la penetración, que se produce por endocitosis en vesículas revestidas de clatrina, de manera que posteriormente la vesícula se rompe produciéndose la liberación de la partícula viral dentro del citoplasma, con pérdida de proteínas de la cápside y desnudamiento del ADN viral; migración, cuando el núcleo de la partícula viral restante migra desde el citoplasma al núcleo vía microtúbulos y el ADN viral entra al núcleo a través de los poros nucleares; la replicación del ADN, que tiene lugar en el núcleo, después de que el ADN viral sea convertido en un complejo histonas celulares-ADN viral; y finalmente, ensamblaje del virión, que empieza en el citoplasma, donde polipéptidos individuales se ensamblan en capsómeros (hexones y pentonas), y posteriormente estas cápsides inmaduras y vacías son ensambladas en el núcleo celular, estando el núcleo de la partícula viral formado por ADN genómico y proteínas asociadas. En el contexto de esta invención, el ciclo de replicación del adenovirus termina justo antes de que las nuevas partículas adeno virales lisen la célula y se liberen al exterior.

Los términos "partícula viral", "partícula vírica" o "virión" se utilizan de manera intercambiable a lo largo de la memoria para referirse a partículas adenovirales infecciosas formadas cuando un vector adenoviral que contiene toda o una parte de un genoma viral infecta una línea celular apropiada para la generación de dichas partículas. Por "ciclo de replicación de la célula permisiva" se entiende el conjunto de procesos por el que una célula madre se divide para formar dos células hijas que mantienen la capacidad de la célula madre de permitir la replicación del adenovirus.

La siguiente etapa del método de la invención (etapa iii) consiste en recuperar las partículas virales del adenovirus híbrido mosaico a partir de las células obtenidas en la etapa (ii).

Tras la síntesis y ensamblaje de la cápside las partículas virales obtenidas serán adenovirus híbrido mosaico, según se ha definido anteriormente. Estos adenovirus híbrido mosaico poseen fibras de dos orígenes diferentes: las que proceden del genoma del adenovirus híbrido con el que se ha infectado la línea celular en la etapa (i), y las que proceden de la línea celular permisiva.

Por "recuperar las partículas virales" se entiende el procedimiento por el cual se lisan física o químicamente las células

antes de que se produzca la lisis natural por parte de las nuevas partículas adenovirales generadas en el ciclo de replicación, con la finalidad de recoger dichas partículas cuando se hallan concentradas en el núcleo, lo que facilita una posterior purificación. La lisis de dichas células y recolección de las partículas virales se efectúa por métodos conocidos por el experto en la técnica, por ejemplo por ciclos de congelación y descongelación,

Una vez recuperadas las partículas virales existe una etapa opcional (etapa iv) que consiste en repetir las etapas anteriores de manera cíclica con las partículas virales obtenidas en la etapa (iii) que se utilizan para la infección en la etapa (i) del siguiente ciclo de amplificación.

Por "ciclo de amplificación", en el contexto de la presente invención, se entiende el tiempo transcurrido entre la infección con el adenovirus híbrido y la recogida de las partículas virales de adenovirus híbrido mosaico. El tiempo de un ciclo de replicación viral completo dependerá del adenovirus híbrido particular y de la línea celular utilizada y en cada caso deberá ser determinado por el experto en la técnica. En una realización particular, cuando el adenovirus que pertenece al subgrupo C es adenovirus tipo 5 y/o el adenovirus que pertenece al subgrupo F es adenovirus tipo 40, cada ciclo de amplificación tiene una duración de entre 44 y 64 horas, preferiblemente de entre 48 y 56 horas, más preferiblemente de 56 horas.

El método de la invención se caracteriza porque se lleva a cabo en células permisivas adaptadas al crecimiento en suspensión y en donde la etapa (i) se lleva a cabo en presencia de un policatión.

Por "células permisivas adaptadas al crecimiento en suspensión" se entiende que las células son capaces de vivir de forma natural sin adherirse a una superficie. Dichas células pueden pertenecer a líneas celulares conocidas que crezcan habitualmente en suspensión o a líneas celulares adherentes que han sufrido modificaciones que les permiten crecer en suspensión. El uso de cultivos en suspensión tiene como ventaja que permite realizar la amplificación del adenovirus en sistemas escalables, como bioreactores, o bien mediante el aumento de la densidad celular o bien expandiendo el volumen de cultivo.

Las células permisivas se coinubran con un policatión durante la infección para favorecer la entrada del adenovirus en la célula al permitir la interacción entre las cápsides del adenovirus, cargadas negativamente, y las membranas celulares, también cargadas negativamente. En la presente invención se entiende por "policatión" o "polímero catiónico" un oligómero o polímero orgánico de origen natural o sintético, portador de gran cantidad de cargas positivas a pH neutro que es capaz de dirigir la entrada de la partícula adenoviral al interior de las células productoras. Policaciones adecuados para el método de la invención son, pero no se limitan a, polietiliminina, protamina, poliarginina, poliornitina, polilisina, polibreno (bromuro de hexadimetrina), sulfato de protamina, hidrobromuro de poli-L-lisina, policloruro de dimetildialilamonio (Merquat®-100, Merquat®-280, Merquat®-550), hidrocioruro de poli-L-arginina, poli-L-histidina, poli(4-vinilpiridina), hidrocioruro de poli(4-vinilpiridina), poli(4-vinilpiridina-co-estireno), polivinilpirrolidona, poli-L-lisina succinilada, DEAE-dextrano, espermina, espermidina, etc. En una realización particular de la invención el policatión es polibreno.

Para obtener finalmente partículas virales del adenovirus híbrido no mosaico, es decir, del adenovirus con el que se ha realizado la infección inicial de las células en la etapa (i), las partículas virales del adenovirus híbrido mosaico que se han recuperado en la etapa (iii) o bien en la etapa (iv) se someten a una etapa final de amplificación en células que no expresan la fibra del primer tipo de adenovirus, recuperándose partículas virales del adenovirus híbrido no mosaico.

Por "adenovirus híbrido no mosaico", en el contexto de la presente invención, se entiende el adenovirus original con el que se ha realizado la infección inicial de las células en la etapa (i), y que ha sido definido anteriormente como "adenovirus híbrido", que comprende la cápside de un tipo de adenovirus y fibras de un tipo de adenovirus distinto al tipo de adenovirus cuya fibra se expresa en las células permisivas.

La expresión "etapa final de amplificación" hace referencia a la amplificación del adenovirus híbrido mosaico obtenido en la etapa (iii) o en la etapa (iv) que tiene lugar en células distintas de las utilizadas en la etapa (i) que no expresan la fibra del primer tipo de adenovirus, y que por lo tanto permite obtener partículas virales del adenovirus híbrido original.

Por "células que no expresan la fibra del primer tipo de adenovirus" se entiende cualquier tipo de célula que no exprese ninguna proteína fibra y que posea la maquinaria necesaria para que los adenovirus híbridos mosaico puedan amplificarse. Preferiblemente, dichas células crecen en suspensión. Ejemplos de estas células adaptadas al crecimiento en suspensión son células HEK293S (Brueggemann L.I. y col. J Gen Physiol, 2002, 119: 593-612), células HEK-293,2sus (número ATCC: CRL-1573,3), células 293F (Invitrogen N° Catálogo: R790-07), Per.C6™, preferiblemente células HEK293S, más preferiblemente células 293F. Por lo tanto, en una realización de la invención, las partículas virales del adenovirus híbrido mosaico recuperadas en la etapa (iii) o (iv) son sometidas a una etapa final de amplificación en células adaptadas al crecimiento en suspensión que no expresan la fibra del primer tipo de adenovirus, recuperándose partículas virales del adenovirus híbrido no mosaico. En una realización particular las células adaptadas al crecimiento en suspensión que no expresan la fibra del primer tipo de adenovirus son células HEK293S. En otra realización particular las células adaptadas al crecimiento en suspensión que no expresan la fibra del primer tipo de adenovirus son células 293F.

La etapa final de amplificación en células que no expresan la fibra del primer tipo de adenovirus puede llevarse a cabo tanto en presencia como en ausencia de un policatión, pero la presencia de dicho agente facilita la entrada del adenovirus en las células. Por lo tanto, en una realización particular la etapa final de amplificación en células adaptadas al crecimiento en suspensión que no expresan la fibra del primer tipo de adenovirus se lleva a cabo en presencia de un policatión, más preferiblemente en presencia de polibreno.

Este método permite optimizar el proceso de amplificación y producción de adenovirus híbridos, de modo que se mejora la eficiencia de amplificación, reduciéndose a un tercio el número de ciclos de amplificación necesarios en comparación con

protocolos clásicos, y también se reduce el tiempo y el material fungible utilizado, así como el riesgo de formación de partículas competentes en replicación por recombinación con las secuencias EI de las células permisivas.

KITS DE LA INVENCION Y SUS USOS

La invención también proporciona kits para la amplificación de adenovirus híbrido mosaico según el método de la invención.

El término "kit", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una combinación de un conjunto de componentes adecuados para amplificar un adenovirus híbrido mosaico según el método de la invención, junto con sus contenedores y envases apropiados para su venta comercial. En la presente invención, se entiende como "componente adecuado para amplificar un adenovirus híbrido mosaico según el método de la invención", a cualquier compuesto que pueda usarse en cualquiera de las etapas (i) a (iv) del método de la invención y/o en la etapa de amplificación final, e incluye, sin limitación, medios, aditivos, líneas celulares, policaciones, adenovirus híbrido mosaico, etc.

Así, en un aspecto la invención se relaciona con un kit para la amplificación de un adenovirus híbrido mosaico comprendiendo dicho adenovirus una cápside de un primer tipo de adenovirus y fibras de al menos dos tipos de adenovirus, siendo uno de los tipos de adenovirus de las fibras del mismo tipo que la cápside, donde dicho kit comprende:

a) al menos una línea celular permisiva que expresa la fibra del primer tipo de adenovirus apta para el cultivo en suspensión y

b) un policación

Los términos "amplificación", "adenovirus híbrido", "adenovirus híbrido mosaico", "cápside", "fibra", "tipo de adenovirus", "línea celular permisiva" y "policación" ya han sido definidos con anterioridad en el contexto de los métodos de la invención.

Dicho kit incluye al menos una línea celular permisiva apta para el cultivo en suspensión que expresa la fibra del primer tipo de adenovirus y un policación que facilita la infección de las células por parte del adenovirus. En una realización particular dicho kit comprende adicionalmente un adenovirus híbrido o al menos un polinucleótido que permita generar dicho adenovirus. El término "adenovirus híbrido" ya ha sido definido con anterioridad y se refiere al adenovirus híbrido que se pretende amplificar. El término "polinucleótido" indica un nucleótido de forma polimérica de cualquier longitud que contiene todo el material genético necesario que codifica para generar partículas adeno virales completas. Dicho término incluye ribonucleótidos y desoxiribonucleótidos, ARN de cadena simple y doble, y también polinucleótidos modificados, tales como polinucleótidos metilados. En otra realización particular dicho kit comprende adicionalmente al menos una línea celular adaptada al crecimiento en suspensión que no expresa la fibra del primer tipo de adenovirus. Dicha expresión tiene el mismo significado que el definido en el contexto de los métodos de la invención.

En realizaciones preferidas los kits de la invención pueden utilizarse con cualquiera de los adenovirus híbridos descritos en el contexto del primer aspecto de la invención. En una realización preferida de la invención el policación que se utiliza en el kit es polibreno.

Es otro aspecto de la invención el uso de estos kits para la amplificación de un adenovirus híbrido mosaico.

EJEMPLOS

Adaptación de las células 21 IB al cultivo en suspensión Puesto que la entrada del Ad5/40S en las células HEK-293 es muy ineficiente, se seleccionó como línea celular productora la línea celular 21 IB, ya que estas células expresan constitutivamente la proteína fibra F5 del Ad5 (Von Seggern y cois. J Virol 2000, 74:354-62; Von Seggern y cois. J Gen Viral 1998, 79: 1461-8). Las células 21 IB adherentes expresan constitutivamente la proteína adeno viral de la fibra 5 en el citoplasma cuando son cultivadas en medio DMEM (Medio de Eagle Modificado por Dulbecco) suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS). Para adaptar estas células al crecimiento en suspensión, el medio DMEM 10% FBS se sustituyó a continuación por el SFMII. Posteriormente, las células fueron transferidas a placas de 6 pocillos para suspensión. Algunos pocillos se suplementaron con una dosis baja de FBS (1% de FBS o 0,5% de FBS). La adición de 0,5% de FBS permitió un mejor crecimiento y viabilidad en comparación con los pocillos sin FBS; mientras que la adición de 1% de FBS llevó a la formación de grandes agregados celulares. Las nuevas células adaptadas al cultivo en suspensión se denominaron 21 IBS. Las células 21 IBS se transfirieron a frascos en agitación y se mantuvieron en suspensión a una velocidad de 110 rpm y a una densidad de 7×10^5 células/ml. Tras 18 pases seriados, las células adaptadas crecieron aisladas o en pequeños agregados de 4-5 células, y a una densidad de $2,5 \times 10^6$ células/ml las células 21 IBS mantuvieron una alta viabilidad. Para determinar su curva de crecimiento, las células 21 IBS se cultivaron por triplicado a diferente densidad. La viabilidad y densidad se evaluó diariamente durante una semana. Como se observa en la Figura 1 A la viabilidad de estas células estaba por encima del 80% y se mantuvo constante incluso a una alta densidad celular. Además, el crecimiento celular fue constante y su constante numérica de crecimiento μ fue de 0,3246 (Figura 1B).

El polibreno mejora la infección por el adenovirus quimérico Ad5/40S en células 21 IBS

Se ensayó si el polibreno era capaz de mejorar la entrada del adenovirus en las células productoras durante las etapas de amplificación. Se infectaron diferentes lotes de células 21 IBS con MOI crecientes de Ad5/40S-CMV-GFP en ausencia o presencia de polibreno, y el porcentaje de células infectadas se cuantificó mediante la expresión GFP de células tras análisis mediante separación de células activadas por fluorescencia (FACS). Como se observa en la Figura 2, la transducción de Ad5/40S en células 21 IBS está significativamente aumentada cuando se co-incuban con polibreno, lo que permite aumentar la eficiencia del protocolo de amplificación. Estudio del ciclo celular viral de Ad5/40S en células 21 IBS

Los Ad5/40S quiméricos producidos en células 293 S contienen proteína F40S en sus cápsides, mientras que los Ad5/40S

producidos en células 21 IBS se espera que contengan tanto proteínas F5 como F40S, ya que las células 21 IBS expresan constitutivamente proteína F5 (Fig. 3A). En consecuencia, durante las etapas de amplificación, la producción en células 21 IBS generará mosaicismo con cápsides que contienen tanto las proteínas F5 como las F40S (Figura 3B). El mosaicismo de fibras mejora la infectividad de los viriones Ad5/40S durante los ciclos de amplificación permitiendo una entrada más eficiente mediada por la interacción CAR:F5 en las células productoras 21 IBS. Para generar cápsides quiméricas puras (no mosaicos), la última etapa de amplificación debe realizarse en células HEK-293 adaptadas al crecimiento en suspensión. Para determinar el tiempo de recogida óptimo durante el proceso de amplificación, el ciclo celular viral de Ad5/40S mosaico/quimera se estudió en células 293F. Para hacer un análisis más preciso se cuantificó la producción viral cada 4 horas entre 44 y 64 horas de producción. Como se observa en la Figura 4, los vectores quiméricos Ad5/40S tienen un ciclo viral de 48-56 horas, con el pico más alto a las 56 horas. Sin embargo, cuando se usan MOI más altas el pico se mueve hacia las 48 horas. Teniendo en cuenta estos resultados, para los siguientes experimentos el tiempo de recogida óptimo se estableció en 56 horas post-infección.

Producción del vector Ad5/40S con protocolo optimizado

Con el fin de desarrollar un protocolo optimizado de producción del vector, $2,5 \times 10^7$ células 21 IBS (a una densidad de 10^6 células/ml) se infectaron con un MOI=1 de Ad5/40S-CMV-GFP en presencia de polibreno. A las 56 horas después de la infección las células se recogieron y lisaron mediante congelación-descongelación, y el lisado crudo se añadió a células 4×10^8 293F. A las 56 horas las células se recogieron y el lisado crudo se almacenó. El sobrenadante se concentró por diafiltración con el sistema Midjet. El sobrenadante concentrado y el lisado crudo se purificaron mediante gradiente doble de cloruro de cesio. Como se muestra en la Figura 5, el nuevo protocolo desarrollado es escalable y tiene sólo dos etapas de amplificación, lo que reduce considerablemente no sólo el tiempo y el coste del protocolo, sino también la generación de partículas replicativas competentes.

NON-PATENT CITATIONS

Reference

1	*	CLARK, P. R. ET AL.: ' Polycations and cationic lipids enhance adenovirus transduction and transgene expression in tumor cells. ' CANCER GENE THERAPY, vol. 6, no. 5, September 1999, ISSN 0929-1903 pages 437 - 446
2	*	KRASNYKH, V. ET AL.: ' Genetic targeting of an adenovirus vector via replacement of the fiber protein with the phage T4 fibrin. ' JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 75, no. 9, May 2001, ISSN 0022-538X pages 4176 - 4183
3	*	MERCIER, G. T. ET AL.: ' A chimeric adenovirus vector encoding reovirus attachment protein sigma1 targets cells expressing junctional adhesion molecule 1. ' PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, vol. 101, no. 16, April 2004, ISSN 0027-8424 pages 6188 - 6193
4	*	NICOL, C. G. ET AL.: ' Effect of adenovirus serotype 5 fiber and penton modifications on in vivo tropism in rats. ' MOLECULAR THERAPY, vol. 10, no. 2, August 2004, ISSN 1525-0016 pages 344 - 354
5	*	SHAYAKHMETOV, D. M. ET AL.: ' Dependence of adenovirus infectivity on length of the fiber shaft domain. ' JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 74, no. 22, November 2000, ISSN 0022-538X pages 10274 - 10286

* Cited by examiner

CLASSIFICATIONS

International Classification	C12N7/02
Cooperative Classification	C12N7/00 , C12N2710/10352

LEGAL EVENTS

Date	Code	Event	Description
Aug 22, 2012	121	Ep: the epo has been informed by wipo that ep was designated in this application	Ref document number: 11850471 Country of ref document: EP Kind code of ref document: A1
Jun 24, 2013	NENP	Non-entry into the national phase in:	Ref country code: DE
Jan 15, 2014	122	Ep: pct app. not ent. europ. phase	Ref document number: 11850471 Country of ref document: EP Kind code of ref document: A1