



Universitat Autònoma de Barcelona

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

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

TESIS DOCTORAL

MARTA MIRALLES CONSUEGRA

Julio, 2014

A close-up, slightly blurred photograph of a bicycle wheel. The spokes and the rim are visible, with a light beige or tan color. A semi-transparent blue rectangular box is overlaid on the lower right portion of the image, containing the text 'III. Resultados'.

III. Resultados

1. DESARROLLO DE ESTRATEGIAS DE TERÁPIA GÉNICA PARA ENFERMEDAD DE CROHN

1.1. El gen: clonación del gen IL23R soluble humano en el genoma viral

La secuencia del gen del receptor soluble de la IL23 humana fue publicada en el artículo científico: *Identification and expression analysis of alternatively spliced isoforms of human interleukin-23 receptor gene in normal lymphoid cells and selected tumor cells* (Zhang et al., 2006). Los autores demostraron que al menos seis isoformas de IL23R (denominadas IL23R1-6) se originaban de forma natural debido a splicing alternativo, por delección de diferentes combinaciones de exones (**Figura 12**). Algunas de estas isoformas eran solubles y secretadas al exterior celular. Conociendo que en algunos casos, como la IL6 i la IL2 (Jones, 2005; Witkowska, 2005), los receptores solubles pueden actuar de forma agónica o antagónica durante la homeostasis celular en un perfil tanto de normalidad como de enfermedad, los autores hipotetizaban que las isoformas solubles de IL23R podrían tener una función protectora para las células cancerígenas. Dicho de otra manera, la producción preferente de las isoformas solubles observada en algunos tipos celulares tumorales, tales como carcinomas pulmonares, podría proporcionar a las células tumorales una ventaja de supervivencia, evitando la vigilancia y el ataque inmunológico.

Así pues, existían isoformas solubles naturales del IL23R que eran potencialmente capaces de llevar a cabo una función biológica en la modulación de la respuesta inmune. Debido a ello, y a la implicación clave de la IL23 e IL23R en la vía Th17, nos propusimos clonar el cDNA de una de estas isoformas en un vector de terapia génica con el objetivo de conseguir la expresión de IL23R soluble y analizar su potencial terapéutico en un modelo animal de enfermedad autoinmune.

Así pues, mandamos la secuencia de la isoforma 4 del IL23R humano (IL23R4) (número de acceso Gen-Bank: AY937255) a Eurofins MWG Operon para la producción del gen sintético. Además, con el fin de utilizarlo como control en nuestros estudios, la

secuencia completa del IL23R, es decir, el receptor transmembrana, nos fue facilitada por los investigadores que habían publicado este artículo.

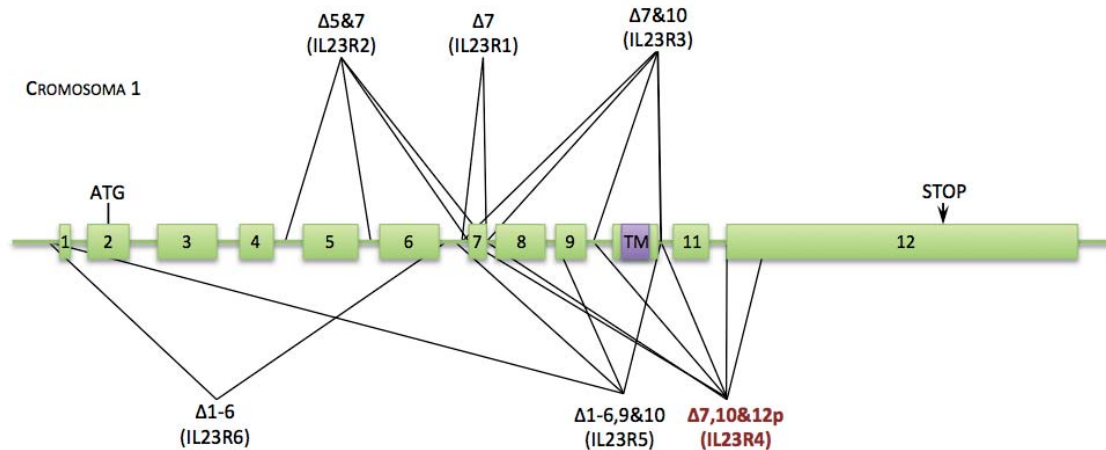


FIGURA 12. Estructura genómica y isoformas de splicing de IL-23R. El gen de IL-23R se localiza en el cromosoma humano 1, y se compone de 12 exones. Seis isoformas de splicing de IL-23R (IL-23R1-6) se pueden generar a través de splicing alternativo. Las isoformas IL-23R1, 2, 3 y 4 no tienen exón 7. Además, IL-23R2 tampoco contiene el exón 5 (161 pb); a IL-23R3 carece del exón 10 (total de 193 pb); y IL-23R4 no presenta el exón 10 y la primera región de 67 pb del exón 12. Por su parte, IL-23R6 y IL23R5 no contienen los exones 1-6, además de carecer de los exones 9 y 10, respectivamente. Δ: secuencia de exón eliminado por splicing. La traducción codón de iniciación (ATG) y el codón de stop (flecha) se indican en el exón 2 y el exón 12, respectivamente. La caja lila indica el dominio transmembrana (TM). (Adaptado de (Zhang et al., 2006).

1.2. El vector: generación y producción de los vectores virales

En la elección del vector apropiado para una estrategia de terapia génica varios factores se tienen en cuenta, siendo uno de los más importantes el tropismo del vector. Históricamente, nuestro grupo ha estado interesado en el estudio de una terapia génica eficaz para la Enfermedad de Crohn. Debido a ello, en un primer momento, nos planteamos probar el potencial terapéutico del gen IL23Rs en un modelo murino de Enfermedad de Crohn. Asimismo, los estudios de biotropismo llevados a cabo por nuestro grupo con anterioridad revelaron que el vector viral Ad5/40s es un buen candidato para una estrategia de terapia génica intestinal (Rodríguez et al., 2013).

1.2.1. Adenovirus quimera Ad5/40S

Como ya ha sido comentado en la introducción, el Ad40 es un virus con un fuerte tropismo intestinal. Sin embargo, su producción *in vitro* es extremadamente ineficiente y por este motivo se decidió trabajar con el virus quimérico Ad5/40s. Este vector está constituido casi en su totalidad por Ad5, excepto por la proteína *fiber* corta (F40S) del Ad40. Puesto que la proteína *fiber* es la que mayoritariamente determina el tropismo del vector, el Ad5/40s conserva el tropismo intestinal del Ad40. Además, el resto del genoma es del Ad5, lo que permite solventar problemas de bioseguridad pues, en contraste al Ad40, las proteínas del Ad5 están ampliamente estudiadas y caracterizadas.

No obstante, aunque la producción del Ad5/40S era factible, también era larga y costosa y la eficiencia obtenida no era todavía suficiente para permitir producciones virales de titulación elevada necesarias para el uso *in vivo*. Debido a ello, parte de la tesis se dedicó al diseño y optimización de un protocolo que permitiera obtener grandes cantidades de vector Ad5/40S en un período de tiempo mucho menor y con menos costes. Por otra parte, también se diseñó un protocolo de fácil escalabilidad, que permitiera su producción en biorreactores si fuera necesario.

El protocolo desarrollado fue publicado en la revista PLOS ONE y patentado (el **artículo** y la **patente** se adjuntan a continuación). También ha dado lugar a la elaboración de un **capítulo de libro**, que se adjunta en el apartado VIII. Anexo.

1.2.1.1. Artículo: Efficient Amplification of Chimeric Adenovirus 5/40S Vectors Carrying the Short Fiber Protein of Ad40 in Suspension Cell Cultures

Efficient Amplification of Chimeric Adenovirus 5/40S Vectors Carrying the Short Fiber Protein of Ad40 in Suspension Cell Cultures

Marta Miralles, María Mercedes Segura, Meritxell Puig, Assumpció Bosch, Miguel Chillón

Publicado en **PLOS ONE**, julio 2012

Resumen:

El Adenovirus humano 40 (Ad40) es una prometedora herramienta de terapia génica para enfermedades intestinales. Dado que la producción del Ad40 *in vitro* es extremadamente ineficiente, se han desarrollado vectores adenovirales quiméricos 5/40S, portadores de la proteína *fiber* corta del Ad40 en la cápside del Ad5. No obstante, la productividad del Ad5/40S es baja. Nosotros hipotetizamos que esta baja productividad es debido a la ineficiente entrada del virus dentro de las células productoras durante la amplificación. Con este fin, hemos desarrollado una estrategia de producción basado en el uso de células 211B (que expresan *fiber* del Ad5) durante los pasos de amplificación, además de mejorar la infectividad de Ad5/40S aún más añadiendo polybrene durante las infecciones. Asimismo, se determinó el tiempo óptimo de recogida del virus por medio de la evaluación del ciclo viral del Ad5/40S. La estrategia de producción desarrollada redujo significativamente el número de ciclos de amplificación y la duración total del proceso. Finalmente, para facilitar más aún la producción del Ad5/40S, las células 211B fueron adaptadas a crecer en suspensión, permitiendo así el fácil escalado del proceso de producción en biorreactores.

Efficient Amplification of Chimeric Adenovirus 5/40S Vectors Carrying the Short Fiber Protein of Ad40 in Suspension Cell Cultures

Marta Miralles¹, María Mercedes Segura¹, Meritxell Puig¹, Assumpció Bosch¹, Miguel Chillon^{1,2*}

1 Center of Animal Biotechnology and Gene Therapy (CBATEG), and Department of Biochemistry and Molecular Biology, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain, **2** Institut Català de Recerca i Estudis Avançats (ICREA), Barcelona, Spain

Abstract

The human adenovirus 40 (Ad40) is a promising tool for gene therapy of intestinal diseases. Since the production of Ad40 *in vitro* is extremely inefficient, chimeric Adenovirus 5/40S vectors carrying the Ad40 short fiber on the Ad5 capsid have been developed. However, Ad5/40S productivity is low. We hypothesized that low productivity was a result of inefficient viral entry into producer cells during amplification. To this end, we have developed a production strategy based on using 211B cells (expressing Ad5 fiber) during amplification steps, while Ad5/40S infectivity is further improved by adding polybrene during infections. In addition, the optimal harvesting time was determined by evaluating the Ad5/40S viral cycle. The developed production strategy significantly reduces the number of amplification cycles and duration of the process. Finally, to further facilitate Ad5/40S production, 211B cells were adapted to suspension thus allowing to easily upscale the production process in bioreactors.

Citation: Miralles M, Segura MM, Puig M, Bosch A, Chillon M (2012) Efficient Amplification of Chimeric Adenovirus 5/40S Vectors Carrying the Short Fiber Protein of Ad40 in Suspension Cell Cultures. PLoS ONE 7(7): e42073. doi:10.1371/journal.pone.0042073

Editor: Ranjit Ray, St. Louis University, United States of America

Received: February 3, 2012; **Accepted:** July 2, 2012; **Published:** July 31, 2012

Copyright: © 2012 Miralles et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by ISCIII-PI081162 and ISCIII-PI10-00561, SGR2009-1300 and Association Francaise contre les Myopathies (AFM#12277). M.M. is a recipient of an FPU fellowship from the Ministerio de Educación de España (AP2007-01563). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have read the journal's policy and have the following conflicts: Patent application number PCT/ES2011/070897. Title: "Método para la producción de adenovirus mosaic"; Inventors: M. Chillon, M. Miralles, E. Rodríguez, A. Bosch. This does not alter their adherence to all the PLoS ONE policies on sharing data and materials.

* E-mail: miguel.chillon@uab.es

Introduction

Human Adenovirus 40 serotype (Ad40) is an enteric adenovirus of the subgroup F. This adenoviral serotype is an important etiologic agent of gastroenteritis in children [1–3]. Due to its enteric tropism, vectors derived from Ad40 constitute interesting candidates for gene therapy of intestinal diseases such as Crohn's Disease. Initial attempts to grow Ad40 in HeLa or other cell lines commonly used to isolate and propagate intestinal viruses from patients stool samples were unsuccessful. This led to the idea that Ad40 viruses were unable to grow *in vitro*. However, subsequent experiments revealed that Ad40 could grow in some cells, for instance HEK293 cells, enabling its propagation in the laboratory [4–6]. Although the Ad40 is able to infect HEK293 cells, its production *in vitro* is very inefficient, resulting in low titers in comparison to other adenoviral serotypes [7,8].

On the other hand, vectors derived from adenovirus type 5 (Ad5) are widely used in human clinical trials (Journal of Genetic Medicine Website, www.wiley.co.uk/genmed/clinical). Ad5 first interaction with the host cell is through the binding of the fiber protein and the coxsackievirus and adenovirus receptor (CAR). Since CAR is widely distributed on the cell surface of many cell types, Ad5 vectors display a broad tropism [9–12]. In order to restrict vector tropism, chimeric Ad5 vectors containing the fiber protein of other adenoviral serotypes have been developed [13,14]. In fact, the possibility of infecting host cells by CAR-independent

entry pathways is an interesting tool to limit the characteristic broad tropism of Ad5 viruses [15]. For instance, it has been described that Ad40 contains two different fibers: a long one (F40L) and a short one (F40S) [10,16,17]. Only the long fiber binds CAR while the short fiber is believed to be responsible for the enteric tropism [18]. In this regard, the generation of chimeric Ad5/40S mutants (Ad5 capsid with the F40S protein) has shown to ablate CAR binding while conferring a novel tropism to Ad5 viral vectors, and thus, intravenous administration of Ad5/40S vectors resulted mainly in liver and spleen transduction, as shown by the presence of viral DNA and transgene expression in these organs, while the virus was hardly detected in the intestine [15]. However, and contrary to the reduced affinity of Ad5/41S vectors for human intestinal epithelium [19], when given directly into the gastrointestinal tract by rectal administration *in vivo*, chimeric Ad5/40S vectors maintain the enteric tropism [20].

Interestingly, Lu and collaborators [21] have recently reported efficient amplification of Ad41 vectors (another enteric adenovirus of the subgroup F) by using a new producer cell line expressing E1B55K from Ad41. However, although genomes from both, Ad40 and Ad41 viruses have been sequenced, the oncogenic potential of their proteins is unknown. Since there is leaky expression from viral genes from recombinant adenovirus vectors [22], the use of Ad40 and Ad41 as gene therapy vectors in humans should be restricted for biosafety reasons.

To address both, the difficulty of Ad40 vector production and the biosafety concerns, the use of chimeric Ad5/40S vectors, combining the capsid structure of fully characterized Ad5 vectors and enteric tropism mediated by the F40S fiber proteins, is attractive. Various production protocols to amplify chimeric Ad5 vectors including the short fiber proteins F40s and F41S have been reported [7,8] [23–25]. Unfortunately, although the production of the chimeric adenoviral vector Ad5/40S *in vitro* is more efficient than that of wild type Ad40, the purity and the productivity per cell is still not sufficient to achieve the desirable viral titres. In this work, we describe the development of a new production protocol that allows fast and scalable production of Ad5/40. The production strategy has been optimized by i) studying the Ad5/40S viral cycle to determine the optimal harvesting time, ii) using the 211B cell line for vector amplification, iii) adapting the producer cell line to grow in suspension culture and low serum media, iv) improving infection conditions using polybrene, v) reducing the production time.

Results

Adaptation and Characterization of 211B Cells to Suspension Culture

In order to address the inefficient infection of Ad5/40S vectors in HEK-293 cells, we selected 211B as producer cells. This cell line derives from HEK-293 cells and constitutively expresses the fiber protein from Ad5 (F5) [26,27]. Ad5/40S production in 211B cells will generate mosaic virions containing both F5 and F40S fiber proteins. Fiber mosaicism should improve the infectivity of the Ad5/40S virions during the amplification cycles by allowing a more efficient entry mediated by CAR-F5 interaction on 211B producer cells.

Adherent 211B cells were routinely cultured in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) media supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS). To allow scalability of the process [28], we adapted the 211B cell line to grow in suspension and low protein medium. To this end, culture medium DMEM containing 10% FBS was sequentially substituted by a serum-free growth medium (SFMIII) in the presence of a low dose of FBS (1% FBS or 0.5% FBS) or no FBS at all. Addition of 0.5% FBS allowed better cell growth and viability in comparison with cultures grown in the absence of FBS, while addition of 1% of FBS led to the formation of large cell aggregates (data not shown). The cells newly adapted to low-protein suspension conditions were named 211BS. 211BS cells were transferred into shake flasks at a density of 7×10^5 cells/ml and kept in suspension at 110 rpm. After 18 serial passages, adapted cells grew individually or in small aggregates of 4–5 cells, and up to a density of 2.5×10^6 cells/ml.

To determine the kinetics of growth of 211BS cells, cells were seeded in triplicate at 3.5×10^5 cells/ml. Viability and cell density were evaluated daily. As observed in the growth curve (Figure 1A), the viability of 211BS cells was over 80% during exponential cell growth. Cells grow to high densities ($\sim 2.5 \times 10^6$ cells/ml) in batch mode. The μ (growth constant) was 0.0148 (Figure 1B) implying a duplication time of 46.83 hours.

Once 211BS cells were adapted to grow in suspension and low serum concentrations (0.5%), we proceeded to demonstrate that the mosaic-chimeric Ad5/40S vectors produced with these cells (displaying both F40S and F5 fibers on the capsid) could infect cell lines expressing the CAR receptor better, and thus produce better yield when propagated on such cells. For this purpose, 293F cells (CAR-expressing cells) were infected with different concentrations (30, 100 and 300pp/cell) of Ad5/40S vectors (Figure 2). Results have shown that mosaic/chimeric Ad5/40S generated in 211BS

cells infected 4 to 5 times more the 293F cells (p -value < 0.001) than chimeric Ad5/40S, regardless the condition used, indicating that the presence of Ad5 fibers helps mosaic vectors to infect 293F cells.

Polybrene Improves Chimeric Adenovirus 5/40S Infection in 211BS Cells

Cationic polymers such as polybrene are well known enhancers of retrovirus and lentivirus vectors gene transfer efficiency [29–31]. Polybrene increases retrovirus transduction by enhancing receptor-independent virus adsorption on target cell membranes. We hypothesized that addition of polybrene during amplification cycles would also facilitate the entry of Ad5/40S particles into producer cells. In fact, cationic polymers like polybrene were also reported to interact with negatively charged Ad5 capsids facilitating their interaction with the cell membrane [32]; [33]. However, when adenovirus particles have a more neutral charge, as it happens to CAV-2, cationic molecules (including polybrene) do not interact well to virions [34]. Of note, the tail and shaft domains of the F40S protein have a high content of basic amino acids, which results in a pI of 9.1 compared to a pI of 6.1 for Ad5 fiber protein (pI values were calculated by the EMBL WWW Gateway to Isoelectric Point Service). Based on the above, the overall negative charge of Ad5/40S particles should be lower than that of Ad5 particles. Therefore, it was unclear whether polybrene would have an effect on the chimeric adenovirus entry to target cells.

To test the effect of polybrene on chimeric adenovirus infection, 293F and 211BS cells were infected with increasing MOI's of Ad5/40S-CMV-GFP, in presence or absence of polybrene (9 μ g/ml or 0 μ g/ml, respectively). The percentage of infected cells and the level of the GFP expression per cell were determined by FACS analyses. As observed in Figure 3, polybrene significantly enhances both, the percentage of infected 293 and 211BS cells (A-D, E-P) and the gene expression per cell (C, D), while cell viability seems to be not affected.

Study of Ad5/40S Viral Cycle in 211BS

Ad5/40S produced by 211BS cells are expected to have both, F5 and F40S proteins (mosaic-chimeric Ad5/40S) whereas Ad5/40 produced by 293F cells should only display F40S on their surface (chimeric Ad5/40S) (Figure 4A). In order to maximize productivity of Ad5/40S, we envisioned a production scheme in which amplification of the chimeric vector is performed in 211BS (Figure 4B). However, in order to obtain pure chimeric (not mosaic) Ad5/40S particles, the last step of amplification needs to be performed in 293F cells.

We had previously reported that chimeric adenovirus Ad5/40S had a viral cycle between 48 and 60 hours [20]. To more accurately determine the optimal harvesting time, a more precise analysis of Ad5/40S viral cycle was performed. In this study, viral titers were measured every 4 hours between 44 and 64 hours post-infection. In addition, we worked at a low MOI (0.5) to avoid saturation and displacement of the curve associated to the entry of several particles per cell, which may accelerate the virus cycle. As it can be observed in Figure 5, at a MOI of 0.5, the main production peak is at 56 hours post-infection.

Vector Ad5/40S Production with the Optimized Protocol

To confirm the strength of the developed production strategy, suspension growing 211BS cells were infected with Ad5/40S-CMV-GFP at a MOI of 1 in the presence of polybrene. At 56 hours post-infection cells were harvested, lysed by freeze-thaw and

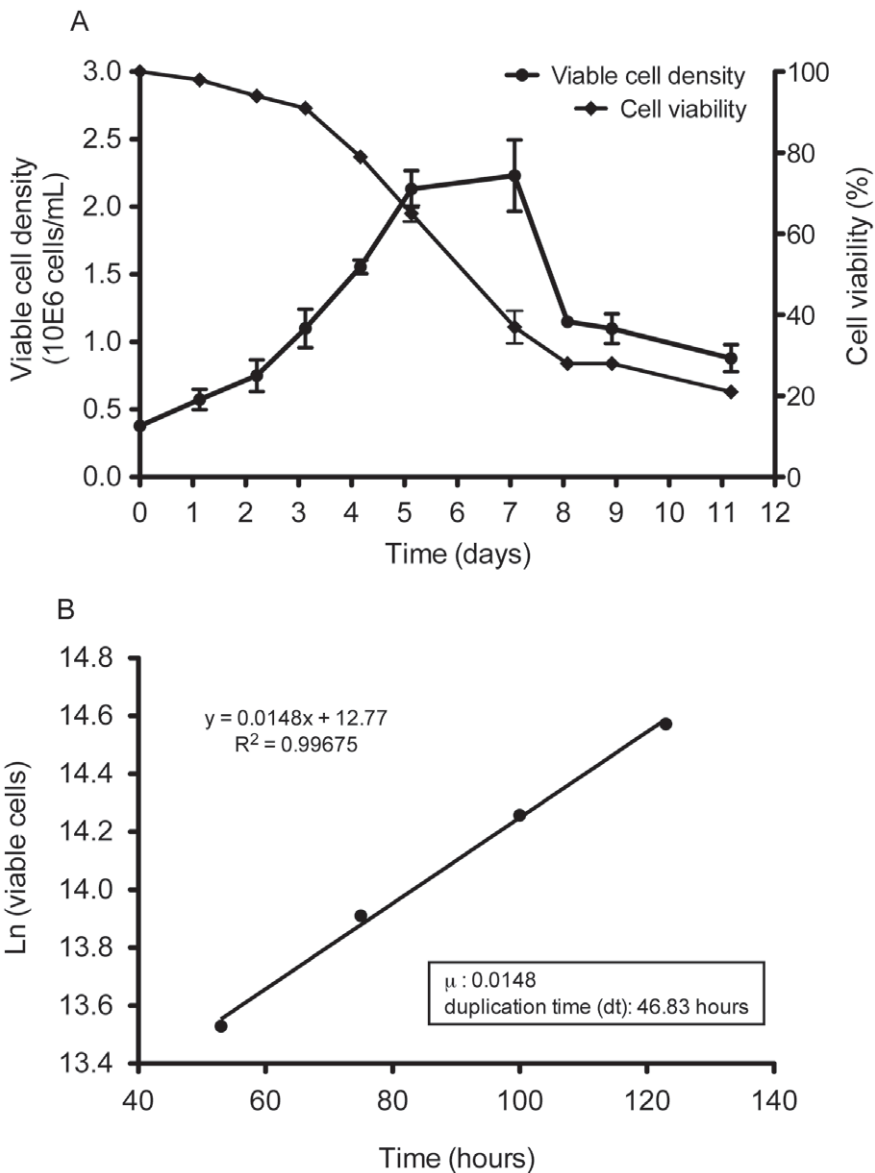


Figure 1. Characterization of 211BS cells. (A) Cell growth curve and viability of suspension-adapted 211BS cells. (B) Duplication time of the suspension-adapted cell line.

doi:10.1371/journal.pone.0042073.g001

cell debris was removed by centrifugation. The resulting lysate was used to infect 4×10^8 293F cells. Fifty six hours post-infection, cells were harvested and centrifuged to separate cell pellet and supernatant. Since the Ad5/40S-CMV-GFP virus contains the Death Protein (ADP) gene, which may facilitate virus release into the supernatant by cellular lysis [35], supernatants were concentrated by ultrafiltration using a hollow fiber ultrafiltration system. Subsequently, adenovirus particles from both, the cell pellet and the concentrated supernatant were purified by CsCl gradients followed by gel filtration. Viral titers in physical particles and infectious particles have an average yield of 0.85×10^{12} pp and 3.8×10^9 IU, for the original protocol, and 1.75×10^{12} pp and 6.9×10^9 IU, for the optimized protocol (Table 1), with an average productivity around 250pp/cell. As observed in Figure 4C, the number of viral amplification steps required is considerably lower in the optimized protocol vs. the original protocol; which translates

into the reduction of consumables and time needed for vector production.

Discussion

One of the key factors for successful gene therapy is to have a vector that efficiently and selectively infects target cells, thereby minimizing the side effects associated with transgene expression in unwanted cells. Previous results reported by our group showed that chimeric Ad5/40S vectors display a marked intestinal tropism likely attributable to the Ad40 short fiber protein [20]. These chimeric vectors could be used for gene therapy of diseases affecting the gastrointestinal tract. However, Ad5/40S vectors cannot be efficiently amplified, probably because of the absence or low abundance of the primary receptors for F40S in the permissive producing HEK-293 cells, resulting in poor virus production.

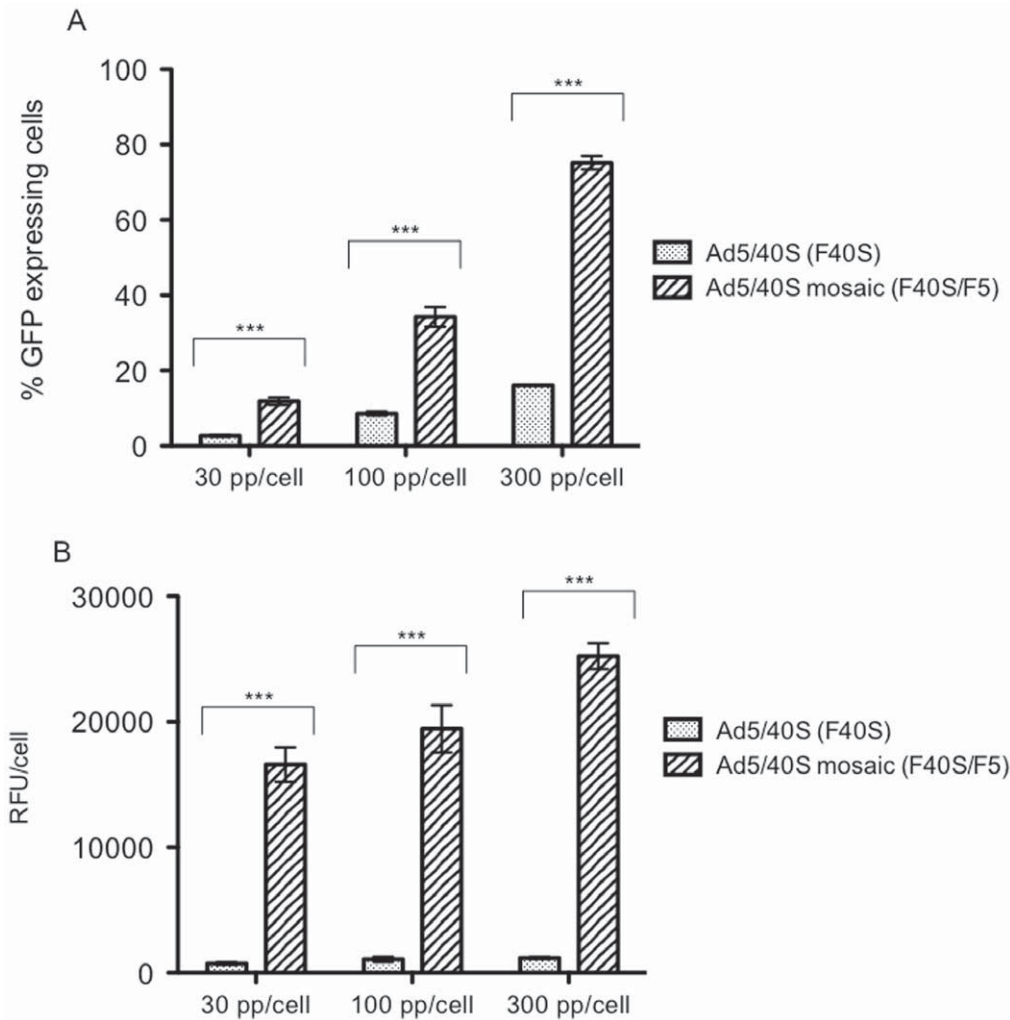


Figure 2. Analysis of the infection efficiency of mosaic-chimeric Ad5/40S-CMV-GFP vector. Percentage of GFP expressing cells (A); and quantification of relative GFP expression per cell (B). The infection was performed in cells 293F using 3 different concentrations of the Ad5/40S vectors (30, 100, 300pp/cell). Values presented are shown as mean \pm Standard Deviation using $n=8$ for each condition. Statistical comparisons between groups were made by two-ways ANOVA with a post hoc Bonferroni test for multiple comparisons (***) p -value <0.001 . doi:10.1371/journal.pone.0042073.g002

In order to improve Ad5/40S viral titers, we have designed an optimized production strategy using 211B producer cells. These cells constitutively express F5, and therefore upon infection with Ad5/40S, fiber mosaic virus particles (displaying both F5 and F40S on their capsids) are formed. The 211B cell line was originally used to retarget non-Ad5 or fiberless-Ad5 particles in order to easily and rapidly change their tropism in vivo [26]. In this work, we have used this retargeting strategy to facilitate re-entry of the mosaic-chimeric Ad5/40S virions during amplification steps, through interaction between the F5 fiber protein of the virus capsid and the CAR receptors on 211B producer cells. An attractive aspect of this dual strategy is its flexibility, since it can be used to amplify any chimeric Ad5 vector by substituting the F5 protein with the fiber protein from another serotype, especially when the chimeric vector does not efficiently infect permissive HEK-293 cells.

To further facilitate the entry of Ad5/40S particles into producing cells we have also added polybrene during amplification cycles. One of the major advantages of polybrene is that it can be added directly to the media, as it does not require previous formation of complexes with pure adenovirus particles, thus

avoiding the need for purification of the vector during the amplification process. Of note, polybrene-mediated enhancing effects on adenovirus infection are only observed when using Freestyle serum-free medium, whereas SFMII medium completely blocks the effect of polybrene (data not shown). Interestingly, the same trend is observed with other cationic molecules such as polyethylenimine (PEI) used for transient transfection [36], suggesting the presence of compounds in SFMII serum-free medium that may counteract with cationic polymers (i.e. negatively charged polymers such as heparin or dextran sulphate typically added to commercial media to keep cells in suspension). Last we have also analyzed the viral cell cycle of chimeric Ad5/40S vectors and determined 56 hours after infection as the most appropriate time to stop the production process and harvest the virus.

In summary, a new chimeric Ad5/40S production procedure has been developed in this work. The strategy is based on the use of cultures in suspension to allow the scalability of the production process, as well as, on increasing chimeric Ad5/40S infectivity towards producer cells and consequently, allowing a higher productivity per cell, from an initial amplification factor per step

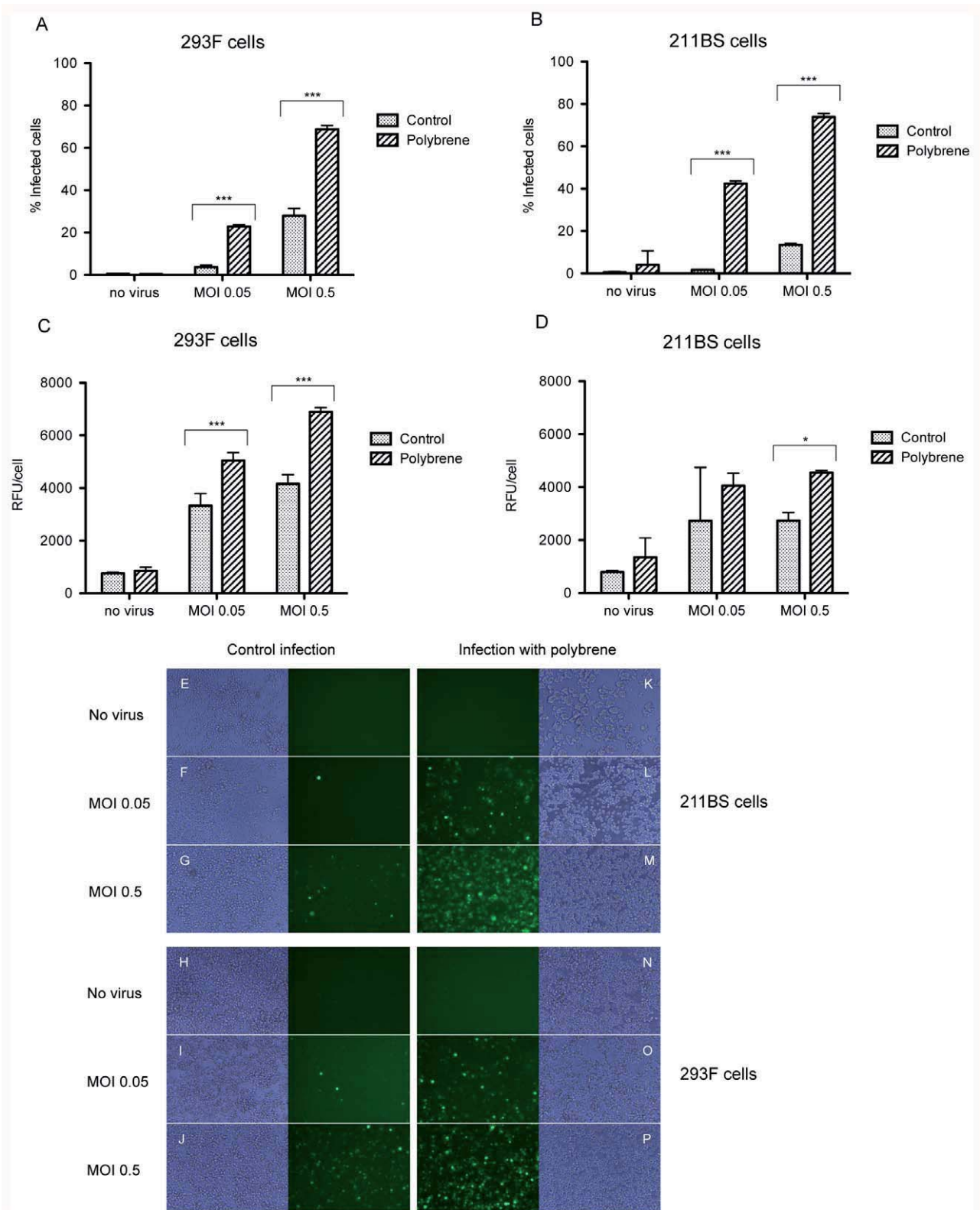
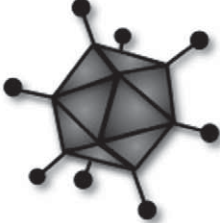

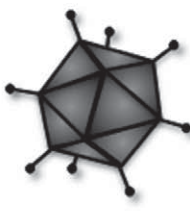
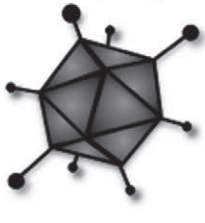
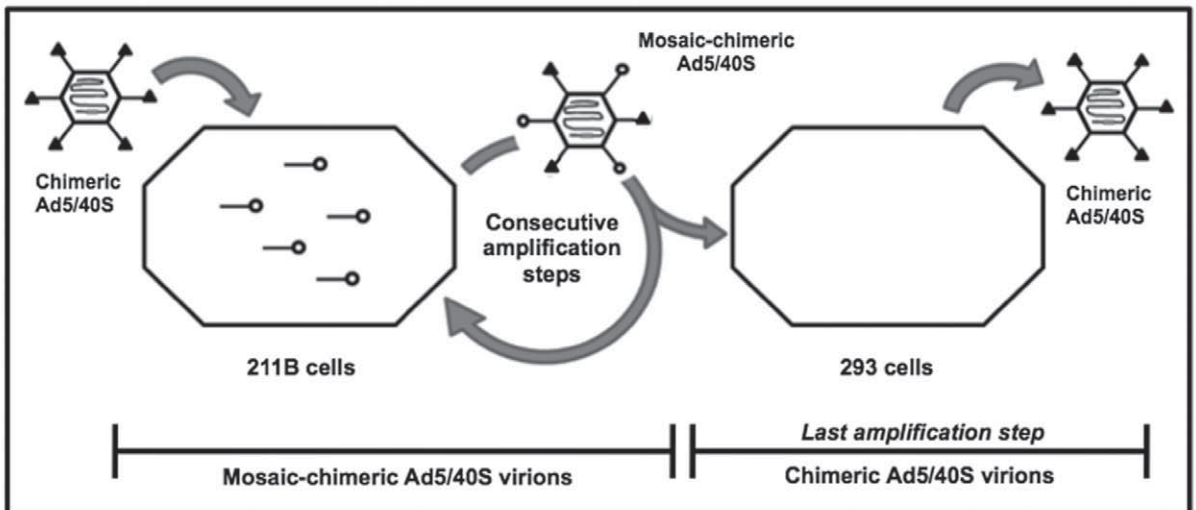


Figure 3. Analysis of the infection efficiency of Ad5/40S with polybrene. Percentage of Ad5/40S-CMV-GFP infection in 293F (A) and 211BS cells (B) using two different doses (MOI 0.05 and 0.5). Quantification of the GFP expression (RFU/cell) in 293F (C) and 211BS cells (D). E-P: GFP expression of Ad5/40S in 211BS and 293F infected cells in presence (E-J) or absence (K-P) of polybrene. Results are the average two independent experiments performed in triplicate. Statistical comparisons between groups were made by two-ways ANOVA with a post hoc Bonferroni test for multiple comparisons (***) p-value <0.0001; * p-value <0.05). doi:10.1371/journal.pone.0042073.g003

A

Ad5	Ad40	Chimeric Ad5/40S	Mosaic/Chimeric Ad5/40S
Efficient production	Not possible to produce in the lab	Possible but inefficient production	Optimized production
Broad tropism	Enteric tropism	Enteric tropism	N.T. (expected enteric tropism)
			

B



C

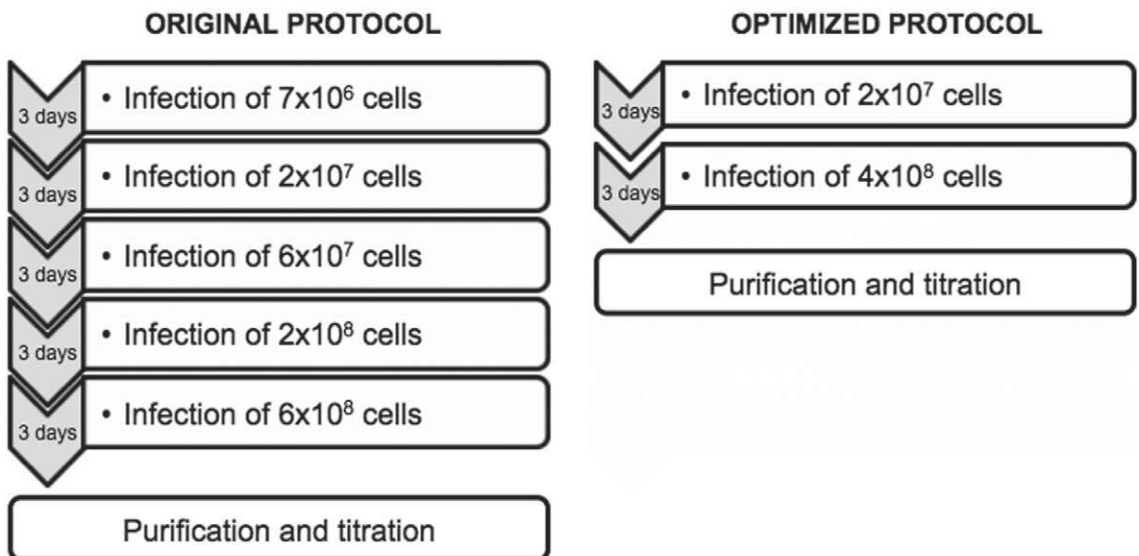


Figure 4. Diagrams of the chimeric amplification process. (A) Comparative diagram of Ad4, Ad40, chimeric Ad5/40S and mosaic-chimeric Ad5/40 vectors. N.T.: Not Tested. (B) Amplification strategy of Ad5/40S vectors. The first amplification step is performed by infecting 211BS cells with the chimeric Ad5/40S and polybrene. Intermediate steps are performed also in 211BS cells by using mosaic-chimeric Ad5/40S and polybrene. Last step is performed in 293F cells to obtain chimeric Ad5/40S vectors. (C) Comparative diagram of duration and cell-scale.

of $\times 3\text{--}4$ up to $\times 20\text{--}25$ times as observed now. This allows reducing the number of amplification steps, which carries several advantages such as minimization of total processing time of virus production, reduction of consumables, and most importantly, it decreases the risk of generating replication competent virions by recombination of vector sequences with E1 sequences present in the cells used for production.

Materials and Methods

Virus Stock Generation

Ad5/40S-GFP-CMV was obtained from Dr. Hirofumi Hamada (Sapporo Medical University). Adherent HEK-293 cells (Q-BIOgene, Montreal, Canada) were grown in DMEM medium (E15-810, PAA laboratories, Linz, Austria) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (PAA laboratories, Linz, Austria) and Penicillin (100 U/ml)/Streptomycin (0,1 mg/ml) (PAA laboratories, Linz, Austria). Viral stocks were generated by infection and sequential amplification in HEK 293 cell cultures grown in 15-cm plates until 30 plates were reached. Virus was purified by two consecutive rounds of CsCl isopycnic density ultracentrifugation and desalted using a Sephadex PD-10 column (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) as previously reported [37]. In order to facilitate cloning of therapeutic genes into the Ad5/40S genome, we have adapted the procedure in bacteria and constructed a new plasmid (pER F40S) carrying the Ad5 genome but with the F40S gene instead of the F5 gene.

211B Adaptation to Suspension Culture

Adherent 211B cells [27] were cultured in DMEM supplemented with 10% FBS and Penicillin (100 U/ml)/Streptomycin (0,1 mg/ml). For adaptation to suspension culture and low protein conditions, this culture medium was gradually substituted throughout 8 culture passages with SFMII (11686-029, GIBCO),

supplemented with 4 mM Glutamine (PAA laboratories, Linz, Austria), Penicillin (100 U/ml)/Streptomycin (0,1 mg/ml) and 1% Pluronics (24040-032, GIBCO). 211B cells in suspension (termed 211BS) were then transferred to 125 mL polycarbonate shake flasks at a density of 8×10^5 cells/ml and kept in suspension by agitation in an orbital shaker at a speed of 110 rpm, 37°C and 5% CO_2 .

Growth kinetics of 211BS cells was evaluated in two independent experiments from passages 20 and 30. Cells were seeded at a density of 3.5×10^5 cells/ml in shake flasks containing 20 ml of cell suspension. The experiment was run in triplicate. Viable and dead cells were counted daily for a period of 12 days. The specific growth constant (μ) corresponds to the slope of the fitted line during the exponential growth phase. The cell culture doubling time (td) was calculated as $\text{td} = \ln 2/\mu$.

Effect of Polybrene on Ad5/40S Infectivity

211BS cells were seeded at a density of 1×10^6 cells/ml in a final volume of 1 ml per well in 24-well plates and infected with Ad5/40S-CMV-GFP at two different MOI's (0.5 or 0.05). Control cells were not infected. Infections were performed in the presence or absence of polybrene (9 $\mu\text{g}/\text{ml}$, as previously described [32,38] ($n = 4$) in Freestyle serum-free medium (12338-018, Invitrogen) supplemented with Penicillin (100 U/ml)/Streptomycin (0,1 mg/ml) and 1% Pluronics (24040-032, Invitrogen). Cell cultures were supplemented with 0.5% FBS 4 hpi and harvested 30 hpi. After fixation with 2% paraformaldehyde, the percentage of GFP expressing cells was determined by FACS analysis (FACSCanto, Cytometry Service of Institute of Biochemistry and Biotechnology of UAB).

Analysis of Ad5/40S cell cycle in 293 F cells

293F cells (11625-019, Invitrogen, Paisley, UK) were grown to a density of 1×10^6 cells/ml in 125 mL shake flasks and infected

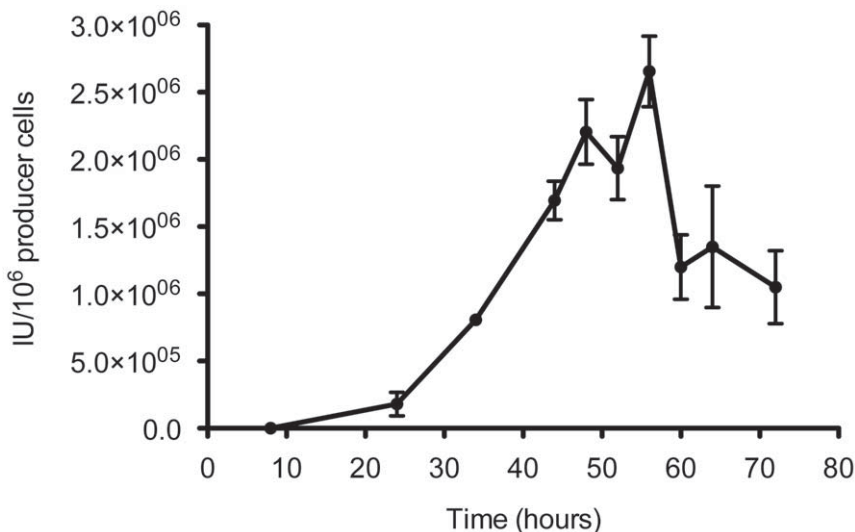


Figure 5. Virus cell cycle of mosaic-chimeric Ad5/40S vectors. 211BS cells were infected with Ad5/40S-GFP at MOI=0.5. Samples were collected every 4 hours between 44 h and 64 h post-infection. Productivity is measured in total infection units produced per 10^6 cells.

Table 1. Comparative table between the original and newly optimized protocols.

	Original protocol (n=5)	Optimized protocol (n=8)
Time in obtaining harvest	15 days	6 days
Number of amplification steps	5	2
Number of cells	2×10^8	2×10^8
Necessary growth medium	180 mL	200 mL
Titration (Infection Units in 293 cells)	$3,8 \times 10^9$ IU	$6,9 \times 10^9$ IU
Titration (Physical Particles)	$0,85 \times 10^{12}$ pp	$1,75 \times 10^{12}$ pp

doi:10.1371/journal.pone.0042073.t001

with mosaic-chimeric Ad5/40S at a MOI of 0.5. The culture medium was replaced with fresh medium 8 hpi. Cells were transferred to 6-well plates (2 ml per well) and maintained at a speed of 110 rpm at 37°C and 5% CO₂. At various points post-infection, cells were harvested (n = 5) and frozen at -80°C. Cell pellets were lysed by 3 freeze-thaw cycles and lysates titered. At 48 hours cells were fixed with 2% paraformaldehyde and the percentage of GFP expressing cells was assessed by FACS analyses.

Vector Production Using the Optimized Protocol

211BS cells were grown to a density of 1×10^6 cells/ml in 125 mL shake flasks (25 ml working volume) in Freestyle serum-free media supplemented with Penicillin (100 U/ml)/Streptomycin (0,1 mg/ml) and 1% Pluronic. Cells were infected with Ad5/40S-CMV-GFP at a MOI of 1. The infection was performed in presence of polybrene (9 µg/ml). Cell cultures were supplemented with 0.5% FBS 4 hpi and the percentage of GFP positive cells was estimated by fluorescence microscopy 30 hpi. Cell cultures were harvested 56 hpi and frozen at -80°C. Cells were lysed by 3 freeze-thaw cycles, centrifuged at 1620×g for 5 min to remove cell debris.

The last amplification cycle was performed in 293F cells grown to a density of 1×10^6 cells/ml in 1L-shake flasks (200 ml working

volume) in Freestyle serum-free media supplemented with Penicillin (100 U/ml)/Streptomycin (0,1 mg/ml) and 1% Pluronic. Cell cultures were infected by adding the cell lysate from the previous amplification step. The infection was performed in presence of polybrene (9 µg/ml). Cell cultures were supplemented with 0.5% FBS 4 hpi and harvested 56 hpi by centrifugation at 180×g during 5 min. The cell pellet was resuspended in 20 mL of supernatant and the remaining supernatant (~190 ml) was stored separately at -80°C. The latter was concentrated down to 20 ml using a Midjet system (56-4110-25, Amersham Biosciences Corp., Westborough, MA, USA). The cell pellet was lysed by 3 freeze-thaws cycles, cell debris was removed by centrifugation at 1150×g during 5 min and mixed with the previously concentrated supernatant. The crude viral stock was purified by double CsCl gradient, and chromatography using a molecular exclusion column as described above.

Titration of Viral Physical and Infectious Viral Particles

Final purified viral stocks titers (physical particles/ml) were determined by optical density at 260 nm (1 OD₂₆₀ unit = 1×10^{12} particles/ml), and infectivity (infectious units/ml) was measured by end-point dilution assay [39,40]. Briefly, end-point dilution assay was performed by infecting HEK-293 cells with serially diluted virus samples in triplicate in the presence of polybrene (9 µg/ml). The number of transgene (GFP) expressing cells was determined 48–72 hpi by fluorescence microscopy.

Acknowledgments

The authors wish to thank Dr. Glen Nemerow (The Scripps Research Institute, USA) for kindly providing 211B cells, and Dr. Mercè Monfar for critically reading the manuscript.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MMS AB MC. Performed the experiments: MM MMS MP. Analyzed the data: MM MMS AB MC. Contributed reagents/materials/analysis tools: MC. Wrote the paper: MM MMS AB MC.

References

- Cunliffe NA, Booth JA, Elliot C, Lowe SJ, Sopwith W, et al. (2010) Healthcare-associated viral gastroenteritis among children in a large pediatric hospital, United Kingdom. *Emerg Infect Dis* 16: 55–62.
- Uhnou I, Wadell G, Svensson L, Johansson ME (1984) Importance of enteric adenoviruses 40 and 41 in acute gastroenteritis in infants and young children. *J Clin Microbiol* 20: 365–372.
- Wilhelmi I, Roman E, Sanchez-Fauquier A (2003) Viruses causing gastroenteritis. *Clin Microbiol Infect* 9: 247–262.
- Brown M, Petric M, Middleton PJ (1984) Diagnosis of fastidious enteric adenoviruses 40 and 41 in stool specimens. *J Clin Microbiol* 20: 334–338.
- Brown M, Wilson-Friesen HL, 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.
- Hashimoto S, Sakakibara N, Kumai H, Nakai M, Sakuma S, et al. (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.
- Sherwood V, Burgert HG, Chen YH, Sanghera S, Katafigiotis S, 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.
- Tiemessen CT, Kidd AH (1994) Adenovirus type 40 and 41 growth in vitro: host range diversity reflected by differences in patterns of DNA replication. *J Virol* 68: 1239–1244.
- Bergelson JM, Cunningham JA, Droguett G, Kurt-Jones EA, Krithivas A, et al. (1997) Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* 275: 1320–1323.
- Roelink PW, Lizonova A, Lee JG, Li Y, Bergelson JM, et al. (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.
- Tatsis N, Ertl HC (2004) Adenoviruses as vaccine vectors. *Mol Ther* 10: 616–629.
- Tomko RP, Xu R, 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.
- Gall J, Kass-Eisler A, Leinwand L, Falck-Pedersen E (1996) Adenovirus type 5 and 7 capsid chimera: fiber replacement alters receptor tropism without affecting primary immune neutralization epitopes. *J Virol* 70: 2116–2123.
- Krasnykh VN, Mikheeva GV, Douglas JT, Curiel DT (1996) Generation of recombinant adenovirus vectors with modified fibers for altering viral tropism. *J Virol* 70: 6839–6846.
- Nakamura T, Sato K, Hamada H (2003) Reduction of natural adenovirus tropism to the liver by both ablation of fiber-coxsackievirus and adenovirus receptor interaction and use of replaceable short fiber. *J Virol* 77: 2512–2521.
- Kidd AH, Chroboczek J, Cusack S, Ruigrok RW (1993) Adenovirus type 40 virions contain two distinct fibers. *Virology* 192: 73–84.
- Tiemessen CT, Kidd AH (1995) The subgroup F adenoviruses. *J Gen Virol* 76 (Pt 3): 481–497.
- Seiradake E, Cusack S (2005) Crystal structure of enteric adenovirus serotype 41 short fiber head. *J Virol* 79: 14088–14094.
- Kesisoglou F, Chamberlain JR, Schmiedlin-Ren P, Kaz A, Fleisher D, et al. (2005) Chimeric Ad5 vectors expressing the short fiber of Ad41 show reduced affinity for human intestinal epithelium. *Mol Pharm* 2: 500–508.
- Rodriguez R, Romero C, Ferrer M, Burgueño JF, Gil G, et al. (2006) Therapeutic Potential of the Chimeric Adenovirus 5/40 as Vector for Intestine-Directed Gene Therapy. *Molecular Therapy* 13: S5.

21. Lu ZZ, Zou XH, Dong LX, Qu JG, Song JD, et al. (2009) Novel recombinant adenovirus type 41 vector and its biological properties. *J Gene Med* 11: 128–138.
22. Yang Y, Nunes FA, Berencsi K, Furth EE, Gonczol E, et al. (1994) Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenoviruses for gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 4407–4411.
23. Nicol CG, Graham D, Miller WH, White SJ, Smith TA, et al. (2004) Effect of adenovirus serotype 5 fiber and penton modifications on in vivo tropism in rats. *Mol Ther* 10: 344–354.
24. Schoggins JW, Gall JG, Falck-Pedersen E (2003) Subgroup B and F fiber chimeras eliminate normal adenovirus type 5 vector transduction in vitro and in vivo. *J Virol* 77: 1039–1048.
25. Schoggins JW, Nociari M, Philpott N, Falck-Pedersen E (2005) Influence of fiber detargeting on adenovirus-mediated innate and adaptive immune activation. *J Virol* 79: 11627–11637.
26. Von Seggern DJ, Huang S, Fleck SK, Stevenson SC, Nemerow GR (2000) Adenovirus vector pseudotyping in fiber-expressing cell lines: improved transduction of Epstein-Barr virus-transformed B cells. *J Virol* 74: 354–362.
27. Von Seggern DJ, Kehler J, Endo RI, Nemerow GR (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.
28. Kamen A, Henry O (2004) Development and optimization of an adenovirus production process. *J Gene Med* 6 Suppl 1: S184–192.
29. Davis HE, Rosinski M, Morgan JR, Yarmush ML (2004) Charged polymers modulate retrovirus transduction via membrane charge neutralization and virus aggregation. *Biophys J* 86: 1234–1242.
30. Kaplan JM, Pennington SE, St George JA, Woodworth LA, Fasbender A, et al. (1998) Potentiation of gene transfer to the mouse lung by complexes of adenovirus vector and polycations improves therapeutic potential. *Hum Gene Ther* 9: 1469–1479.
31. Wang C, Pham PT (2008) Polymers for viral gene delivery. *Expert Opin Drug Deliv* 5: 385–401.
32. Jacobsen F, Hirsch T, Mittler D, Schulte M, Lehnhardt M, et al. (2006) Polybrene improves transfection efficacy of recombinant replication-deficient adenovirus in cutaneous cells and burned skin. *J Gene Med* 8: 138–146.
33. Arcasoy SM, Latoche JD, Gondor M, Pitt BR, Pilewski JM (1997) Polycations increase the efficiency of adenovirus-mediated gene transfer to epithelial and endothelial cells in vitro. *Gene Ther* 4: 32–38.
34. Schoehn G, El Bakkouri M, Fabry CM, Billet O, Estrozi LF, et al. (2008) Three-dimensional structure of canine adenovirus serotype 2 capsid. *J Virol* 82: 3192–3203.
35. Doronin K, Toth K, Kuppuswamy M, Krajcsi P, Tollefson AE, et al. (2003) Overexpression of the ADP (E3–11.6 K) protein increases cell lysis and spread of adenovirus. *Virology* 305: 378–387.
36. Geisse S, Di Maiuta N, Ten Buren B, Henke M (2005) The secrets of transfection in serum-free suspension culture. In: Godia F, Fussenegger M, editors. *Animal Cell Technology meets Genomics* Springer Netherlands. 373–376.
37. Alba R, Hearing P, Bosch A, 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.
38. Clark PR, Stopeck AT, Brailey JL, Wang Q, McArthur J, et al. (1999) Polycations and cationic lipids enhance adenovirus transduction and transgene expression in tumor cells. *Cancer Gene Ther* 6: 437–446.
39. Chillon M, Alemany R (2011) Methods to construct recombinant adenovirus vectors. *Methods Mol Biol* 737: 117–138.
40. Zabner J, Chillon M, Grunst T, Moninger TO, Davidson BL, et al. (1999) A chimeric type 2 adenovirus vector with a type 17 fiber enhances gene transfer to human airway epithelia. *J Virol* 73: 8689–8695.

1.2.1.2. Patente: Método para la producción de adenovirus mosaico

MÉTODO PARA LA PRODUCCIÓN DE ADENOVIRUS MOSAICO

Inventores: Marta Miralles, Miguel Chillón, Assumpció Bosch, Ester Rodríguez

Número de publicación: WO2012085322 A1

Número de solicitud: PCT/ES2011/070897

Fecha de prioridad: 24 Diciembre 2010

Resumen:

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 polication (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.



Justificante de presentación electrónica de solicitud de patente

Este documento es un justificante de que se ha recibido una solicitud española de patente por vía electrónica, utilizando la conexión segura de la O.E.P.M. Asimismo, se le ha asignado de forma automática un número de solicitud y una fecha de recepción, conforme al artículo 14.3 del Reglamento para la ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes. La fecha de presentación de la solicitud de acuerdo con el art. 22 de la Ley de Patentes, le será comunicada posteriormente.

Número de solicitud:	P201031938	
Fecha de recepción:	24 diciembre 2010, 10:47 (CET)	
Oficina receptora:	OEPM Madrid	
Su referencia:	P5664ES00	
Solicitante:	UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA	
Número de solicitantes:	2	
País:	ES	
Título:	MÉTODO PARA LA PRODUCCIÓN DE ADENOVIRUS MOSAICO	
Documentos enviados:	Descripcion.pdf (23 p.) Reivindicaciones.pdf (3 p.) Dibujos.pdf (5 p.) Resumen.pdf (1 p.) OLF-ARCHIVE.zip	package-data.xml es-request.xml application-body.xml es-fee-sheet.xml feesheet.pdf request.pdf
Enviados por:	CN=NOMBRE ARIAS SANZ JUAN - NIF 00809834G,OU=500050022,OU=FNMT Clase 2 CA,O=FNMT,C=ES	
Fecha y hora de recepción:	24 diciembre 2010, 10:47 (CET)	
Codificación del envío:	42:22:55:F7:32:86:7B:AB:57:3A:D6:D6:C3:D6:88:FC:45:A9:E8:83	

/Madrid, Oficina Receptora/

1.2.2. Adenovirus 5

Paralelamente al desarrollo de un protocolo optimizado para el Ad5/40S, y con el propósito de estudiar los efectos de la expresión de IL23R4 y IL23R1 se clonaron estos genes en el genoma del Ad5.

Las secuencias génicas de IL23R1 e IL23R4 (transmembrana y soluble, respectivamente), fueron clonadas por ligación mediante enzimas de restricción en el plásmido lanzadera p6600. Posteriormente, por recombinación homóloga mediada por secuencias del genoma adenoviral, fueron clonadas en el plásmido pKP1.3, que contiene el genoma del adenovirus 5 (**Figura 13**). Las construcciones positivas fueron amplificadas y recomprobadas. Finalmente fueron digeridas por *PacI* para linearizar el genoma del Ad (aspecto imprescindible para permitir la replicación del genoma adenoviral en células HEK293), así como para eliminar las secuencias bacterianas OriP el gen de la resistencia a la Ampicilina.

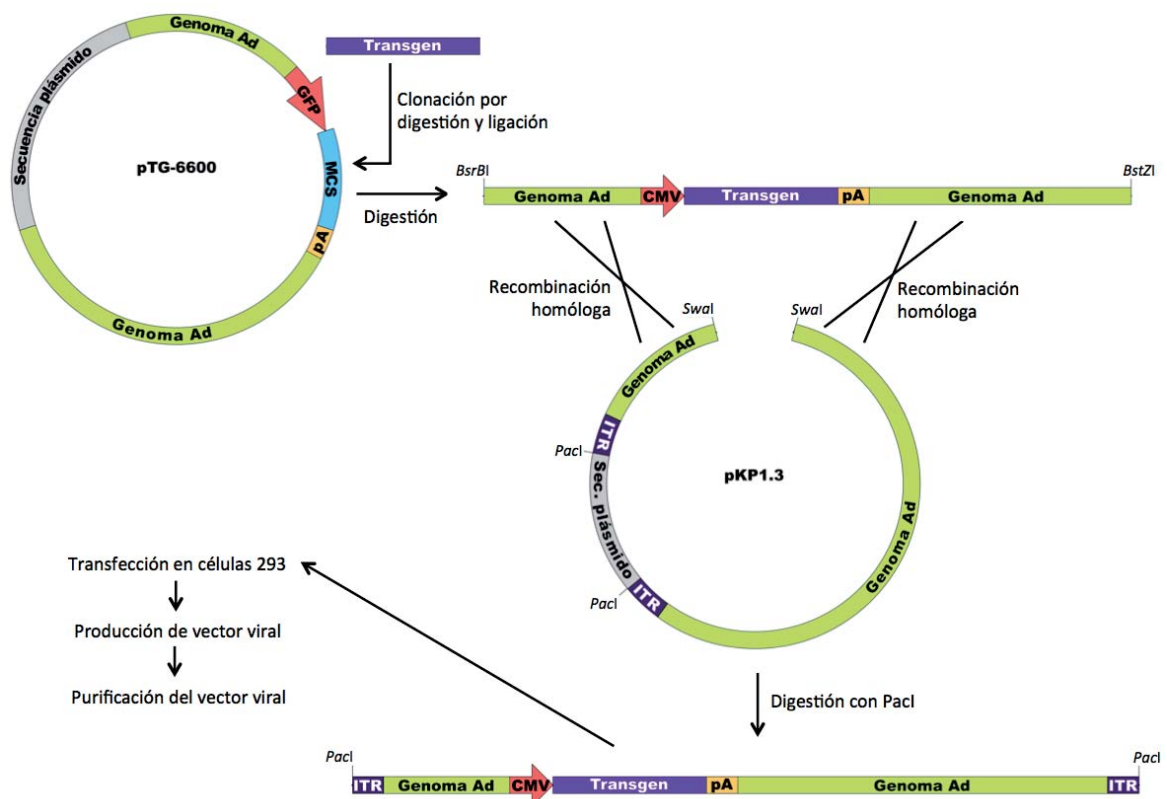


FIGURA 13. Esquema de la estrategia de clonación de las secuencias IL23R4 y IL23R1 en el genoma del Ad5.

MCS: multicloning site. pA: secuencia de poliadenilación. CMV; promotor citomegalovirus. ITR: secuencias *inverted terminal repeat*.

A continuación, las células permisivas HEK293 se transfectaron con el genoma linearizado y se permitieron 3-4 ciclos de amplificación para generar un pre-stock viral, hasta su producción final y posterior purificación y titulación (**Figura 14**).

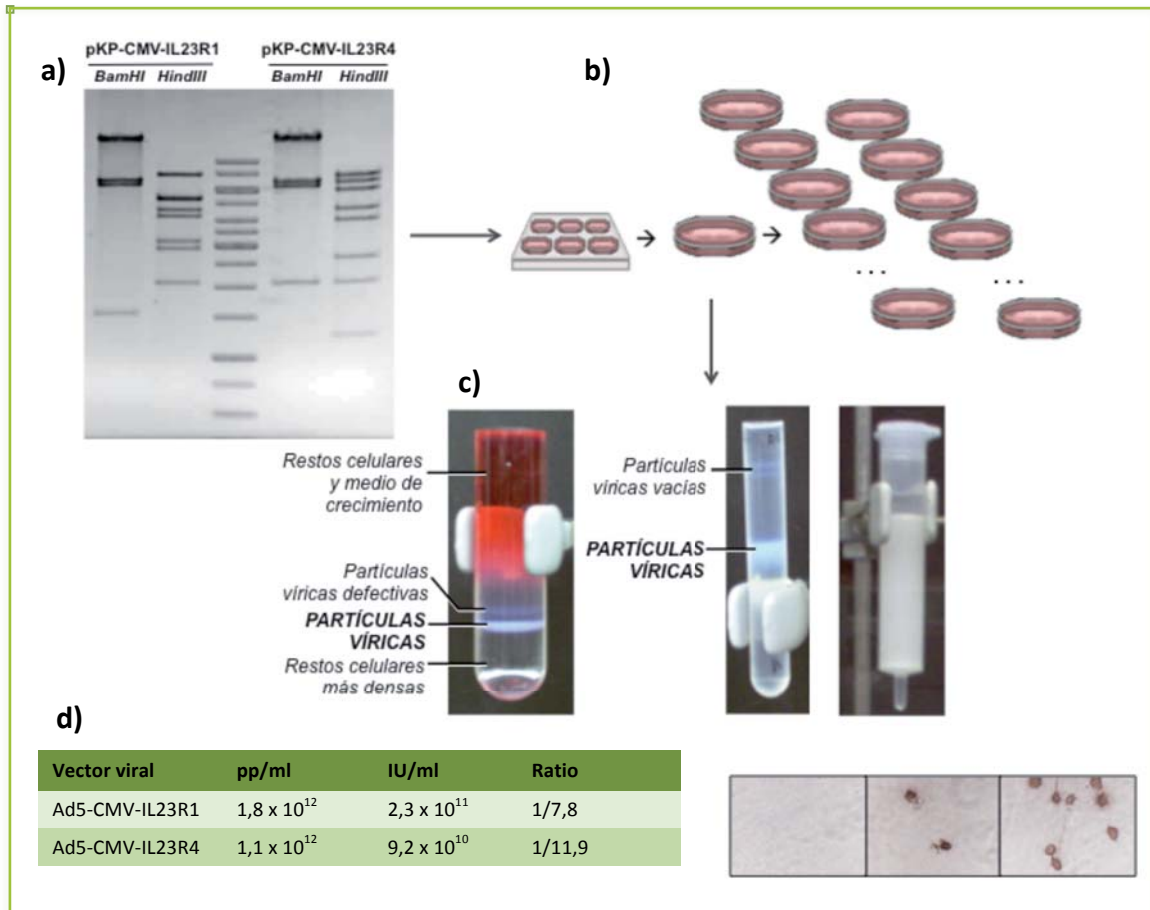


FIGURA 14. Producción de los Adenovirus portadores de los genes IL23R1 e IL23R4. **a)** Comprobación mediante enzimas de restricción de los plásmidos portadores del genoma adenoviral con el gen clonado. **b)** Transfección de los plásmidos linearizados en células HEK293 y amplificación del virus. **c)** Purificación del virus mediante dos gradientes de densidad de CsCl (primero discontinuo, segundo continuo) y una columna de exclusión por tamaño. **d)** Titrulaciones de los Ad5 producidos, portadores de los genes IL23R4 (soluble) e IL23R1 (transmembrana) humano.

Una vez generados los diferentes vectores virales se comprobó la correcta transcripción de los genes clonados. Para ello, se infectaron células Jurkat (línea celular derivada de linfocitos humanos) con las siguientes combinaciones de virus:

- Ad5-CMV-GFP (10.000 pp/cell)
- Ad5-CMV-GFP (5.000 pp/cell) + Ad5-CMV-IL23R1 (5.000 pp/cell)
- Ad5-CMV-GFP (5.000 pp/cell) + Ad5-CMV-IL23R4 (5.000 pp/cell)
- Células sin infectar.

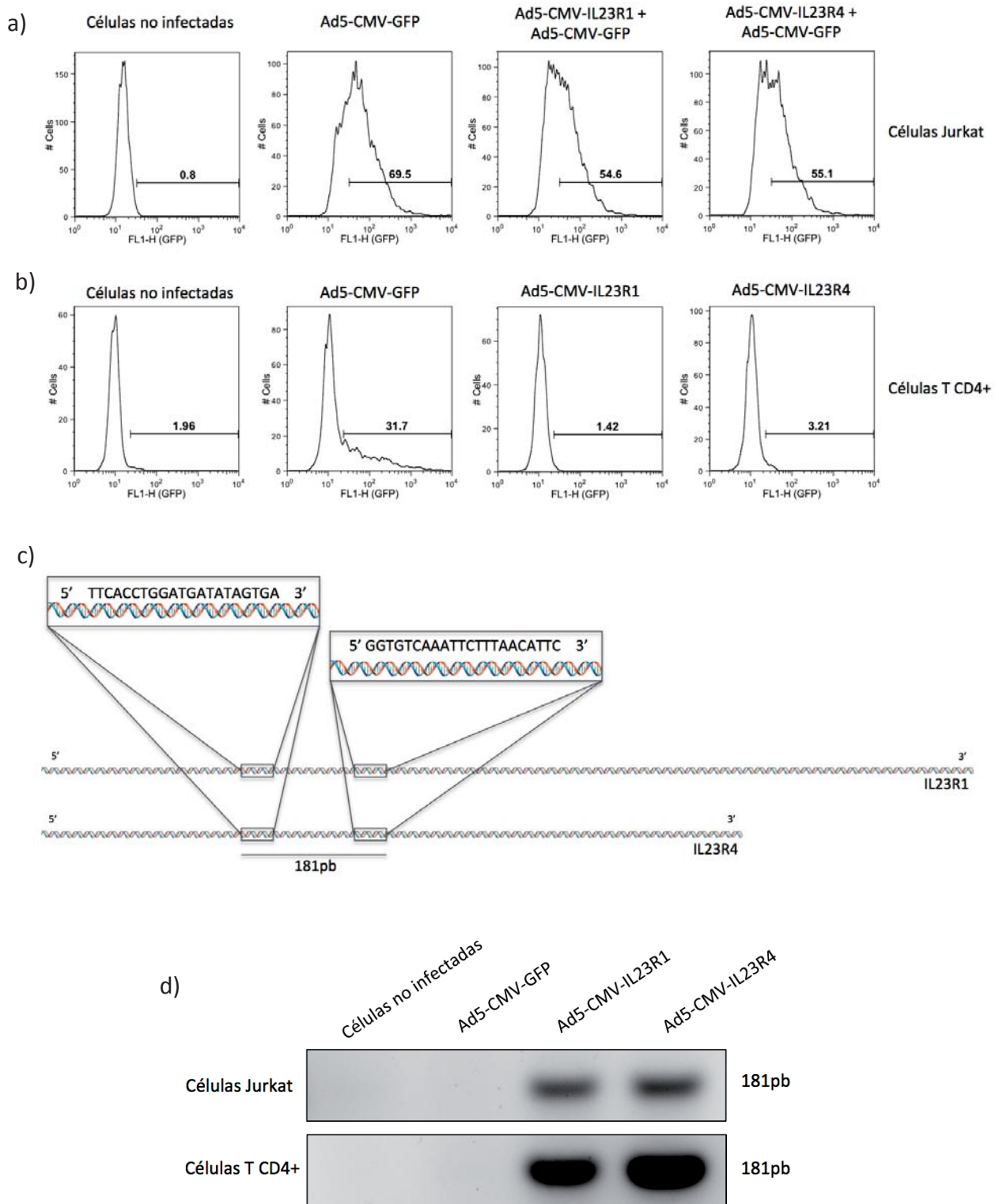


FIGURA 15. Análisis de expresión del transgen en Ad5-CMV-IL23R1 y Ad5-CMV-IL23R4. Comprobación de la expresión del gen marcador GFP por citometría de flujo en **a)** células Jurkat y en **b)** células T CD4+ murinas. **c)** Diseño de los oligonucleótidos utilizados en la PCR. **d)** El resultado de la PCR revela que los virus son funcionales y que las secuencias IL23R1 e IL23R4 se expresan correctamente tanto en células Jurkat como en células T CD4+ purificadas de ratón infectadas con Ad5-CMV-IL23R1 y Ad5-CMV-IL23R4.

A los 3 días post-infección se cuantificó la expresión del GFP mediante citometría de flujo (**Figura 15.a**). Posteriormente, se realizó la extracción de mRNA y la retrotranscripción hacia cDNA y se analizó por PCR la expresión de IL23R1 e IL23R4 mediada por los virus Ad5-CMV-IL23R1 y Ad5-CMV-IL23R4 (**Figura 15.d**). Los oligonucleótidos diseñados (**Figura 15.c**) reconocen secuencias comunes entre IL23R1 e IL23R4, de manera que pueden ser utilizados para amplificar ambos genes.

La expresión de IL23R1 e IL23R4 en células T CD4⁺ murinas también fue comprobada. Para ello, se infectaron linfocitos CD4⁺ purificados de ratón con Ad5-CMV-GFP, Ad5-CMV-IL23R1 o Ad5-CMV-IL23R4 (10.000 pp/cell). Al igual que las muestras anteriores, 3 días más tarde se comprobó la expresión de GFP (**Figura 15.b**), se procedió a la extracción del mRNA y la retrotranscripción hacia cDNA, y finalmente, se llevó a cabo la PCR con los mismos oligonucleótidos (**Figura 15.d**).

1.2.3. Virus adenoasociados

Además de la generación de los vectores adenovirales portadores de las secuencias IL23R1 e IL23R4, se decidió clonar también estos genes en vectores adenoasociados.

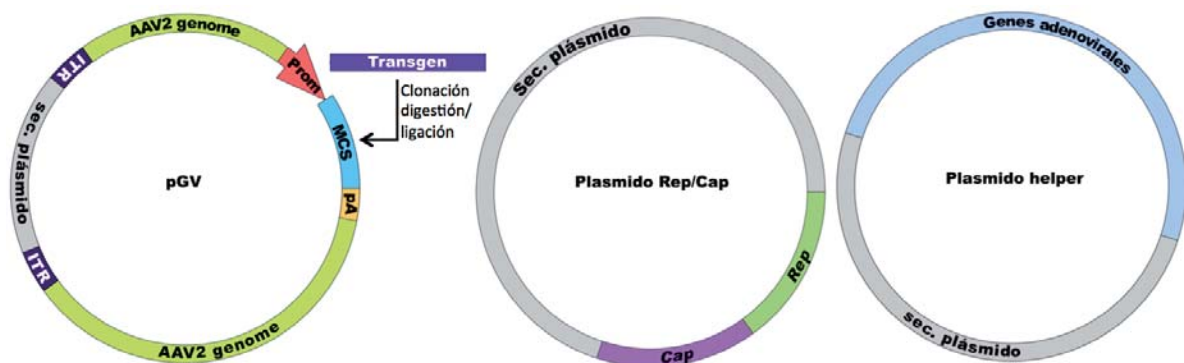


FIGURA 16. Esquema de los plásmidos necesarios para la producción de AAV mediante el sistema de triple transfección en células HEK293. El plásmido pGV es portador del genoma del AAV2 y un cassette de expresión con un MCS en el que se clona el transgen mediante digestión/ligación con enzimas de restricción. El plásmido *Rep/Cap* es portador de los genes responsables de la replicación y encapsidación, y es diferente para cada serotipo, cambiando este plásmido puede escogerse el pseudotipo de AAV que se formará. El plásmido *helper* contiene las secuencias adenovirales necesarias para la producción del AAV. MCS: multicloning site. pA: secuencia de poliadenilación. ITR: secuencias *inverted terminal repeat*.

Se transfectaron células permisivas HEK293 mediante el sistema de triple transfección (**Figura 16**) con el plásmido portador del transgen en el genoma AAV, el plásmido portador de los genes adenovirales necesarios para la amplificación del AAV, y el plásmido portador de las secuencias *Cap* y *Rep* del AAV9. Los virus fueron purificados por ultracentrifugación en gradiente de iodixanol, se titularon mediante la técnica de *picogreen*, y se almacenaron a -80°C hasta el momento de su uso *in vivo* (**Figura 17**).

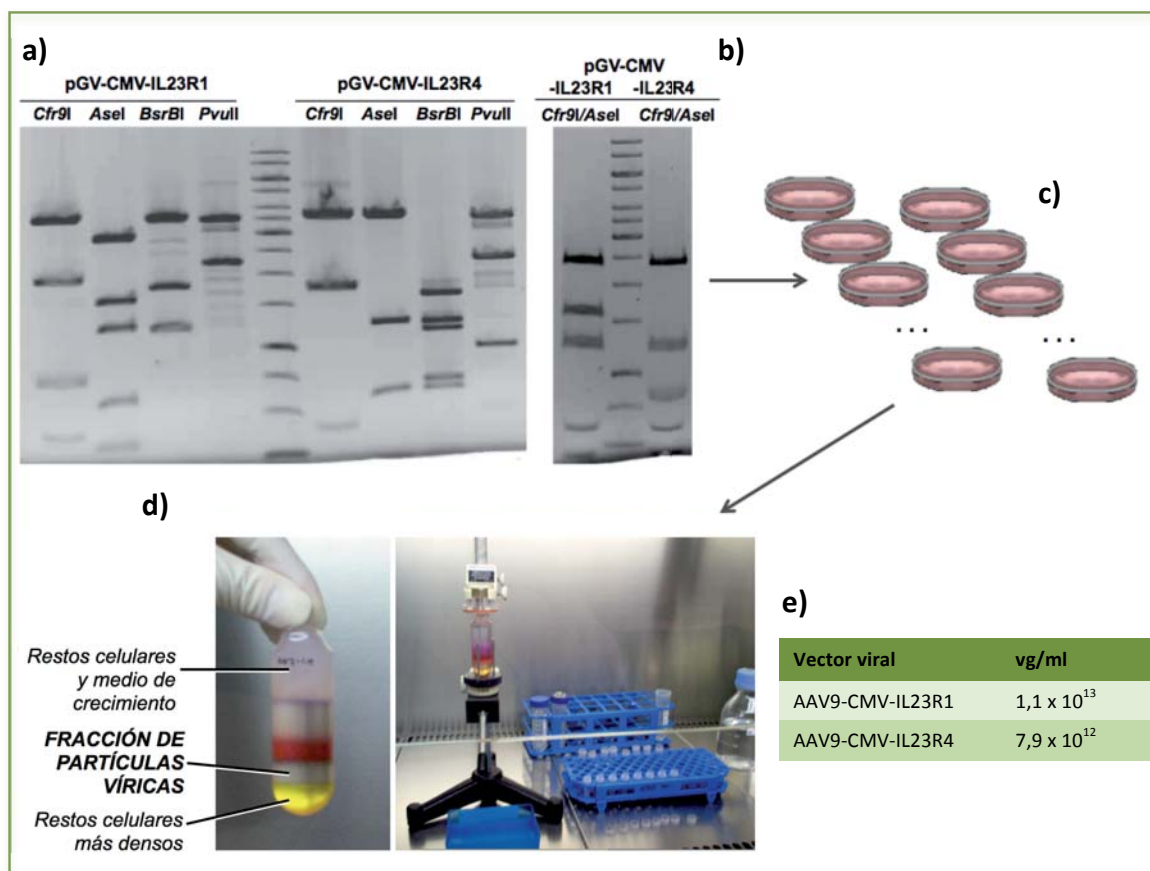


FIGURA 17. Producción de los virus adenoasociados (AAV) portadores de los genes IL23R1 e IL23R4. a) Comprobación mediante enzimas de restricción de los plásmidos portadores del genoma AAV con el gen clonado. **b)** Comprobación de la ausencia de recombinación por las secuencias ITR, mediante doble digestión con los encimas *Cfr9I* y *AseI*. **c)** Transfección de los plásmidos en células HEK293. **d)** Purificación del virus mediante gradiente de densidad de iodixanol, utilizando un colector de fracciones. **e)** Titulaciones de los AAV9 portadores de los genes IL23R4 (soluble) e IL23R1 (transmembrana) humano.

1.3. Estudio de tropismo celular en intestino

El epitelio intestinal tiene un tiempo de renovación celular de tan solo unos días, por tanto las células epiteliales infectadas con un vector viral podrán expresar el transgen un corto período de tiempo. Sin embargo, si la infección se produce en las *stem cells* situadas en las criptas de Lieberkühn, la expresión del transgen no solo perdurará más debido a la longevidad de estas células, sino que incluso podría producirse también en las células hijas. Sin embargo, las *stem cells* son células bastante refractarias a la infección con virus. Así pues, decidimos realizar un estudio de tropismo celular en intestino con una batería de vectores virales administrados por vía intrarrectal con el fin de establecer si alguno de ellos era capaz de infectar eficientemente *stem cell* intestinales.

Para ello, se realizó un diseño experimental basado en el uso animales ROSA26-lacZ y vectores portadores de la secuencia Cre. Los ratones transgénicos ROSA26-lacZ tienen implementado en su genoma un mecanismo de delección molecular basado en el sistema Cre-loxP. El reconocimiento de dos secuencias homologas llamadas loxP por parte de la recombinasa Cre desencadena su actividad enzimática, consistente en el corte del DNA por las regiones loxP y posterior reasociación de los extremos cortados, dando finalmente lugar a la escisión de la región comprendida entre las dos secuencias loxP. En estos ratones, la delección de la región comprendida entre estas dos secuencias da lugar a la expresión del gen β -Gal, silenciado hasta el momento. Por consiguiente, la expresión de la recombinasa Cre en aquellas células infectadas con los vectores virales originará la expresión de β -Gal (**Figura 18**).

Una condición importante del diseño experimental reside en el análisis del epitelio intestinal transcurridas 2-3 semanas tras la infección intrarrectal, tiempo suficiente para la expresión del transgen en vectores adenoasociados y para la renovación celular completa del epitelio intestinal. De este modo, las células epiteliales transducidas, que expresan β -Gal, se habrán perdido. Sin embargo, si la infección se dio en *stem cells*, la expresión de β -Gal, no solo continuará en éstas, sino que se dará también en aquellas células epiteliales descendientes.

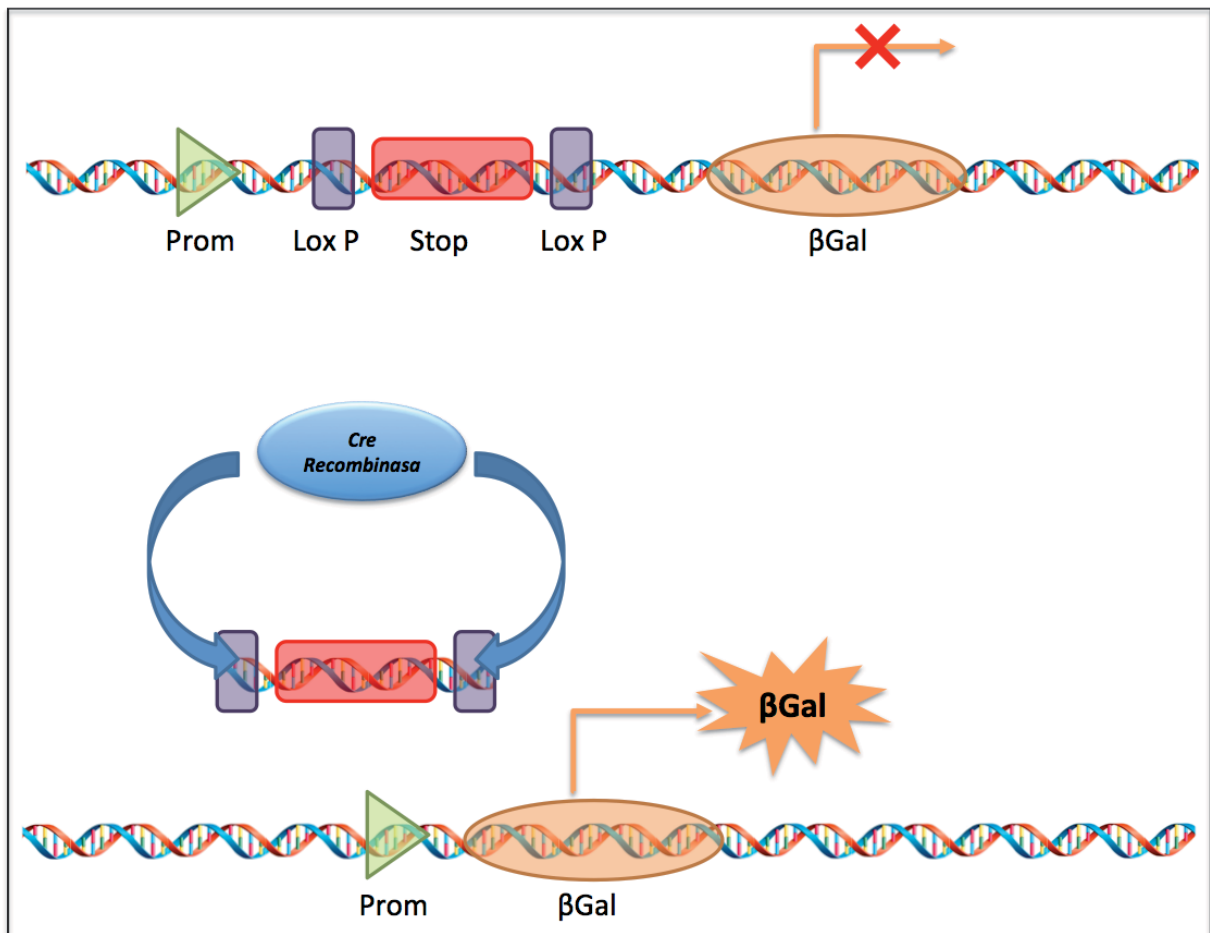


FIGURA 18. Sistema de delección molecular basado en el reconocimiento Cre-loxP existente en los ratones ROSA26-lacZ. Tras la acción enzimática de la recombinasa Cre, el gen β -Gal, silenciado anteriormente por una región *stop*, puede expresarse.

En nuestro grupo no disponíamos del modelo murino ROSA26-lacZ, motivo por el cuál nos pusimos en contacto con el grupo del Dr. Paco Real del Programa de Patología Molecular del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO). Establecimos una colaboración en la cuál nosotros diseñamos y generamos los vectores virales y ellos los administraron en los ratones y obtuvieron las muestras de colon (n=4 ratones/vector viral). El análisis posterior del experimento se dio conjuntamente. Los vectores virales representados en la **Tabla 5** fueron generados y probados en el estudio de tropismo.

Vector viral	Título	
AAV1-CMV-Cre	6,9 x 10 ¹² vg/ml	
AAV2-CMV-Cre	1,2 x 10 ¹² vg/ml	
AAV4-CMV-Cre	1,7 x 10 ¹¹ vg/ml	
AAV6-CMV-Cre	6,5 x 10 ¹¹ vg/ml	
AAV7-CMV-Cre	3,4 x 10 ¹² vg/ml	
AAV8-CMV-Cre	2,9 x 10 ¹² vg/ml	
AAV9-CMV-Cre	9,4 x 10 ¹² vg/ml	
AAV10-CMV-Cre	5,4 x 10 ¹² vg/ml	
Ad5-CMV-Cre	8,9 x 10 ¹¹ pp/ml	7,5 x 10 ¹⁰ IU/ml
CAV-CMV-Cre	1,1 x 10 ¹² pp/ml	2,2 x 10 ¹¹ IU/ml

TABLA 5. Listado de los vectores virales generados para el experimento de tropismo celular intestinal y títulos de las producciones.

Desafortunadamente, ninguno de los vectores probados intrarectalmente infectó de forma eficiente *stem cells* de las criptas de Lieberkühn. El experimento fue realizado en dos ocasiones. Cuando se observó tinción β -Gal, la señal fue muy parecida a la observada en muestras de ratones administrados con PBS, seguramente debido a la actividad β -Gal contaminante de bacterias. Así pues, si bien no podemos descartar que algunos de los vectores probados infecten *stem cells* intestinales, de darse, la eficiencia sería baja.

1.4. Modelo animal para Enfermedad de Crohn

El modelo murino de colitis aguda inducido por administración de DSS (*Dextran sodium sulfate*), es un modelo químico ampliamente utilizado en la bibliografía para estudiar la enfermedad inflamatoria intestinal (Okayasu et al., 1990). El DSS administrado oralmente daña la barrera epitelial del colon, dejando expuestos los tejidos subyacentes e induciendo la respuesta inmune mediada por células *T helper*.

Ratones C57BL/6J recibieron DSS disuelto en el agua durante 5 días. A los 8 días los animales fueron sacrificados y se extrajeron muestras de colon. A continuación, se realizó un análisis del perfil de citoquinas presentes en el colon, para determinar si la vía del Th17 se encontraba exacerbada.

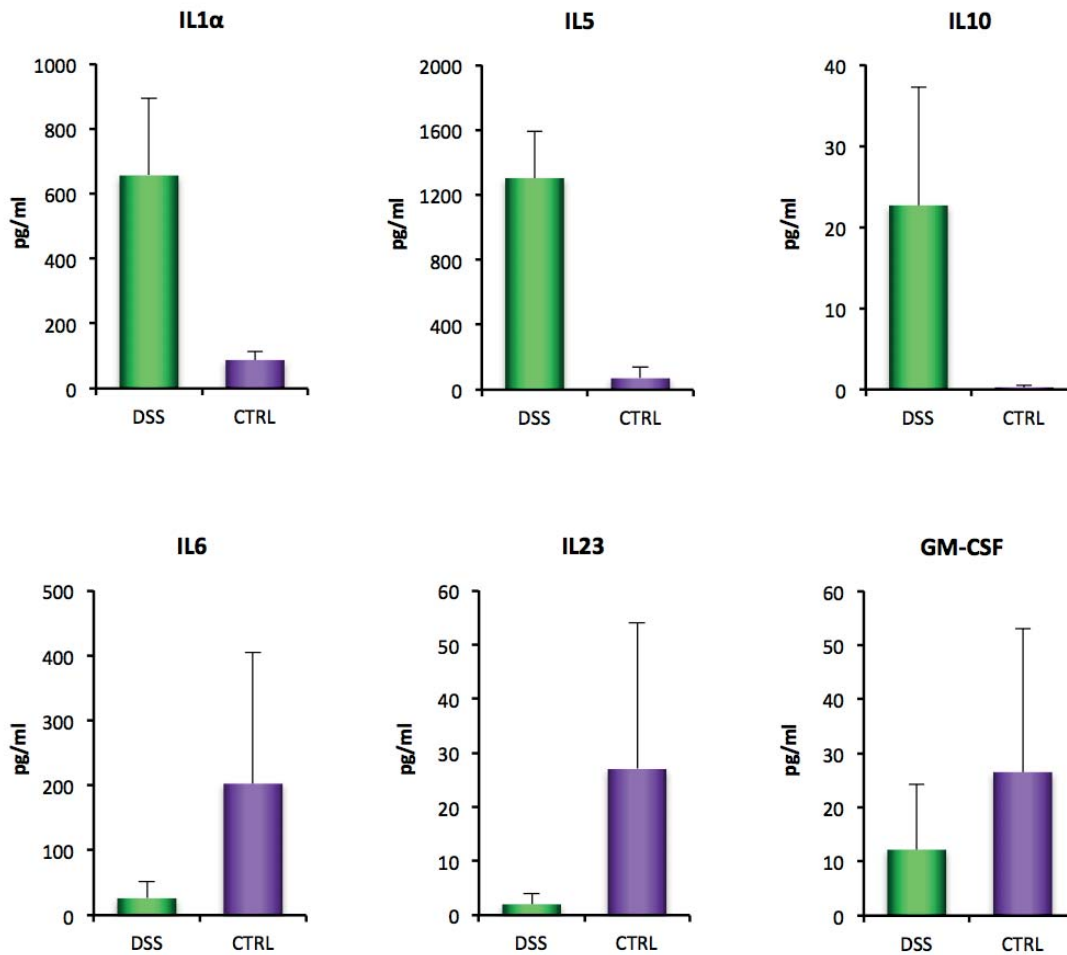


FIGURA 19. Análisis de citoquinas activadas en un modelo murino de colitis mediado por ingesta de DSS.

Ratones con colitis inducida por ingesta de 3%DSS en agua durante una semana fueron sacrificados a los 8 días. Se extrajeron muestras de colon y se analizó la concentración de IL-1 α , IL-5, IL-10, IL-6, IL-23 y GM-CSF con el kit FlowCytomix Pro. En los gráficos se representa la media y el error estándar (n=3-6). Todos los valores de significancia estadística eran $p < 0,05$ (Test Student).

Los resultados expuestos en la **Figura 19** mostraron que los ratones DSS tenían unos niveles de IL-1 α , IL-5 e IL-10 más elevados (655.8 ± 259 , 1303.5 ± 314 y 22.7 ± 15.9 , respectivamente) que los ratones control sanos (87.5 ± 36 , 70 ± 98 y 0.5 ± 0.2). Mientras que los animales sanos tenían unos niveles de IL-6, IL-23 y GM-CSF superiores (202.5 ± 286.4 , 27 ± 38.1 y 26.5 ± 37 , respectivamente) a los animales DSS (26 ± 28.4 , 2 ± 2.1 y 12.2 ± 13.3). Estos resultados nos indican que el modelo de colitis mediado por DSS no presenta un perfil de citoquinas propio de Th17. Debido a ello, a pesar de ser un buen modelo de inflamación y destrucción del epitelio del colon y de haber desarrollado vectores de tropismo intestinal, este modelo fue descartado ya que nuestro principal objetivo era observar una inmunomodulación de la respuesta Th17.

2. DESARROLLO DE ESTRATEGIAS DE TERÁPIA GÉNICA PARA ESCLEROSIS MÚLTIPLE

Los resultados expuestos anteriormente nos llevaron a descartar el modelo animal de colitis inducido por DSS y buscar un modelo animal de enfermedad autoinmune donde la respuesta Th17 estuviera afectada. Así pues, optamos por el modelo murino de Esclerosis Múltiple llamado Encefalomielitis Experimental Autoinmune (EAE), en concreto el modelo crónico no remitente. Éste es uno de los modelos animales de enfermedad más antiguos y se encuentra ampliamente caracterizado, y según la bibliografía, este modelo, además de reproducir los síntomas clínicos típicos de la EM, tiene alterada la respuesta inmune de la vía Th17.

A mitad de la tesis doctoral realicé una estancia de 3 meses el grupo de la Dra. Gitta Stockinger, de la División de Inmunología Molecular del *MRC National Institute for Medical Research* de Londres, un centro de reconocido prestigio en la investigación de la vía del Th17.

El objetivo de la estancia era estudiar la interacción entre IL23 e IL23R4 *in vitro*. Para ello, nos propusimos analizar si la expresión de IL23R4 permitía bloquear la interacción de IL23 con su receptor natural IL23R, lo que se determinaría por marcaje intracelular de STAT3 fosforilado (STAT3 se fosforila tras la unión de IL23 o IL6 con su receptor). Para ello, se utilizaron células Jurkat, una línea estable derivada de linfocitos humanos. Sin embargo, el marcaje intracelular es una técnica compleja de difícil optimización y a pesar de numerosos experimentos no fuimos capaces de obtener resultados aprovechables pues incluso el control positivo (incubación con IL6) no se diferenció nunca del background.

Se decidió entonces cambiar de tipo celular y se utilizaron linfocitos T CD4+ frescos purificados de sangre humana. Sin embargo, al igual que con las células Jurkat, tampoco fue posible poner a punto la técnica.

Como último recurso se decidió repetir este experimento utilizando linfocitos T CD4+ murinos frescos pues a pesar de todo, los vectores iban a ser administrados a la vuelta en Barcelona, en el modelo murino de EAE.

En el transcurso de la colaboración con la Dra. Stockinger se llegó a la conclusión de que, si bien los vectores virales portadores de los genes IL23R1 e IL23R4 humanos eran útiles en la realización de pruebas de concepto *in vitro* con células humanas y en un futuro uso clínico; para poder ver un mayor efecto en un modelo murino de enfermedad, era preferible generar vectores portadores de estos mismos genes pero en su versión murina. En la siguiente sección se detalla como se construyeron.

Al igual que con los IL23R humanos en células CD4+ humanas, el marcaje intracelular de STAT3 fosforilado utilizando IL23R murino en células CD4+ murinas tampoco funcionó. Llegados a este punto, se decidió parar esta línea de demostración y se procedió a estudiar la interacción de IL23R y IL23 mediante otras estrategias de experimentación *in vitro*, y con experimentación *in vivo*.

2.1. Diseño del IL23R soluble murino y clonación en los genomas virales

Así como el IL23R soluble humano se encuentra de forma natural gracias a *splicing* alternativo (IL23R4), el IL23R soluble de ratón (en adelante, **IL23Rs**) no había sido descrito en ningún artículo, por lo que se decidió diseñarlo mimetizando el IL23R4 (Zhang et al., 2006) (**Figura 20**).

En primer lugar, la secuencia génica y proteica de IL23R murino (en adelante, **IL23R**) fue extraída del NCBI GenBank (NM_144548.1). Por analogía con el IL23R4, en el diseño de IL23Rs se escogió la secuencia comprendida entre el codón de inicio ATG del exón 2 y el inicio del exón 9 (justo antes de la secuencia correspondiente a la región transmembrana) (**Figura 20**). Además, ya que en el IL23R4 la secuencia incluía finalmente un conjunto de aminoácidos pertenecientes al codón 12, se añadió al diseño de IL23Rs la misma secuencia de aminoácidos (LKEGSYC), por si ésta era importante en su estabilidad o función (**Figura 21**).

Por otra parte se añadió una diana *NheI* al inicio y otra *NotI* al final para su fácil clonación en el genoma de los vectores virales. Finalmente, la secuencia fue enviada a Eurofins MWG Operon, donde se utilizaron algoritmos para una optimización de codones para que la producción proteica fuera más eficiente. La secuencia de DNA final puede verse en la **Figura 22**. También se pidió la secuencia del IL23R para que sirviera de control en nuestros experimentos.

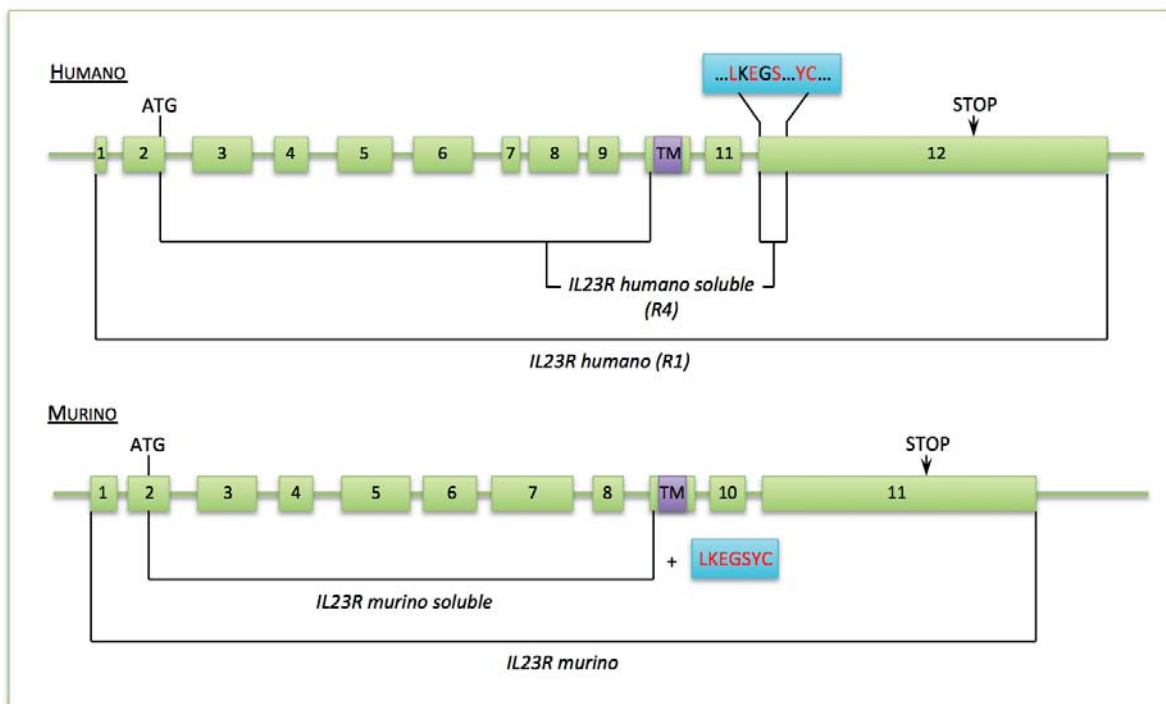


FIGURA 20. Comparación de la estructura genómica IL23R4 (humano) y IL23Rs (murino) y esquema del diseño de IL23Rs basado en IL23R4. El gen de IL23Rs ha sido diseñado por analogía a IL23R4.



FIGURA 21. Esquema de la secuencia de aminoácidos de IL23R murino y IL23Rs diseñado. Los aminoácidos en azul fueron añadidos por analogía al IL23R4 humano.

IL23Rs murino clonado

```

1  gctagcatgtcacaccttacactccagcttcacgtggtgattgcctgta
51  tgtgcttttcagatggtgtcatggtgggataaccagcatcaattgctctg
101 gagacatgtgggttgaacctggggagatctttcagatgggtatgaacgtg
151 agcatttactgccaggaagcgttgaacattgcagaccaaggaatctgta
201 cttctacaagaacggcttcaaagaggagtttgacataactcgcacatcaaca
251 ggactacagccagaatttggtagaagggttttctgagccacatgcctat
301 atgactgactgctgaatgtcctgggtcattttcaggagacactgatttg
351 tggcaaagacataatcttctggacatcctccagatgcaccgagcaatctga
401 catgtgtgatctacgagtactccgggaacatgacttgcacttggaaacaca
451 gggaaaccacctatatcgacacgaaatacatcgtccacgtgaagtcact
501 ggaaactgaggaagaacagcagtatctcgcagcagttacgtcaaaatct
551 ccaccgatagtctgcaaggcagtcgtaagtatctggtgtgggtccaagcc
601 gttaatagcctgggaatggagaacagccagcaactccacgtacacctgga
651 tgacatcgtgattcccagcgcacatccatcatttcaagggtgagacaacia
701 acgatacgggtcccaaagaccattgtctactggaagtctaagaccatgatc
751 gagaagggtgttctgtgaaatgcggtacaaaacgaccaccaaccagacctg
801 gtcagtcaggaattcagtgccaattttacctacgttcagcagtcaggagt
851 tctatctcgaaccggactccaagtatgtgttccaggtacgatgtcaggaa
901 acaggcaagcgaattggcaaccctggagctctcccttcggttcaccaaac
951 ctcacaggagactgggaaacggaattggcagccatggagcagtccttttg
1001 tgcaccaacaagccagactgtatctcaggtgacagctaagtcagtcac
1051 gagcctcagaaaatggagatgctgagtgtaccatctttcggggacatcc
1101 tgcacccggattgaaggagggtcctattgtgagtcgacgggccgc

```

FIGURA 22. Secuencia del gen IL23Rs. En verde: diana para *NheI*. En naranja: diana para *NotI*. Subrayado en azul: codón de inicio (Met). Subrayado en amarillo: codón de stop.

2.2. Generación y producción de los vectores virales

Una vez recibidos los plásmidos de Eurofins MGW Operon con el gen IL23Rs e IL23R, estos genes fueron clonados en el plásmido p6600 mediante digestión con enzimas de restricción y ligación. Posteriormente fueron clonados en el genoma de Ad5 mediante recombinación de secuencias homólogas (ver **Figura 13**). Además, también fueron clonados en el plásmido pGV (ver **Figura 16**) para producir vectores AAV portadores de estos genes.

Finalmente, los constructos virales se secuenciaron para asegurar la identidad de la secuencia de los genes clonados. Para ello se utilizaron los oligonucleótidos de A a D representados en la **Figura 23**. Estos oligonucleótidos, permitieron la secuenciación completa del cassette de expresión formado por el promotor (CMV), el transgen IL23Rs ó IL23R y la secuencia de poli-adenilación. El resultado demostró que los genes habían sido correctamente clonados en los genomas virales y que no se había producido ninguna mutación puntual.

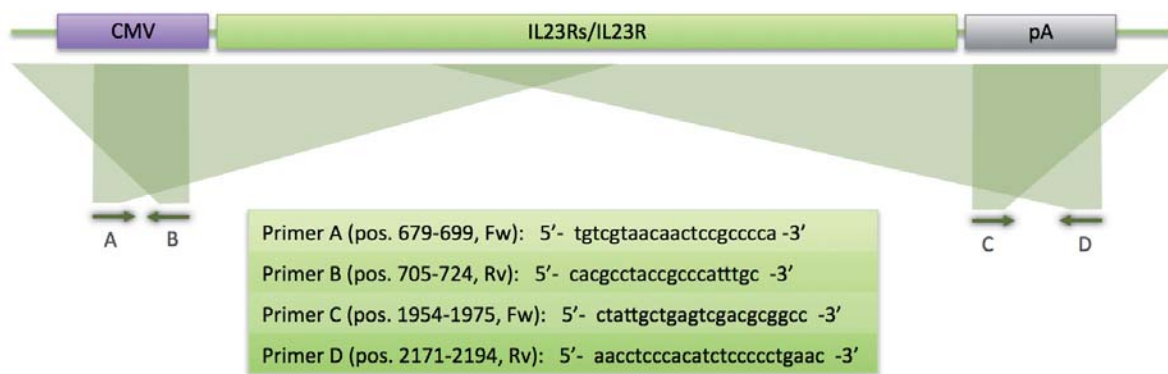


FIGURA 23. Esquema representativo de los oligonucleótidos utilizados para la secuenciación de IL23Rs e IL23R clonados en el genoma de adenovirus y de AAV. El sombreado indica la región secuenciada por cada oligonucleótido, de forma que entre los cuatro abarcan todo el cassette de replicación. CMV: promotor del citomegalovirus. pA: secuencia de poliadenilación.

Por último, se generaron los siguientes vectores virales:

Adenovirus	IU/ml	pp/ml
Ad5-CMV-IL23Rs murino	2,51 x 10 ¹¹	3,87 x 10 ¹²
Ad5-CMV-IL23R murino	1,32 x 10 ¹¹	2,42 x 10 ¹²
Adenoasociado	vg/ml	
AAV9-CMV-IL23Rs murino	2,97 x 10 ¹²	
AAV9-CMV-IL23R murino	1,78 x 10 ¹²	

TABLA 6. Listado de los vectores virales generados y títulos.

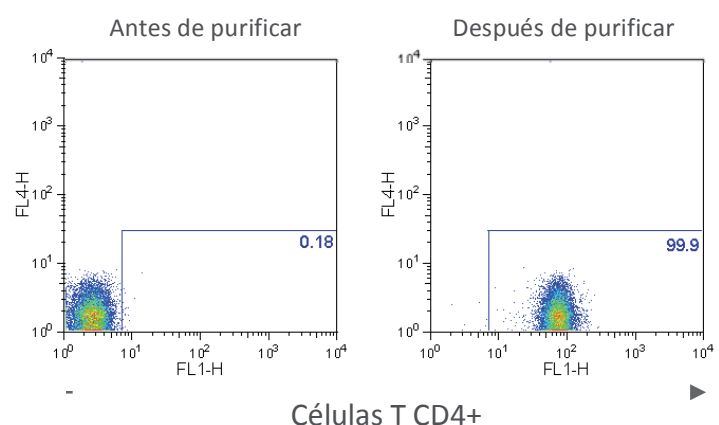
2.3. Estudio del tropismo en células T CD4+ purificadas de diferentes pseudotipos de AAV y serotipos de Ad

En un proyecto de colaboración en que nuestro laboratorio participaba se observó que los vectores Ad5/40S infectaban monocitos muy eficientemente. Debido a que la EM es una enfermedad autoinmune, decidimos realizar un estudio de tropismo de los diferentes vectores virales de los que disponíamos en células del sistema inmune. Aprovechando la estancia en el laboratorio de la Dra. Gitta Stockinger, donde la técnica de purificación de linfocitos T CD4+ se utilizaba de forma habitual, se decidió utilizar estas células para el estudio.

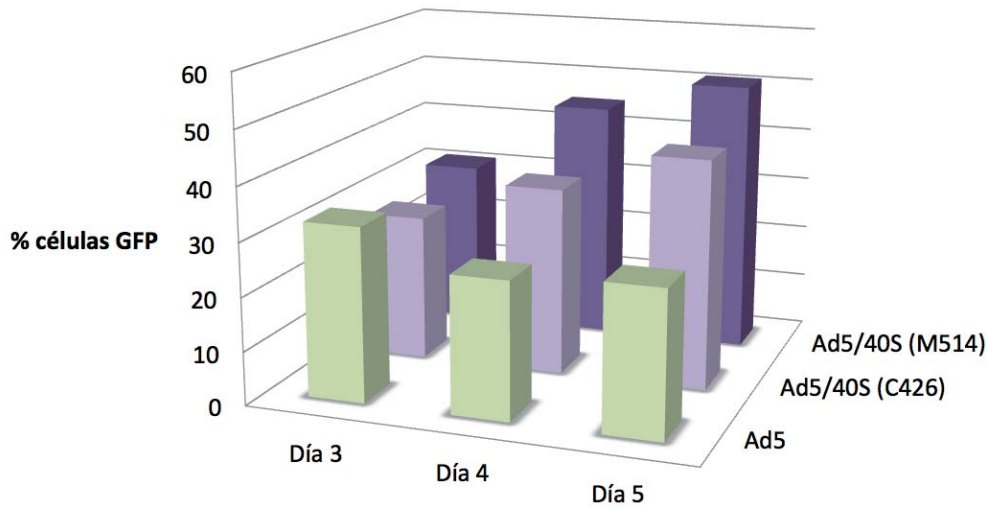
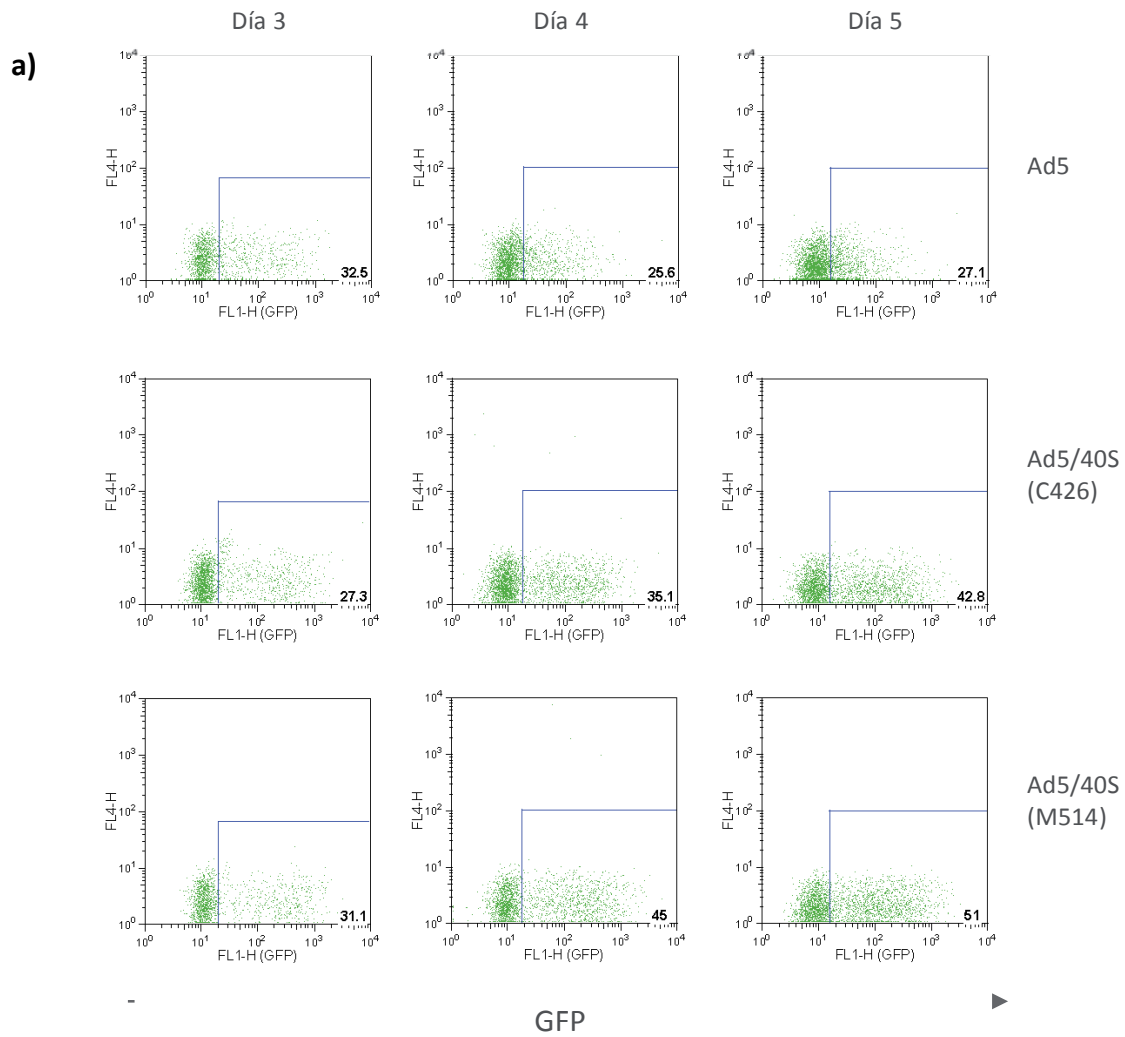
Para ello, se extrajeron nódulos linfáticos y bazo de ratones C57bl/6J wt, y se purificaron los linfocitos T CD4+. Posteriormente, los cultivos primarios de linfocitos T CD4+ se infectaron con:

- Ad5-CMV-GFP (5000 vg/cell).
- Ad5/40S-CMV-GFP (5000 vg/cell).
- AAV1-CMV-GFP (50000 vg/cell).
- AAV5-CMV-GFP (50000 vg/cell).
- AAV8-CMV-GFP (50000 vg/cell).
- AAV9-CMV-GFP (50000 vg/cell).

FIGURA 24. Comprobación de la purificación de células T CD4+



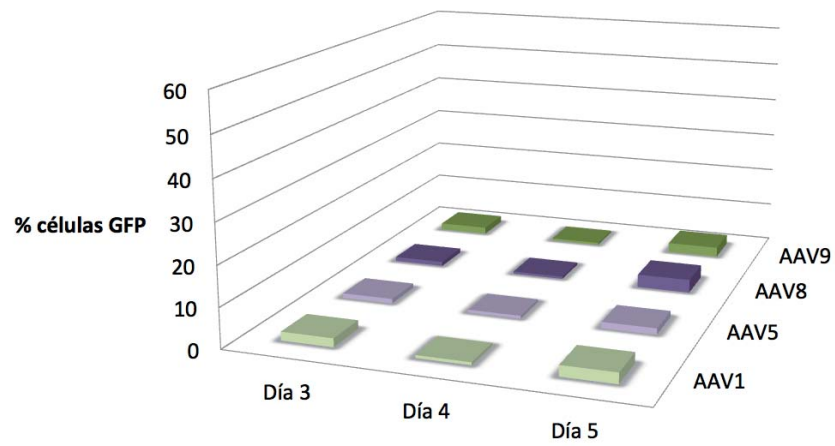
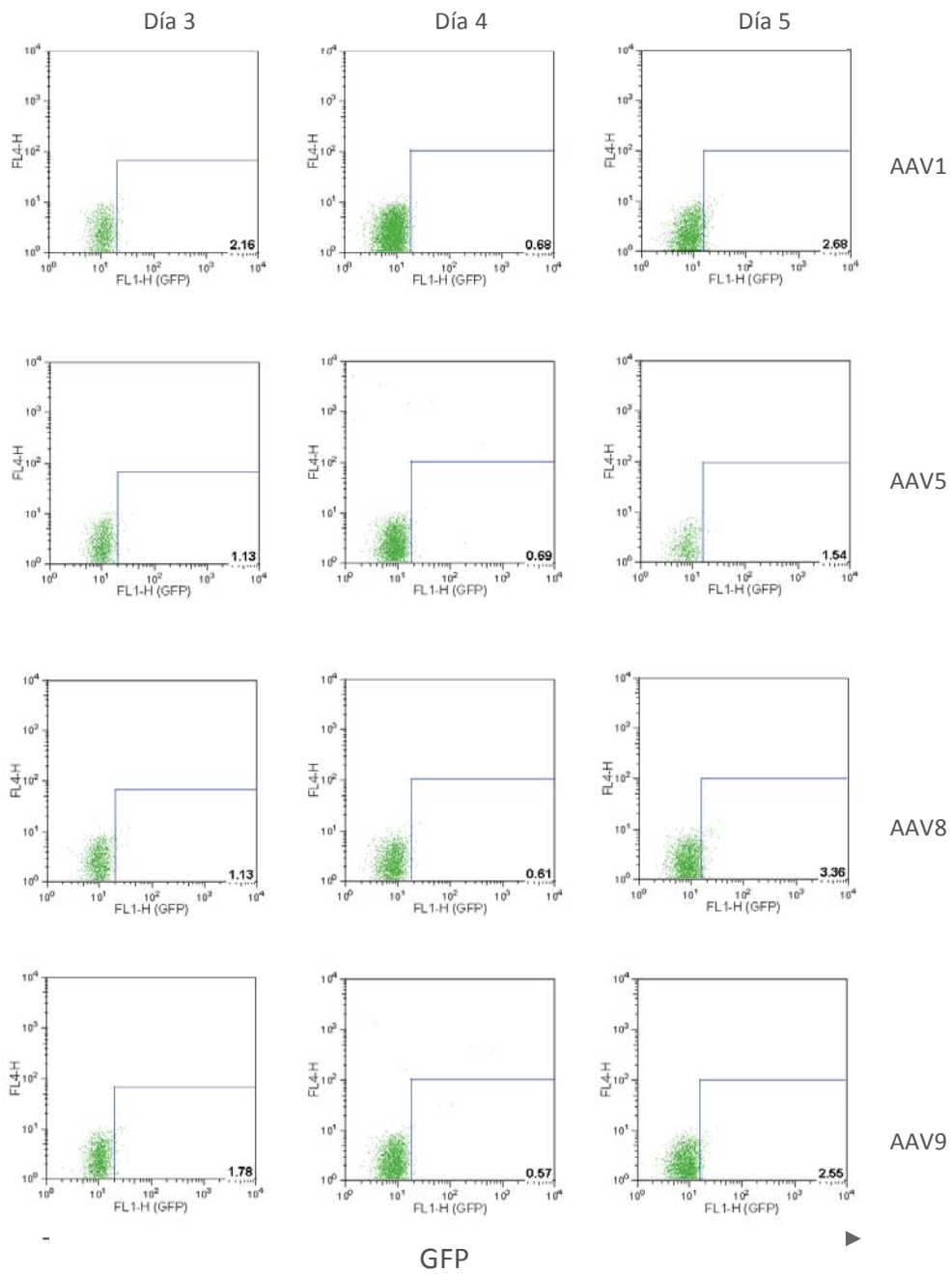
A los 3, 4 y 5 días post-infección se cuantificó el porcentaje de células que expresaban GFP (células infectadas) mediante citometría de flujo.



	Día 3	Día 4	Día 5
Ad5	32,5	25,6	27,1
Ad5/40S (C426)	27,3	35,1	42,8
Ad5/40S (M514)	31,1	45	51

FIGURA 25. Estudio del tropismo de vectores en linfocitos T CD4+ purificados de ratón. a) Infección con Ad5 y dos lotes diferentes de Ad5/40S. **b)** Infección con AAV1, AAV5, AAV8 y AAV9 portadores del gen marcador GFP. Cuantificación mediante citometría de flujo del porcentaje de células que expresan GFP a día 3, 4 y 5 post-infección.

b)



	Día 3	Día 4	Día 5
AAV1	2,16	0,68	2,68
AAV5	1,13	0,69	1,54
AAV8	1,13	0,61	3,36
AAV9	1,78	0,57	2,55

Como se puede ver en la **Figura 25.a**, tanto el Ad5 como el Ad5/40S presentaron unos porcentajes de infección elevados. En el caso del Ad5, acorde a su cinética característica, el nivel de infección más alto se observa a día 3, disminuyendo ligeramente los días posteriores. En cambio, el Ad5/40S presentó en ambos casos su mayor porcentaje de infección a los 5 días, coincidiendo con el estudio de ciclo celular llevado a cabo en células HEK293 en esta tesis. Así pues, el porcentaje de infección del Ad5/40S fue mayor que el del Ad5, con unos porcentajes máximos de 42-51% a día 5, frente al 31% del Ad5 a día 3.

Por otra parte, los virus adenoasociados AAV1, AAV5, AAV8 y AVV9, no infectaron las células CD4+T purificadas de ratón. Ninguno de ellos presentó un porcentaje por encima del background en ninguno de los 3 días analizados (**Figura 25.b**).

Los resultados descritos demuestran que tal como pasaba con monocitos, los vectores Ad5/40S infectan más eficientemente células T CD4+, siendo los vectores más apropiados para infectar células del sistema inmune. No obstante, la creación posterior de una patente sobre el Ad5/40S restringió el uso de estos vectores para una empresa farmacéutica. Por este motivo, nos centramos en el diseño de estrategias basadas en la infección de otras células que sirvieran como productoras y secretoras del factor soluble IL23Rs.

2.4. Interacción *in vitro* entre IL23 e IL23Rs

Los vectores virales portadores del constructo IL23Rs se diseñaron con el objetivo de que el receptor soluble fuera secretado por las células infectadas, y posteriormente, que éste se uniera a la IL23, inhibiendo su capacidad de activar el IL23R presente en las células del sistema inmune.

2.4.1. Detección de IL23Rs secretado al medio extracelular

En primer lugar, se infectaron células HEK293, Jurkat y HeLa con vectores Ad5-IL23Rs y Ad5-IL23R y posteriormente se analizó por Western-Blot la presencia de IL23Rs en el

medio extracelular. Desafortunadamente, la gran cantidad de proteínas presentes en el medio de crecimiento de los cultivos celulares (contiene suero fetal bovino), sumado a la poca especificidad del anticuerpo anti-IL23R utilizado, enmascararon los resultados de la electroforesis con la aparición de una gran cantidad de bandas inespecíficas. Debido a ello, se pasaron los medios por filtros *Amicon* de Millipore, pero los resultados no mejoraron. Se decidió entonces incluir un *FLAG-tag* al inicio de la secuencia génica de IL23Rs e IL23R por clonación (**Figura 26**). FLAG-tag es un polipéptido que se expresa unido a la proteína de estudio, su secuencia proteica es corta (**Figura 26**) y no interfiere en la funcionalidad de la proteína de estudio. De los diferentes Flag que existen, utilizamos el sistema 3xFlag de Sigma por su mayor eficiencia. Tras la clonación, se generaron nuevos vectores virales (Ad5 y AAV9) portadores de Flag-IL23R y Flag-IL23Rs (**Tabla 7**).

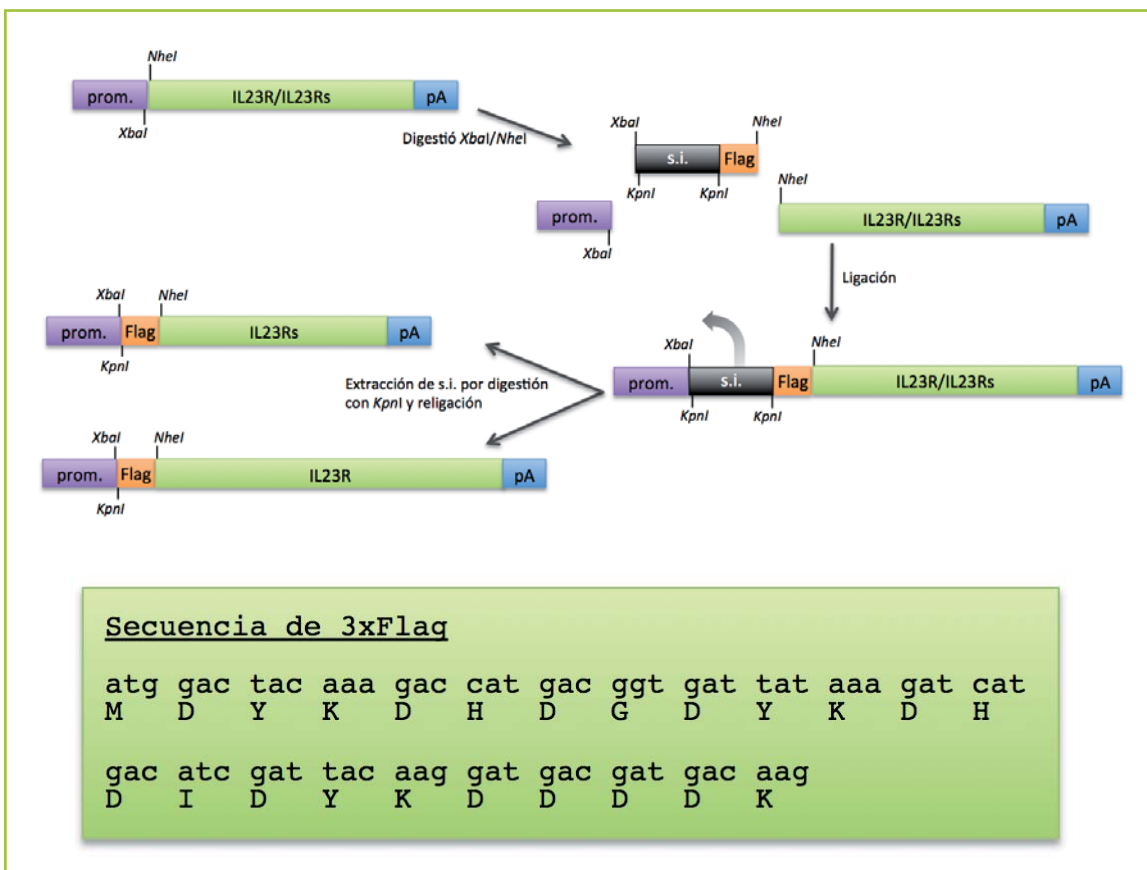


FIGURA 26. Estrategia de clonación de la secuencia Flag en los genes murinos IL23R e IL23Rs. Detalle de la secuencia génica y proteica de 3xFlag.

Adenovirus	IU/ml	pp/ml
Ad5-CMV-Flag-IL23R	$6,24 \times 10^{10}$	$9,36 \times 10^{11}$
Ad5-CMV-IFlag-L23Rs	$2,01 \times 10^{11}$	$4,78 \times 10^{12}$
Adenoasociados	vg/ml	
AAV9-CMV-Flag-IL23R	$1,19 \times 10^{12}$	
AAV9-CMV-Flag-IL23Rs	$1,32 \times 10^{13}$	

Tabla 7. Vectores virales generados y títulos.

Se decidió detectar por Western-Blot la presencia de Flag-IL23Rs en las muestras concentradas de medio extracelular de células infectadas utilizando el anticuerpo anti-Flag, pero los resultados fueron similares a los anteriores. Por este motivo, se optó por realizar una precipitación con el *Anti-Flag M2 Affinity Gel* de Sigma.

Se cultivaron células Jurkat y se infectaron con Ad5-Flag-IL23R o Ad5-Flag-IL23Rs. Como control se utilizaron células infectadas con Ad5-GFP. Pasados dos días, los sobrenadantes fueron concentrados e inmunoprecipitados. En esta ocasión, el análisis por Western-Blot utilizando un anticuerpo anti-octaprobe (reconoce la secuencia DYKDDDDK de Flag), reveló una banda positiva y del tamaño esperado en la muestra de medio extracelular procedente de células infectadas con Ad5-Flag-IL23Rs. Esta banda estaba ausente en el control (Ad5-GFP) y el medio procedente de las células infectadas con Ad5-Flag-IL23R transmembrana (**Figura 27**).

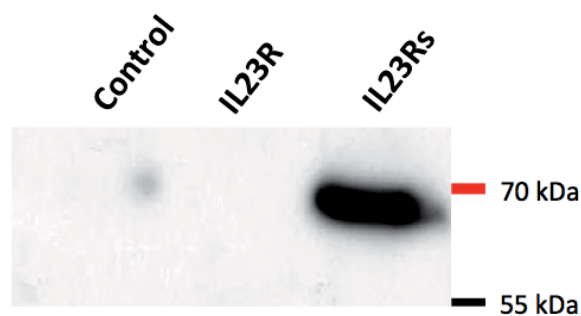


FIGURA 27. IL23Rs es producido y secretado al medio extracelular en células Jurkat infectadas con Ad5-Flag-IL23Rs. Western-blot con anticuerpo primario anti-octaprobe. Muestras: medio extracelular de células Jurkat infectadas con Ad5-GFP (Control), Ad5-Flag-IL23R (IL23R) o Ad5-Flag-IL23Rs (IL23Rs).

2.4.2. Análisis de la interacción IL23-IL23Rs *in vitro*

Los siguientes experimentos se realizaron con el fin de analizar la unión del IL23Rs con la IL23 murina recombinante *in vitro*. En primer lugar, se realizaron varias co-precipitaciones de Flag-IL23Rs purificado con IL23 utilizando el *Anti-Flag M2 Affinity Gel*, pero los resultados no fueron positivos. Tras muchos intentos se llegó a la conclusión de que las condiciones de ensayo de la precipitación con *Anti-Flag M2 Affinity Gel* o bien no permitían la unión de IL23 al receptor, o bien esta unión era débil e IL23 se perdía en los lavados. De esta manera, se optó por cambiar la estrategia de co-precipitación, utilizando para ello un GST-tag en lugar del Flag-tag. Así pues, se clonó el Flag-IL23Rs en un plásmido portador de la secuencia GST (*Glutathione S-transferase*).

El plásmido GST-Flag-IL23Rs fue transfectado en células HEK293. A las 48h se realizó una extracción proteica y se purificó el IL23Rs mediante precipitación con Glutathion Sefarosa 4B (Figura 28).

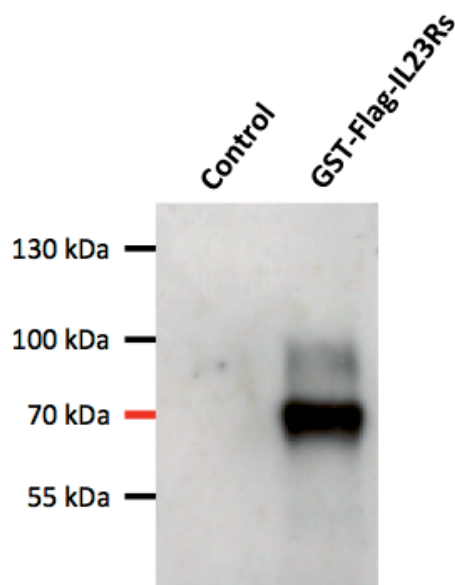


FIGURA 28. Comprobación de la purificación de IL23Rs mediante precipitación con Glutathion Sefarosa 4B.

Control: Precipitación del extracto proteico de células transfectadas con un plásmido irrelevante.

GST-Flag-IL23Rs: Precipitación del extracto proteico de células transfectadas con el plásmido pGST-Flag-IL23Rs.

Anticuerpo primario: anti-octaprobe.

Una vez purificado el IL23Rs, éste se incubó con IL23 y se realizó la co-precipitación con Glutathion Sefarosa 4B (esquema representativo en Figura 29). Los resultados obtenidos tras el análisis por Western-Blot no fueron positivos. Mientras que la banda correspondiente al IL23Rs era visible incluso con cantidades pequeñas de muestra, la banda correspondiente a la IL23 no se detectaba.

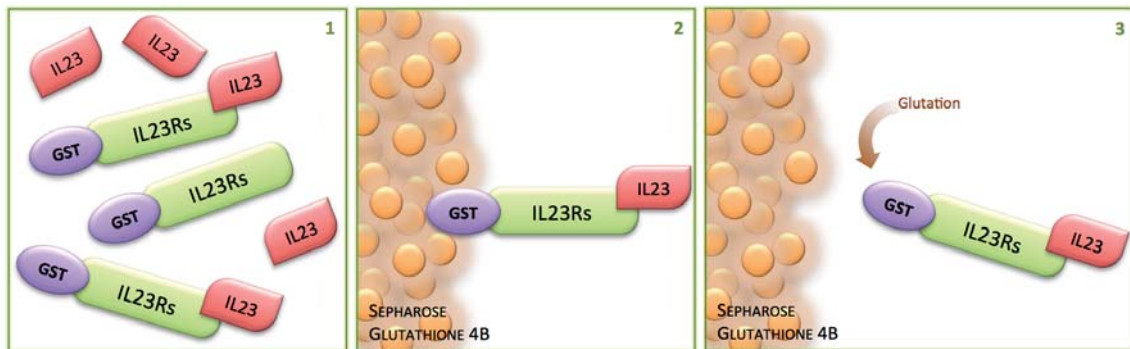


FIGURA 29. Esquema de los experimentos de unión IL23-IL23Rs llevados a cabo mediante co-precipitación con una resina de afinidad. **1)** Incubación del GST-IL23Rs con IL23. **2)** Unión de los complejos con la resina *Glutathione Sepharose 4B* y lavados para descartar la IL23 no unida a IL23Rs. **3)** Elución de los complejos unidos por exceso de glutatión.

Finalmente, los experimentos por co-precipitación fueron descartados pues requerían de varios lavados para eliminar la IL23 no unida a IL23Rs, y era posible que la IL23 sí unida también se perdiera, en caso de que la unión no fuera fuerte en estas condiciones de ensayo. Por lo tanto, se optó por analizar la interacción IL23-IL23Rs por medio de la observación de un cambio en la movilidad de IL23R por unión a IL23, mediante electroforesis en gel de acrilamida no desnaturizante.

Para la realización de esta técnica se incubó IL23Rs purificado mediante precipitación con Glutathione Sefarosa 4B con IL23 recombinante de ratón. Como control se utilizó IL23Rs purificado sin incubar con IL23. Posteriormente se corrieron en el gel no desnaturizante. Como puede observarse en la **Figura 30**, aparece una banda clara en el carril perteneciente a IL23+IL23Rs mientras que en el carril perteneciente a IL23Rs, no aparece. El tamaño de las bandas es muy difícil de predecir en este tipo de ensayos, ya que tratándose de proteínas no desnaturizadas, el peso molecular no es el único factor determinante, también lo son la configuración tridimensional, el punto isoeléctrico, la solubilidad de la muestra, etc. No obstante, la reproducción del experimento con las mismas condiciones proporcionó el mismo resultado.

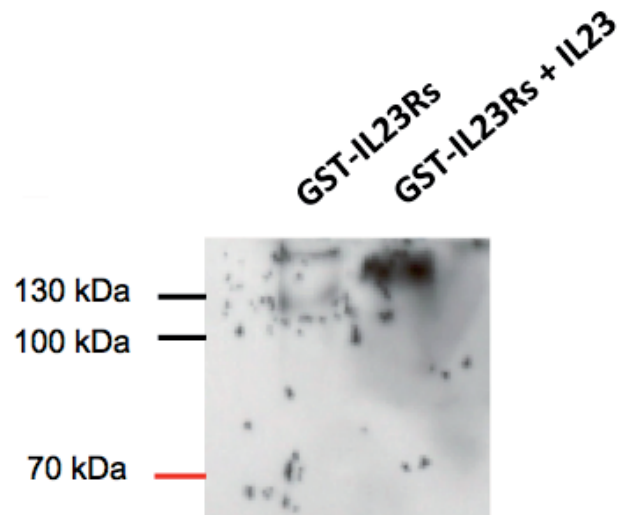


FIGURA 30. Electroforesis no desnaturalizante (*one-dimensional native electrophoresis*). GST-IL23Rs purificado por Glutathione Sepharosa 4B se incubó con y sin IL23. Se observa una banda en la muestra IL23Rs + IL23. Anticuerpo primario: anti- IL23R. Gel de acrilamida no desnaturalizante de pH 7.

2.5. Estudio de distribución celular de IL23R e IL23Rs

Con el fin de comprobar que la expresión proteica del IL23R murino se daba correctamente en células infectadas con los vectores portadores de IL23R e IL23Rs, se infectaron células HEK293 con los virus: Ad5-IL23R, Ad5-Flag-IL23R, Ad5-IL23Rs y Ad5-Flag-IL23Rs, utilizando una MOI de 2. A los 2 días post-infección las células fueron fijadas con paraformaldehído 4% y se detectó la expresión de los receptores mediante inmunofluorescencia con anticuerpos contra IL23R (anti-IL23R) y contra el péptido Flag (anti-Flag y anti-octaprobe).

Las fotografías obtenidas mediante microscopia confocal revelaron que las células infectadas con Ad5-IL23R expresaban eficientemente el receptor y que éste se encontraba ubicado en la membrana (**Figura 31**). Estos resultados fueron reproducidos utilizando los anticuerpos anti-Flag y anti-octaprobe (**Figura 32**). Por el contrario, como se esperaba, las células infectadas con Ad5-IL23Rs expresan el receptor de forma difusa y poco intensa en el citoplasma, no hallándose concentrado en la membrana (**Figura 33**).

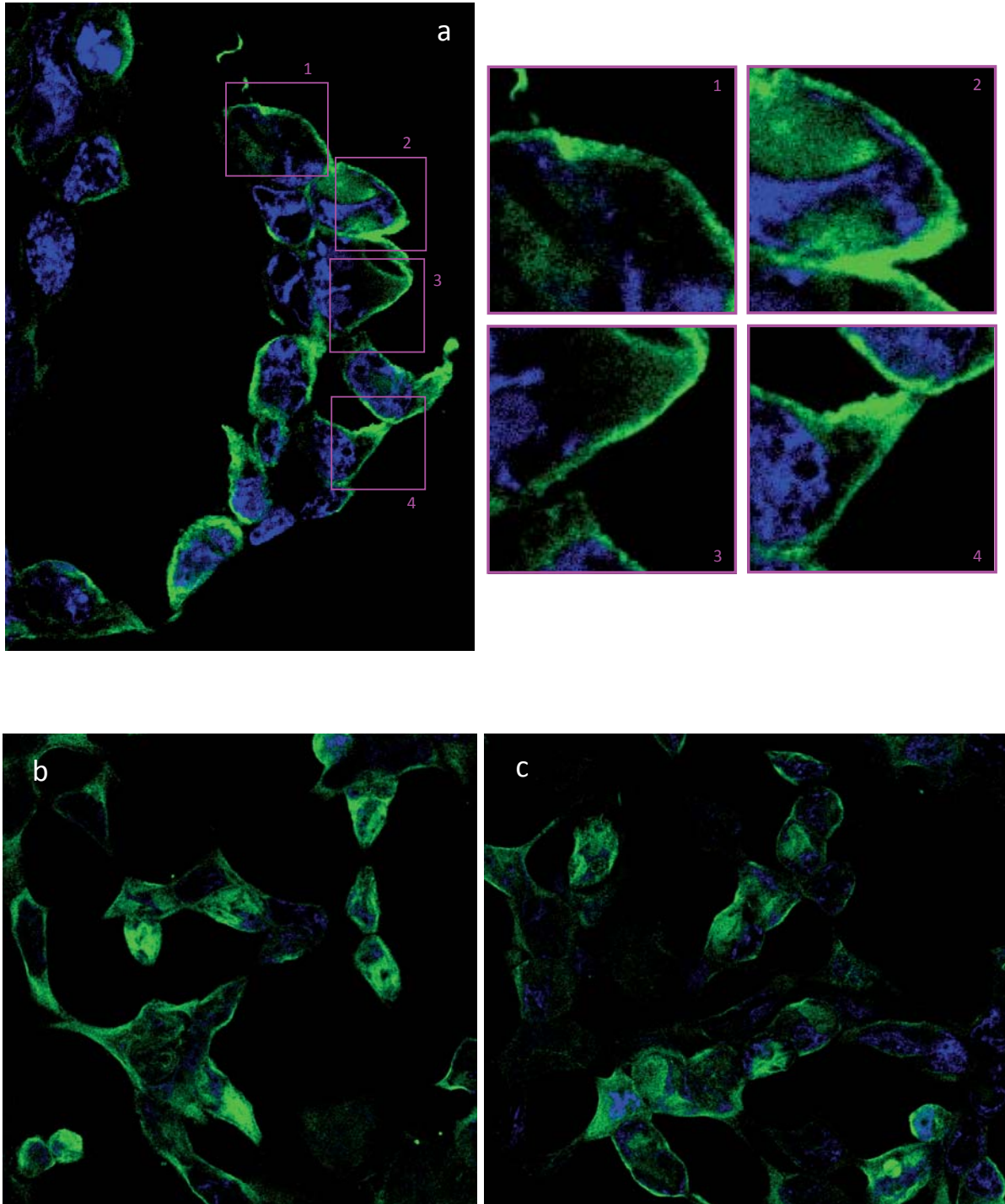


FIGURA 31. Estudio de la distribución del IL23R expresado en células infectadas por Ad5-IL23R. a–c) Inmunofluorescencia con anticuerpo anti-IL23R (verde) en células HEK293 infectadas con Ad5-IL23R. Los núcleos están teñidos con DAPI (azul). 1-4) Detalles ampliados de la foto a), donde puede observarse la señal de IL23R mayoritariamente en la membrana celular.

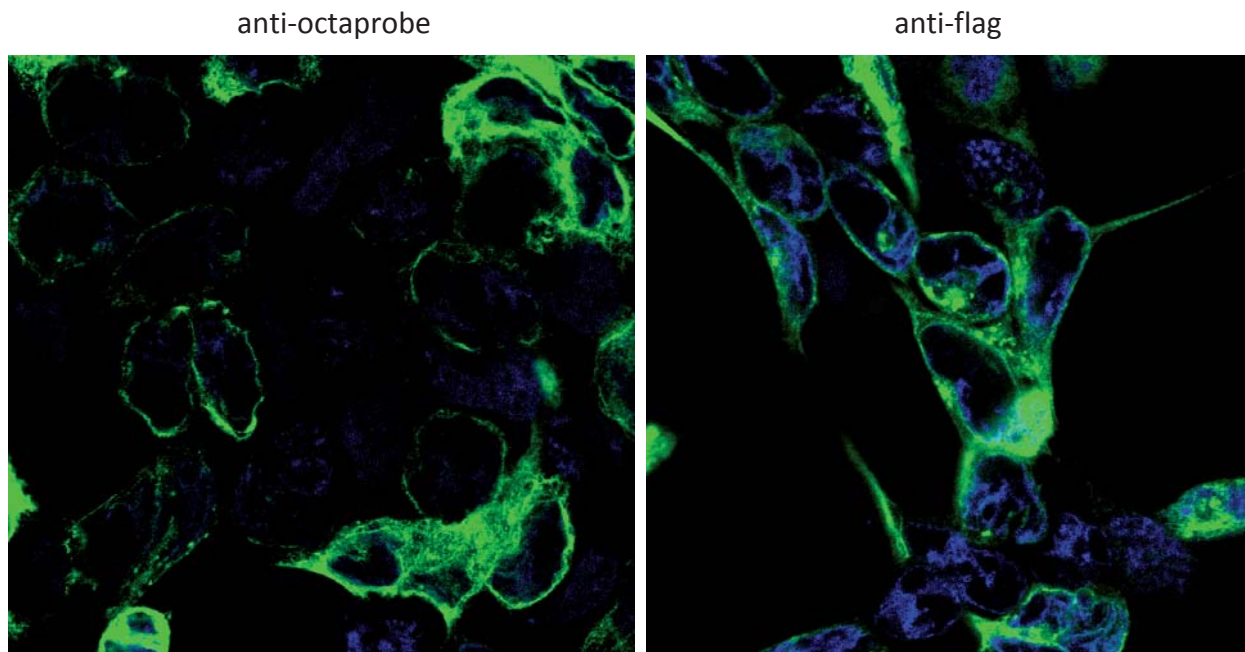


FIGURA 32. Estudio de la distribución del IL23R expresado en células infectadas por Ad5-IL23R. Inmunofluorescencia con anticuerpo anti-flag y anti-octaprobe (verde) en células HEK293 infectadas con Ad5-IL23R murino. Los núcleos están teñidos con DAPI (azul).

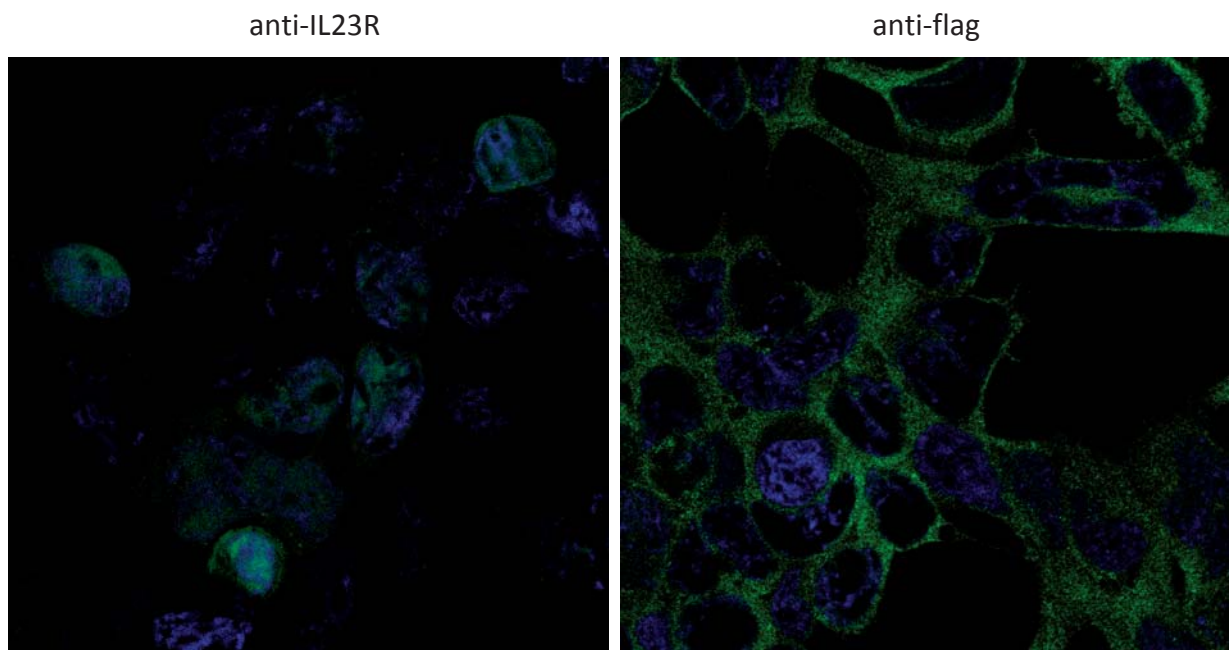


FIGURA 33. Estudio de la distribución del IL23Rs expresado en células infectadas por Ad5-IL23Rs. Inmunofluorescencia llevada a cabo con anticuerpo anti-IL23R y anti-flag (verde) en células HEK293 infectadas con Ad5-IL23Rs. Los núcleos están teñidos con DAPI (azul).

2.6. Análisis del potencial inmunomodulador del IL23Rs en un modelo animal para Esclerosis Múltiple (EAE)

2.6.1. Diseño experimental

Los estudios *in vivo* que se presentan en este apartado se han llevado a cabo en colaboración con la Dra. Carmen Espejo del Grupo de Neuroinmunología Clínica del Institut de Recerca de la Vall d'Hebron y del Centre d'Esclerosi Múltiple de Catalunya (Cemcat), que dirige el Dr. Xavier Montalbán.

Como modelo experimental se ha utilizado la Encefalomiелitis Autoinmune Experimental (EAE), concretamente un modelo crónico no remitente. Para ello, los ratones se inmunizaron con péptido 40-55 de la glicoproteína miélnica de los oligodendrocitos (MOG). Ello genera una respuesta inmune contra este antígeno en el SNC y provoca su destrucción específica, lo que conlleva la desmielinización del SNC y con ello un déficit neurológico que limita y dificulta la movilidad de los animales.

La valoración de la evolución clínica se realiza haciendo caminar al animal sobre una rejilla y calificándolo mediante una escala que permite valorar una parálisis ascendente que se inicia con paresia de la cola del animal y que puede alcanzar la tetraplejía del mismo (**Tabla 8**). Para evitar cualquier tipo de subjetividad involuntaria, todos los experimentos *in vivo* y estudios posteriores se realizaron en ciego.

CRITERIOS DE EVALUACIÓN EN LA ESCALA CLÍNICA	
Evaluación clínica	Descripción
0	No clínica
0,5	Paresia parcial de la cola
1	Paresia total de la cola
2	Paraparesia trasera
2,5	Paraparesia trasera severa
3	Tetraparesia leve
4	Tetraparesia moderada
4,5	Tetraparesia severa
5	Tetraplejía (criterio punto final)
6	Éxito

TABLA 8. Escala para la valoración clínica de la EAE.

El número mínimo de animales por grupo (la n de cada grupo) recomendado para el seguimiento de los síntomas clínicos con la adecuada significancia estadística es de 6 ratones. Además, fue necesario un incremento en la n por grupo que permitiera el sacrificio de 3-5 animales a día 14 post-inmunización, momento en que se establece la enfermedad, con el fin de realizar los estudios inmunológicos e histopatológicos y poder continuar el seguimiento clínico con una n estadísticamente valorable.

Todos los experimentos incluyeron un grupo control positivo para la EAE (control intrínseco del experimento que permite comprobar si la inmunización con MOG₄₀₋₅₅ es eficiente y por tanto si la incidencia de la enfermedad es al menos del 90%). También incluimos un grupo control negativo del tratamiento (vehículo) para cada vector administrado (un vector del mismo serotipo portador de un gen irrelevante [GFP] o ausencia de transgen [*null*]).

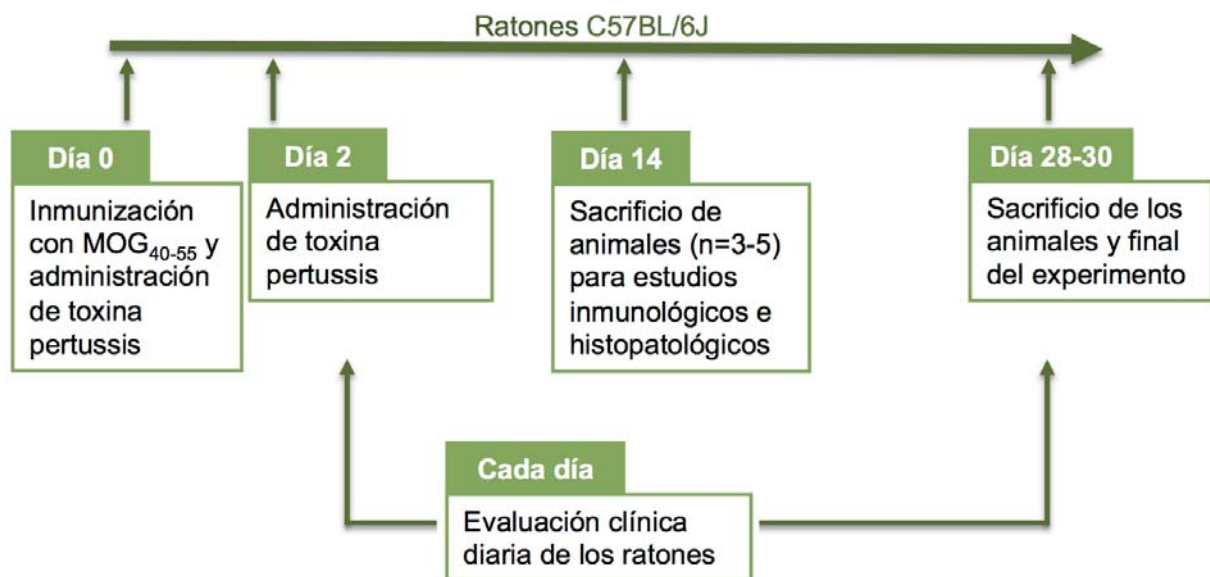


FIGURA 34. Esquema del diseño experimental general para los estudios *in vivo* con ratones con EAE.

Se utilizaron ratones hembra de la cepa C57BL/6J de entre 7 y 9 semanas de edad. Estos animales se inmunizan a día 0 del experimento con el péptido MOG₄₀₋₅₅ y se les administra toxina pertussis (**Figura 34**). A día 2 del experimento, a los animales se les vuelve a administrar otra dosis de toxina. Entre una y dos semanas más tarde

empiezan a aparecer los primeros síntomas de la enfermedad. Diariamente se realiza la evaluación clínica de los síntomas siguiendo la escala de valoración clínica (**Tabla 8**). A día 14, cuando la respuesta específica frente a MOG₄₀₋₅₅ está establecida, se sacrifican de 3 a 5 ratones por grupo para el análisis histopatológico e inmunológico. El resto de animales se sigue evaluando diariamente hasta que finaliza el experimento, a día 28-30 post inmunización.

2.6.2. Efecto de la administración de vectores virales en ratones con EAE

Con el fin de comprobar el potencial terapéutico del IL23Rs se utilizaron dos vectores virales diferentes, el Ad5 y el AAV9, mediante dos rutas distintas de administración: sistémica o intraventricular. Se escogieron Ad5 y AAV9 por su alta eficiencia en infectar hígado y sistema nervioso, respectivamente.

En el primer experimento (Experimento I), se administraron 5×10^{10} pp/ratón de Ad5-CMV-IL23Rs o Ad5-CMV-GFP (tratamiento control) por la vía intravenosa. Paralelamente, se administraron animales con 9×10^{10} vg/ratón de AAV9-CMV-IL23Rs por la vía intraventricular, utilizando un virus AAV9-CMV-GFP en el grupo control.

Los vectores se administraron a día 2 de experimento. Lamentablemente, los ratones morían a los pocos minutos post-administración, posiblemente debido a que la inmunización de los ratones para inducir la EAE causa una hiperreactividad del sistema inmune, que reacciona frente a las partículas víricas administradas causando la muerte del animal. Posteriormente, rebajamos la dosis 1/10 en el caso de los adenovirus, comprobando que ésta continuaba siendo letal (**Tabla 9**). De manera que se redujo de nuevo hasta 5×10^8 pp/ratón (1/100 de la dosis inicial), que fue finalmente tolerada por los ratones. En cuanto a los AAV, la dosis tuvo que ser reducida un 66% hasta 3×10^{10} vg/ratón. Sin embargo, a causa de las bajas dosis finalmente administradas no se pudo observar ningún efecto en la sintomatología clínica de la EAE (**Figura 35**). No obstante, este experimento nos indujo a reconsiderar el momento de la administración de los vectores virales. En experimentos posteriores, la administración se realizó como mínimo 3 días antes de la inmunización, tiempo suficiente para que las partículas virales sean expulsadas del organismo por medio de la orina.

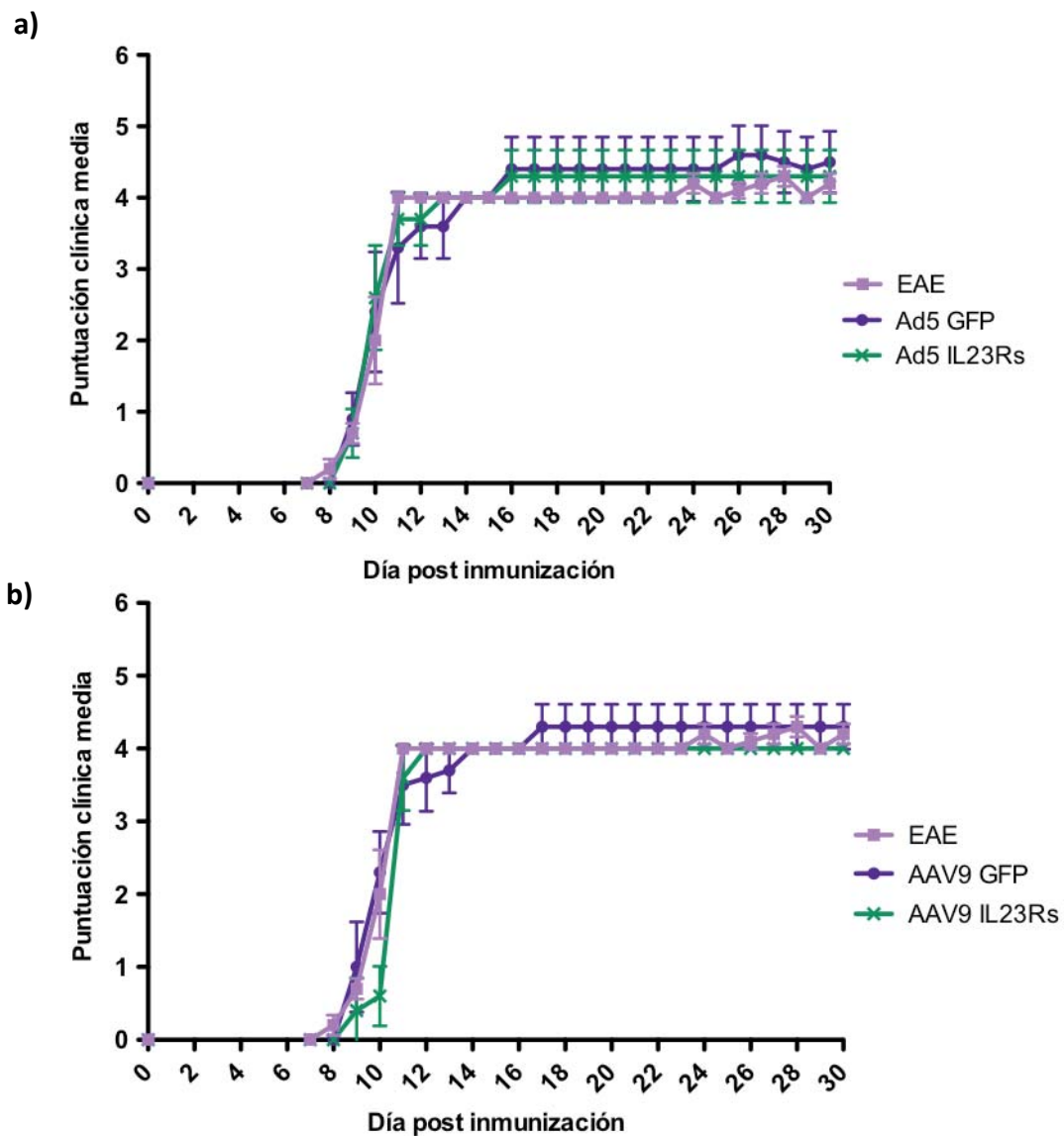


FIGURA 35. Efecto de la administración de vectores virales que codifican para IL23Rs en el curso clínico de la EAE. Las dosis tuvieron que ser rebajadas para evitar la muerte de los animales inmunizados. No existen diferencias en el seguimiento de la evolución clínica de la enfermedad entre los grupos tratados con Ad5 intravenoso (**35.a.**), o con AAV9 intraventricular (**35.b.**). En el gráfico se representa la puntuación clínica diaria media para cada grupo. Las barras representan el error estándar. **35.a)** EAE: animales inmunizados con MOG y no tratados (n=5). Ad5 GFP: animales inmunizados con MOG y tratados a día 2 con 5×10^8 pp/ratón de Ad5-GFP (n=5). Ad5 IL23Rs: animales inmunizados con MOG y tratados a día 2 con 5×10^8 pp/ratón de Ad5-IL23Rs (n=6). **35.b)** EAE: animales inmunizados con MOG y no tratados (n=5). AAV9 GFP: animales inmunizados con MOG y tratados a día 2 con 3×10^{10} vg/ratón de AAV9-GFP (n=7). AAV9 IL23Rs: animales inmunizados con MOG y tratados a día 2 con 3×10^{10} vg/ratón de AAV9-IL23Rs (n=7).

Por otra parte, también se estudió la resistencia de los ratones con EAE a la administración de una dosis alta de vectores virales a día 15 y a día 30 post-inmunización, observando que a día 15 la administración de vectores virales continuaba siendo letal, mientras que a día 30 los ratones sobrevivían a una dosis alta de vector (**Tabla 9**). Sin embargo, el posterior seguimiento clínico de estos ratones no reportó ninguna mejora en relación al grupo control, posiblemente por encontrarse la enfermedad en una fase muy avanzada, donde la respuesta inmune es menos relevante.

	día 2			día 15	día 30
	dosis alta	dosis media	dosis baja	dosis alta	dosis alta
vía intravenosa	0/4	0/6	10/10	0/2	8/8
vía intraventricular	0/5	0/5	12/12	ND	ND

TABLA 9. Supervivencia de los ratones tras la administración de vectores virales post-inmunización. La tabla muestra la supervivencia (animales vivos/animales administrados con vector viral) de los ratones con EAE tratados con diferentes dosis de vectores y a distintos tiempos, considerando día 0 el de la inmunización con MOG. La administración intraventricular se realizó únicamente a día 2, utilizando AAV9 (dosis alta: 9×10^{10} vg/ratón; dosis media: 6×10^{10} vg/ratón; dosis baja: 3×10^{10} vg/ratón). Para la administración intravenosa se utilizó Ad5 (dosis alta: 5×10^{10} pp/ratón; dosis media: 5×10^9 pp/ratón; dosis baja: 5×10^8 pp/ratón).
ND: no determinado.

2.6.3. El grupo administrado con vectores portadores de secuencias irrelevantes como grupo control del experimento

El grupo control EAE es un control intrínseco del experimento para determinar que la inmunización ha sido óptima y que al menos el 90% de los animales inmunizados desarrollan la enfermedad. Además, también sirve para determinar que el tratamiento control no tiene un efecto relevante sobre el curso clínico de ésta. El tratamiento control que hemos utilizado en estos experimentos es la administración con un vector portador de una secuencia no relevante. De esta manera, puede observarse si la mera presencia del virus, y no la expresión del gen terapéutico, provoca un efecto en el transcurso de la enfermedad.

Se comparó el seguimiento clínico de los grupos control de ratones administrados con vectores portadores de secuencias irrelevantes con el de los grupos de ratones que no recibieron tratamiento (EAE). No se observó ninguna diferencia estadísticamente significativa entre el grupo EAE y el Ad5-GFP, con una dosis de 5×10^{10} pp/ratón (**Figura 36**), siendo la puntuación clínica media acumulada de $71 \pm 16,8$ D.E. y $70 \pm 5,1$ D.E., respectivamente ($p=0,916$).

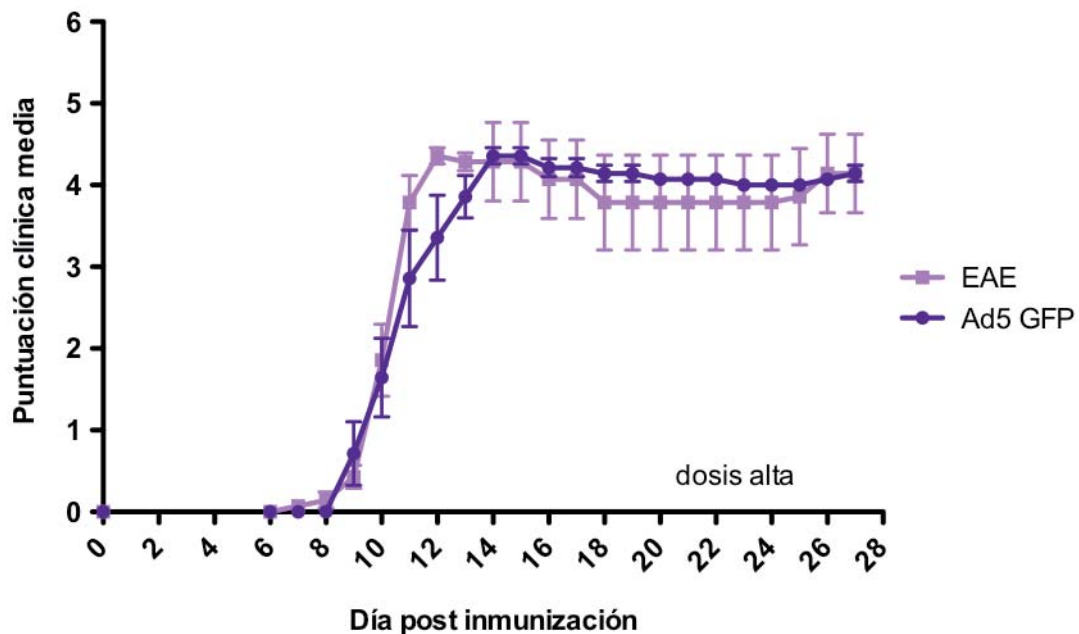


FIGURA 36. Comparativa entre el grupo control EAE y el grupo control Ad. No existen diferencias significativas en la evolución clínica de la enfermedad entre los dos grupos control. En el gráfico se representa la puntuación clínica diaria media para cada grupo. Las barras representan el error estándar. EAE: animales inmunizados con MOG y no tratados ($n=7$). Ad5 GFP: animales inmunizados con MOG y tratados a día -5 con 5×10^{10} pp/ratón de Ad5-GFP ($n=7$).

Por otra parte, la administración intravenosa de un vector AAV9 (9×10^{10} vg/ratón) portador del gen GFP ($82,2 \pm 19,4$ D.E.) tampoco reveló una diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo EAE ($70,9 \pm 16,8$ D.E.) con una $p=0,252$ (**Figura 37**).

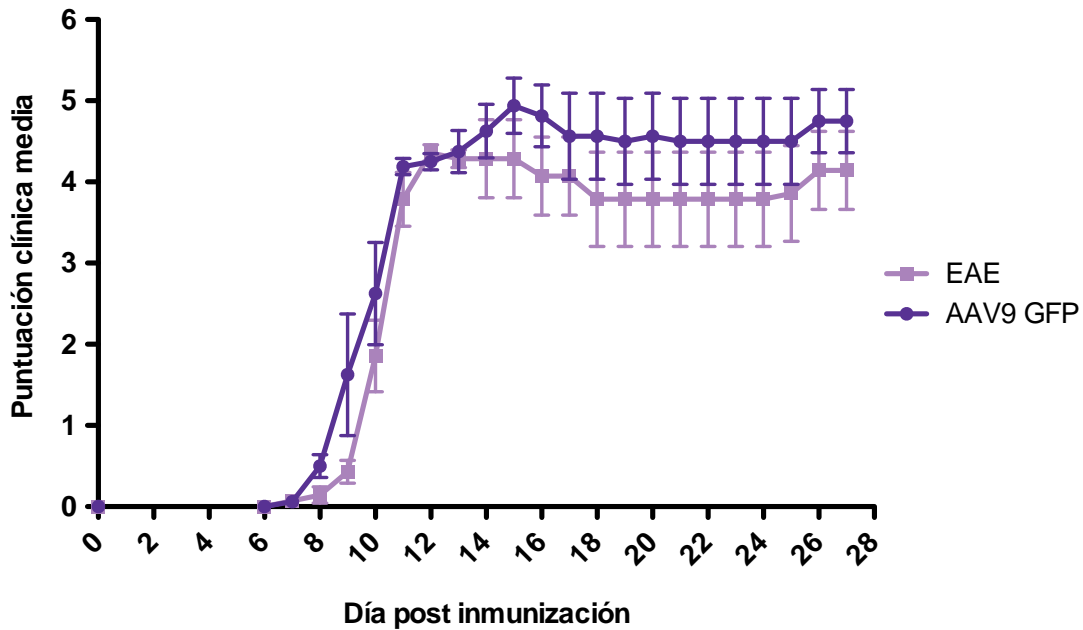


FIGURA 37. Comparativa entre el grupo control EAE y el grupo control AAV. No existen diferencias significativas en la evolución clínica de la enfermedad entre los dos grupos control. En el gráfico se representa la puntuación clínica diaria media para cada grupo. Las barras representan el error estándar. EAE: animales inmunizados con MOG y no tratados (n=7). AAV9 GFP: animales inmunizados con MOG y tratados a día -5 con 9×10^{10} vg/ratón de AAV9-GFP (n=8).

Así pues, como se puede observar en las **Figuras 36 y 37**, nuestro grupo control se comporta igual que el grupo control EAE, por lo que en adelante los resultados se expondrán comparando los vectores terapéuticos con los vectores no-relevantes, y prescindiendo en los gráficos del grupo EAE, aunque este grupo se siguió incluyendo como control positivo del modelo experimental.

2.6.4. Estudio comparativo entre vectores Ad5-CMV-IL23Rs y AAV9-CMV-IL23Rs en ratones con EAE

En el Experimento II un grupo de ratones fueron administrados con 5×10^{10} pp/ratón i.v. del vector Ad5-CMV-IL23Rs (grupo Ad5-IL23Rs), mientras que a otro grupo se le inyectó 9×10^{10} vg/ratón i.v. de AAV9-CMV-IL23Rs (grupo AAV9-IL23Rs). A diferencia del Experimento I, esta vez la administración con los dos vectores se realizó 5 días antes de la inmunización (día -5 del experimento) para evitar la muerte de los ratones por hiperreactividad del sistema inmune. Cada vector contó con su grupo control (grupos Ad5-GFP y AAV9-GFP, respectivamente).

Como puede observarse en la **Figura 38.a**, existe una diferencia estadísticamente significativa entre Ad5-IL23Rs y Ad5-GFP (valoración clínica media acumulada: $48 \pm 23,3$ D.E. y $70 \pm 5,1$ D.E., respectivamente) con una $p=0,004$. En concreto, se observa que los animales tratados con IL23Rs desarrollan más tarde los primeros síntomas de la enfermedad que los ratones Ad5-GFP (día de inicio de la enfermedad: $13,38 \pm 4,93$ D.E. y $9,57 \pm 0,53$ D.E., respectivamente. Con una $p=0,002$). Sin embargo, se observa que el efecto protector decae hacia el final del experimento, llegando Ad5-IL23Rs a tener una puntuación clínica media igual al grupo Ad5-GFP el último día del mismo.

En cuanto a los vectores AAV (**Figura 38.b**), si bien la puntuación clínica media acumulada en ambos grupos no contempla una diferencia estadísticamente significativa (Ad5-GFP: $82,2 \pm 19,4$ D.E. y Ad5-IL23Rs: $66,7 \pm 11,6$ D.E. $p=0,072$), se observa una tendencia clara y sostenida hasta el final del experimento.

A partir de estos resultados asumimos que la expresión del gen IL23Rs tiene un efecto positivo sobre la evolución de la enfermedad. Y por ello nos centramos en optimizar el diseño experimental y en estudiar la manera más apropiada de demostrar de forma significativamente estadística este efecto.

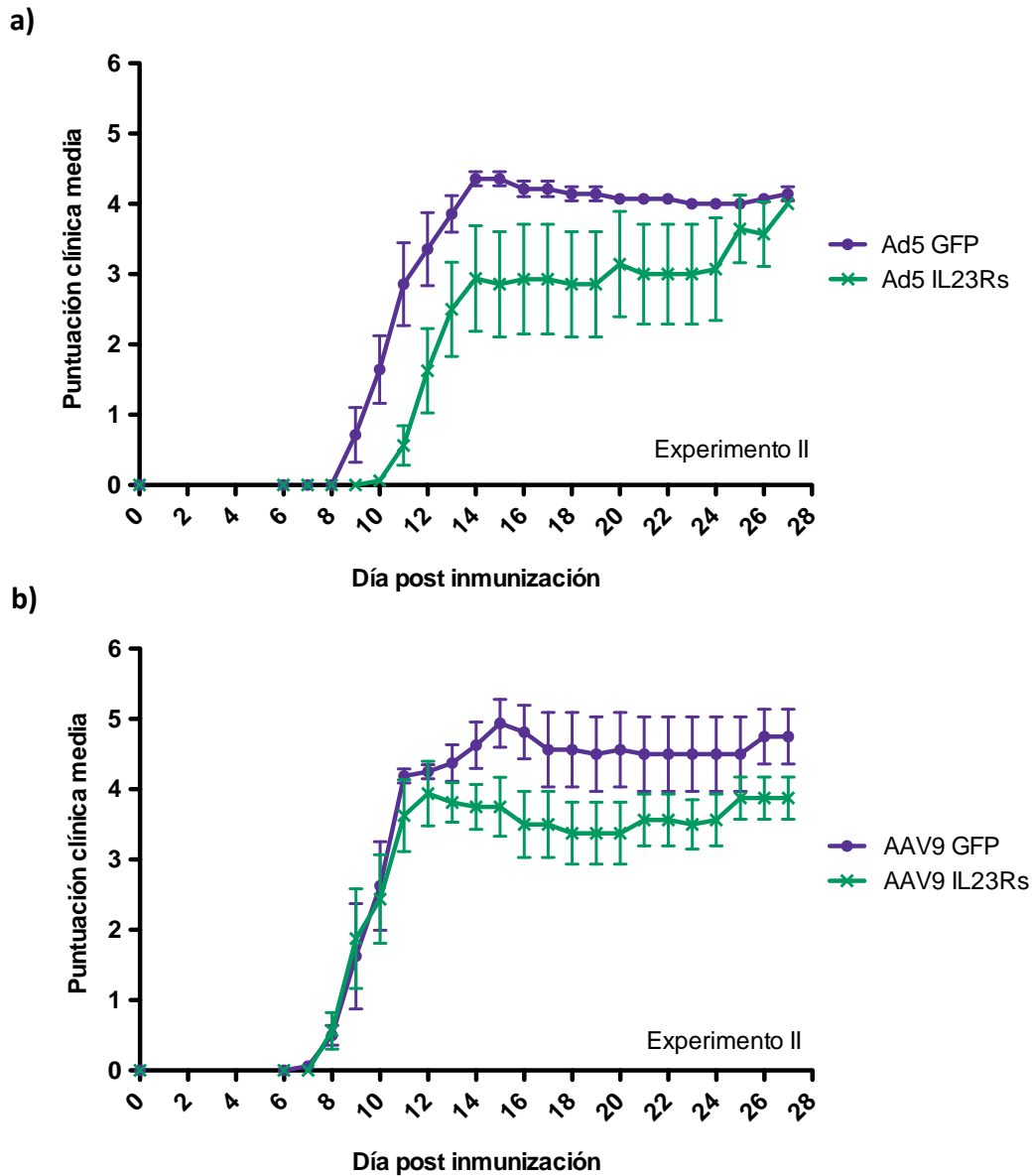


FIGURA 38. La expresión del gen IL23Rs durante la EAE mejoró la gravedad de los síntomas clínicos. En el gráfico se representa la puntuación clínica diaria media para cada grupo. Las barras representan el error estándar. **38.a).** El grupo Ad5-IL23Rs evoluciona más lentamente y con menor gravedad que el Ad5GFP ($p=0,004$). Ad5 GFP: animales inmunizados con MOG y tratados a día -5 con 5×10^{10} pp/ratón de Ad5-GFP ($n=7$). Ad5 IL23Rs: animales inmunizados con MOG y tratados a día -5 con 5×10^{10} pp/ratón de Ad5-IL23Rs ($n=8$). Test estadístico: Mann-Whitney. **38.b).** El grupo AAV9-IL23Rs evoluciona con una tendencia a una menor gravedad que el Ad5GFP ($p=0,072$). AAV9 GFP: animales inmunizados con MOG y tratados a día -5 con 9×10^{10} vg/ratón de AAV9-GFP ($n=8$). AAV9 IL23Rs: animales inmunizados con MOG y tratados a día -18 con 9×10^{10} vg/ratón de AAV9-IL23Rs ($n=8$). Test estadístico: T-student.

En primer lugar, respecto a los vectores Ad5, se volvió a inyectar un grupo reducido de animales ($n=3$) en las mismas condiciones que en el anterior experimento, es decir, 5×10^{10} pp/ratón i.v. a día -5 de la inmunización. Ello se hizo con el fin de obtener muestras a día 14 post-inmunización para realizar estudios inmunológicos. Además,

aunque la n era pequeña, se confirmó el retraso en la aparición de la enfermedad observado en el Experimento II con los adenovirus. Como puede verse en la **Figura 39.a**, en este experimento (III), los ratones tratados con Ad5-IL23Rs también desarrollan la enfermedad de forma significativamente más lenta que los inyectados con vector Ad5-GFP (día de inicio de la enfermedad: $12,33 \pm 1,53$ D.E. y $9,0 \pm 1,0$ D.E., respectivamente, $p=0,034$).

En segundo lugar, respecto a los vectores AAV, se decidió cambiar el momento de la administración del virus. Estos vectores tienen una cinética más lenta que los adenovirus (necesitan 2-3 semanas para expresar el transgen eficientemente) y se pensó que sería más apropiado administrar el vector viral aproximadamente 3 semanas antes de la inmunización de los ratones. Así en el Experimento III, los AAV se administraron a los ratones a día -18 (administración intravenosa de 9×10^{10} vg/ratón). Sin embargo, ello no supuso una mejora en el efecto del transgen sobre el curso clínico de la enfermedad (**Figura 39.b**).

Mediante ensayos de proliferación celular de los esplenocitos procedentes de los animales sacrificados a día 14 de experimento se comprobó que no había diferencias significativas en cuanto a respuesta proliferativa frente al antígeno encefalitogénico entre el grupo Ad5IL23Rs y el grupo control Ad5-GFP ($p=0,695$) (**Figura 40.a**). Sorprendentemente, en los grupos AAV el estudio de proliferación celular (**Figura 40.b**), reveló que el grupo tratado con AAV9-IL23Rs i.v. tenía un índice de estimulación de células T reactivas a MOG significativamente menor que el grupo control (AAV-GFP) ($p=0,011$). De esta forma asumimos que, si bien, no era observable un efecto a nivel clínico, el transgen era capaz de reducir la expansión de células T específicas frente a la MOG. Por este motivo nos centramos en mejorar los resultados con los vectores AAV.

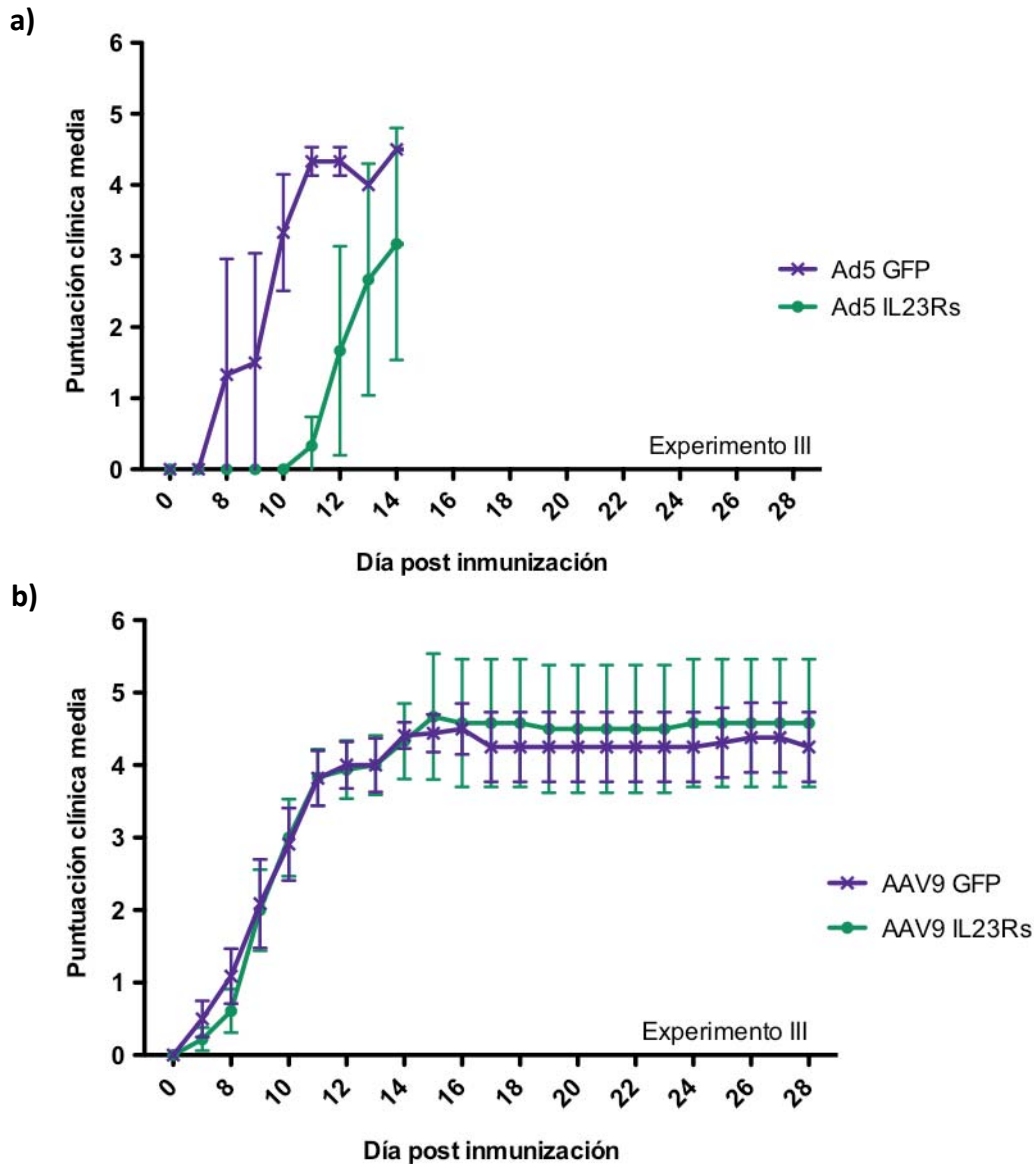


FIGURA 39. Expresión del gen IL23Rs en animales con EAE. Los gráficos representan la puntuación clínica diaria media para cada grupo. Las barras representan el error estándar. **39.a.** El grupo Ad5-IL23Rs evoluciona más lentamente y con menor gravedad que el Ad5-GFP ($p=0,034$. Test estadístico: Mann-Whitney). Ad5 GFP: animales inmunizados con MOG y tratados a día -5 con 5×10^{10} pp/ratón de Ad5-GFP ($n=3$). Ad5 IL23Rs: animales inmunizados con MOG y tratados a día -5 con 5×10^{10} pp/ratón de Ad5-IL23Rs ($n=3$). **39.b.** No se observan diferencias entre los dos grupos. AAV9 GFP: animales inmunizados con MOG y tratados a día -18 con 9×10^{10} vg/ratón de AAV9-GFP ($n=8-11$). AAV9 IL23Rs: animales inmunizados con MOG y tratados a día -18 con 9×10^{10} vg/ratón de AAV9-IL23Rs ($n=6-9$).

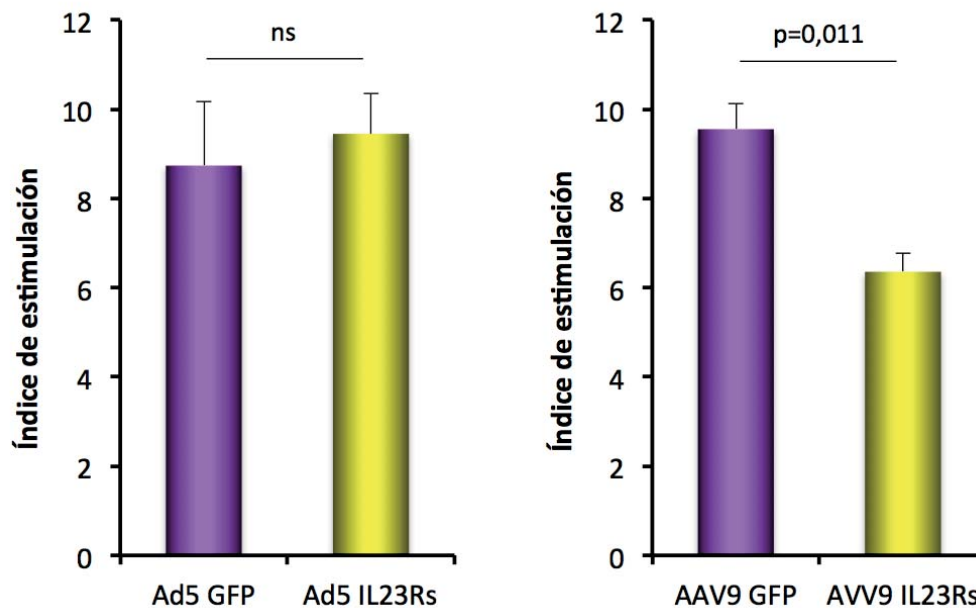


FIGURA 40. Respuesta proliferativa antígeno específica a día 14 del experimento. A día 14 del Experimento III, se sacrificaron 3 ratones de cada grupo, se extrajeron los bazo, se cultivaron células T y se estimularon con MOG₄₅₋₅₅. Las barras representan el error estándar. Test estadístico: T-student. **40.a.** No hay diferencia en el índice de estimulación ante el antígeno MOG₄₅₋₅₅ entre el grupo Ad5-GFP y el Ad5-IL23Rs. **40.b.** El tratamiento con el vector AAV9-IL23Rs disminuyó significativamente la respuesta proliferativa antígeno específica en comparación con el grupo AAV9-GFP.

Ad5 GFP: animales inmunizados con MOG y tratados a día -5 con 5×10^{10} pp/ratón de Ad5-GFP. Ad5 IL23Rs: animales inmunizados con MOG y tratados a día -5 con 5×10^{10} pp/ratón de Ad5-IL23Rs. AAV9 GFP: animales inmunizados con MOG y tratados a día -18 con 9×10^{10} vg/ratón de AAV9-GFP. AAV9 IL23Rs: animales inmunizados con MOG y tratados a día -18 con 9×10^{10} vg/ratón de AAV9-IL23Rs (n=6-9).

2.6.5. Inmunomodulación de la EAE mediante la administración de vectores AAV portadores de IL23Rs

Con el objetivo de aumentar el efecto beneficioso de la expresión del IL23Rs en la evolución clínica de la EAE, procedimos a realizar varios cambios en el vector. En primer lugar, se cambió de un AAV9 a un AAV8. El AAV9 infecta bien músculo y sobretodo sistema nervioso, y por este motivo fue escogido inicialmente. No obstante, los resultados observados con el Ad5 indicaron que en los animales tratados por vía sistémica el efecto inmunomodulador era mayor que en los animales tratados directamente a nivel del SNC. Así pues, se decidió utilizar en adelante vectores AAV8,

pues infectan de manera muy eficiente hígado. Además, se cambió el promotor CMV por un promotor CAG, por su mayor eficiencia en los niveles de expresión del transgen *in vivo* con AAV (Halbert et al., 2007; Nitta et al., 2005). Por último, para evitar cualquier posible efecto inmunogénico de la proteína GFP, se sustituyó el gen GFP del vector viral control por una secuencia irrelevante que no se expresa (vector *null*).

Así pues a día -18 se administró por vía intravenosa una dosis de 9×10^{10} vg/ratón de AAV8-CAG-IL23Rs o AA8-CAG-null (ver **Figura 41**). Si bien se observó una leve mejoría del curso clínico en el grupo tratado con AAV8-CAG-IL23Rs con respecto al grupo AAV8-CAG-*null* (puntuación media acumulada: $53,7 \pm 33,2$ D.E. y $69,3 \pm 33,5$ D.E., respectivamente), la diferencia no fue estadísticamente significativa ($p=0,367$). Se hipotetizó que podría ser un problema de dosis insuficiente. En consecuencia, se realizó un quinto experimento en el que se aumentó sustancialmente la dosis del vector (5×10^{11} vg/ ratón), además de aumentar el número de animales por grupo.

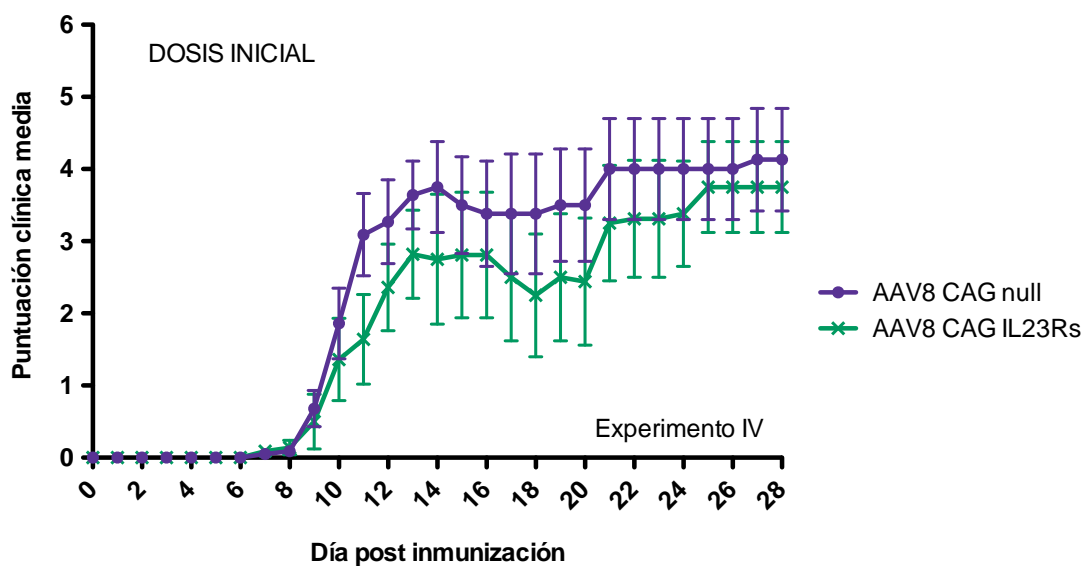


FIGURA 41. La expresión de IL23Rs mediada por AAV8 no mejoró significativamente el curso clínico de la EAE en los ratones tratados. El gráfico representa la evaluación clínica diaria media para cada grupo. Las barras representan el error estándar. El grupo AAV8-CAG-IL23Rs parece tener un curso clínico menos severo que el AAV8-CAG-*null*, sin embargo, la diferencia no es estadísticamente significativa (Test T-Student).

AAV8-CAG-IL23Rs: animales inmunizados con MOG₄₅₋₅₅ y tratados a día -18 con 9×10^{10} vg/ratón de AAV8-CAG-IL23Rs (n=8-11). AAV8-CAG-*null*: animales inmunizados con MOG₄₅₋₅₅ y tratados a día -18 con 9×10^{10} vg/ratón de AAV8-CAG-*null* (n=8-11).

En la **Figura 42.a** se observa como el aumento de dosis del vector administrado hizo posible que en el Experimento V finalmente se consiguiera una mejora muy significativa de la sintomatología clínica de la enfermedad en aquellos animales tratados con el vector que codifica el gen del IL23Rs con respecto a los tratados con un vector control *null*. Así, el grupo AAV8-CAG-IL23Rs tuvo una puntuación clínica media acumulada de $39,8 \pm 28,2$ D.E. (con una incidencia del 90%) y el grupo AAV8-CAG-*null* de $84,4 \pm 12,9$ D.E. (100% de incidencia), $p=0,003$. Además, también hay diferencias en cuanto a la mortalidad de la enfermedad (IL23Rs: 0%, *null*: 25%).

Es importante resaltar que los ratones tratados con IL23Rs desarrollaron los primeros síntomas de la enfermedad más tarde que los controles *null* (día de inicio de la enfermedad: $12,67 \pm 2,60$ D.E. y $10,92 \pm 1,38$ D.E., respectivamente, $p= 0,060$). Asimismo, la mejora clínica observada en los ratones tratados fue estable y sostenida en el tiempo hasta la finalización del experimento, con una puntuación clínica media el último día de $4,69 \pm 0,84$ D.E en el grupo control y $2,71 \pm 1,70$ D.E en el grupo IL23Rs ($p=0,012$).

Por otra parte, en la **Figura 42.b**. se observa que los animales tratados con el virus *null* tienen una tendencia más pronunciada a la pérdida de peso que el grupo tratado con IL23Rs a lo largo de todo el experimento.

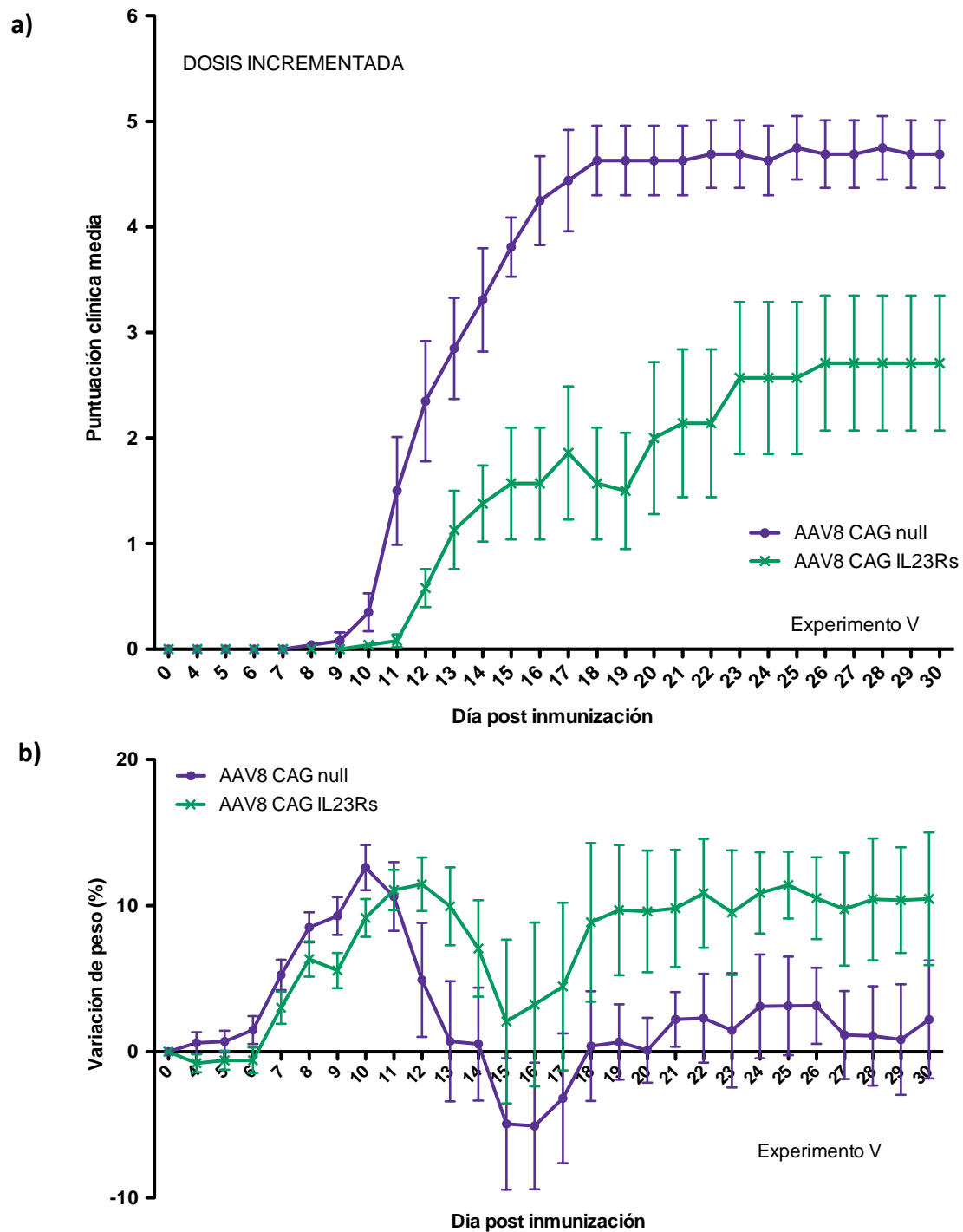


FIGURA 42. La expresión de IL23Rs mediada por AAV8 reduce significativamente la evolución clínica de la EAE. **42.a.** El gráfico representa la puntuación clínica diaria media para cada grupo. Las barras representan el error estándar. El grupo AAV8-CAG-IL23Rs presenta una mejora estadísticamente significativa en la evolución clínica de la enfermedad en comparación con el grupo control tratado con un AAV8-CAG-null ($p=0,003$, test estadístico: Mann-Whitney). **42.b.** El gráfico representa la variación de peso diaria media respecto a los pesos iniciales a día 0 del experimento. Las barras representan el error estándar.

AAV8-CAG-IL23Rs: animales inmunizados con MOG₄₅₋₅₅ y tratados a día -18 con 5×10^{11} vg/ratón de AAV8-CAG-IL23Rs ($n=8-13$). AAV8-CAG-null: animales inmunizados con MOG₄₅₋₅₅ y tratados a día -18 con 5×10^{11} vg/ratón de AAV8-CAG-null ($n=8-13$).

2.6.6. Análisis inmunológico de los ratones tratados con AAV8-CAG-IL23Rs

Un subgrupo de 5 ratones del Experimento V se sacrificaron a día 14 post-inmunización para realizar estudios inmunológicos e histopatológicos. Los esplenocitos de estos ratones se cultivaron en presencia del péptido MOG₄₀₋₅₅ para realizar ensayos de proliferación celular. A pesar de los resultados obtenidos en el seguimiento clínico, no se pudieron observar diferencias en la proliferación policlonal de los esplenocitos entre el grupo *null* e IL23Rs ($44,78 \pm 17,56$ D.E. y $31,33 \pm 7,47$ D.E., $p=0,153$), ni en la proliferación antígeno específica ($25,31 \pm 5,07$ D.E. y $28,09 \pm 6,08$ D.E., $p=0,457$) (Figura 43).

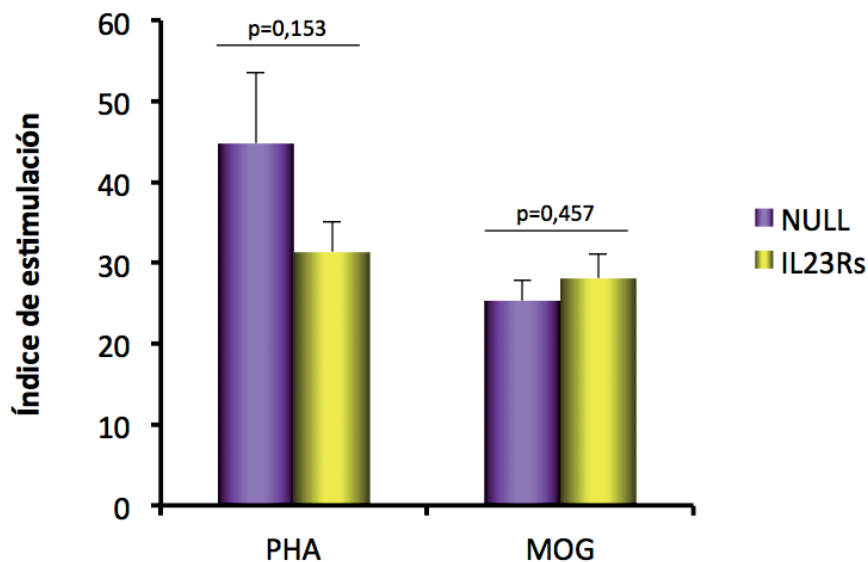


FIGURA 43. Análisis de la respuesta proliferativa antígeno-específica y no específica a día 14 del experimento. El análisis no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los grupos *null* e IL23Rs para la respuesta específica (MOG), ni para la no específica (PHA). Ensayos de proliferación realizados a partir de los esplenocitos de ratones (n=5) sacrificados a día 14 del Experimento V. Las barras representan el error estándar. Test estadístico: T-student. NULL: esplenocitos de animales tratados con AV8-CAG-null. IL23Rs: esplenocitos de animales tratados con AAV8-CAG-IL23Rs.

Posteriormente, las citoquinas secretadas al medio de cultivo de los esplenocitos estimulados con MOG₄₀₋₅₅ fueron analizadas mediante el sistema Luminex MagPix. En concreto, se analizaron las siguientes citoquinas: GM-CSF, IFN γ , IL2, IL4, IL5, IL6, IL10, IL17a, IL21 e IL22.

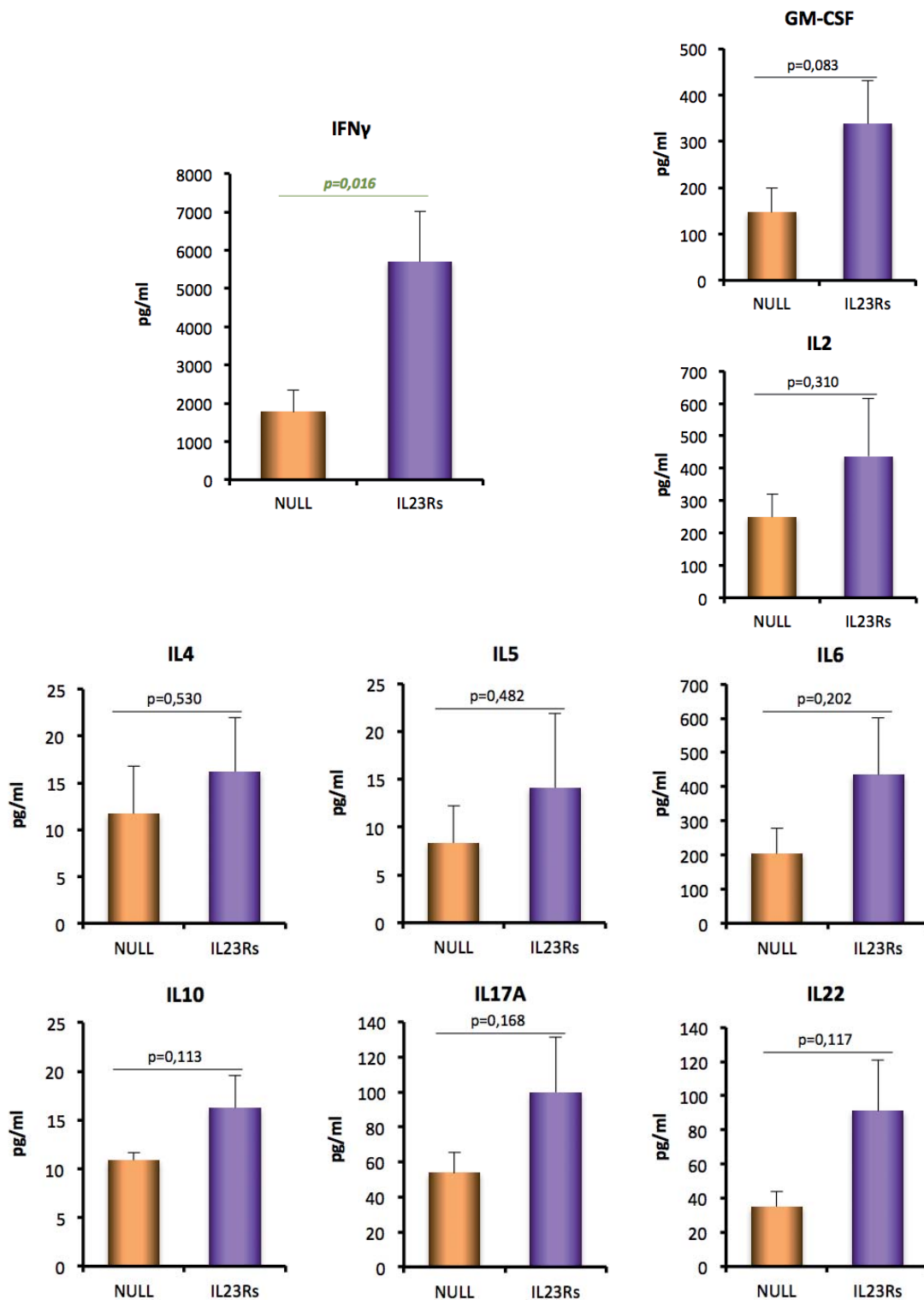


FIGURA 44. Concentración de citoquinas secretadas al medio de cultivo en esplenocitos estimulados con MOG₄₀₋₅₅. La concentración de IFN γ está significativamente aumentada en los ratones tratados con AAV-CAG-IL23Rs, y la concentración de GM-CSF muestra una tendencia a estar aumentada en los mismos. Las barras representan el error estándar. Test estadístico: T-student (n=5). NULL: animales tratados con AV8-CAG-null. IL23Rs: animales tratados con AAV8-CAG-IL23Rs.

En el análisis de citoquinas de sobrenadantes de esplenocitos se halló una diferencia estadísticamente significativa de la concentración de IFN γ (null: 1765,89 pg/ml \pm 1146,08 D.E., IL23Rs: 5691,30 pg/ml \pm 2639,28 D.E.; p=0,016), y una tendencia a la significación estadística en la producción de GM-CSF (null: 146,16 pg/ml \pm 106,58 D.E., IL23Rs: 337,40 pg/ml \pm 187,95 D.E.; p=0,083) (**Figura 44**). Para el resto de citoquinas se detectaron niveles similares de concentración. La citoquina IL21 no se representa, pues su detección estuvo por debajo del límite de detección del kit en todas las muestras.

También se analizó la concentración de las citoquinas en sangre. Desafortunadamente, la mayoría de muestras tuvieron valores por debajo de los niveles de detección del kit. Solo IFN γ , IL6, IL5 e IL22 fueron valorables. No obstante, ninguna de estas citoquinas mostró diferencias de concentración entre el grupo tratado y el control.

2.6.7. Estudio histopatológico del SNC

De los mismos ratones sacrificados a día 14 del experimento V, se obtuvieron las médulas espinales, a partir de las cuáles se realizó un estudio histopatológico para evaluar la inflamación y el grado de desmielinización. El análisis de las muestras se realizó en ciego para evitar el sesgo del investigador.

El patrón histopatológico de los ratones tratados con IL23Rs estaba en concordancia con la evolución clínica observada. Tanto en el grupo de ratones con EAE no tratado, como en el grupo tratado con el vector *null*, se observó desmielinización y abundante infiltrado inflamatorio en la sustancia blanca de la médula espinal, compuesto mayoritariamente por linfocitos y macrófagos. En cambio, en los ratones tratados con IL23Rs, el infiltrado inflamatorio fue mucho más discreto y no se observó desmielinización (**Figura 45**).

Por otra parte, también se realizaron inmunotinciones para estudiar la respuesta astrocitaria y la activación de la microglía. Se utilizó Iba-1 como marcador de microglía y GFAP como marcador de astrogliá. Para cada ratón y marcador se llevaron a cabo tinciones inmunohistoquímicas en 12 cortes sagitales de la médula espinal repartidos a lo largo de ésta, realizando después la media para cada ratón y marcador.

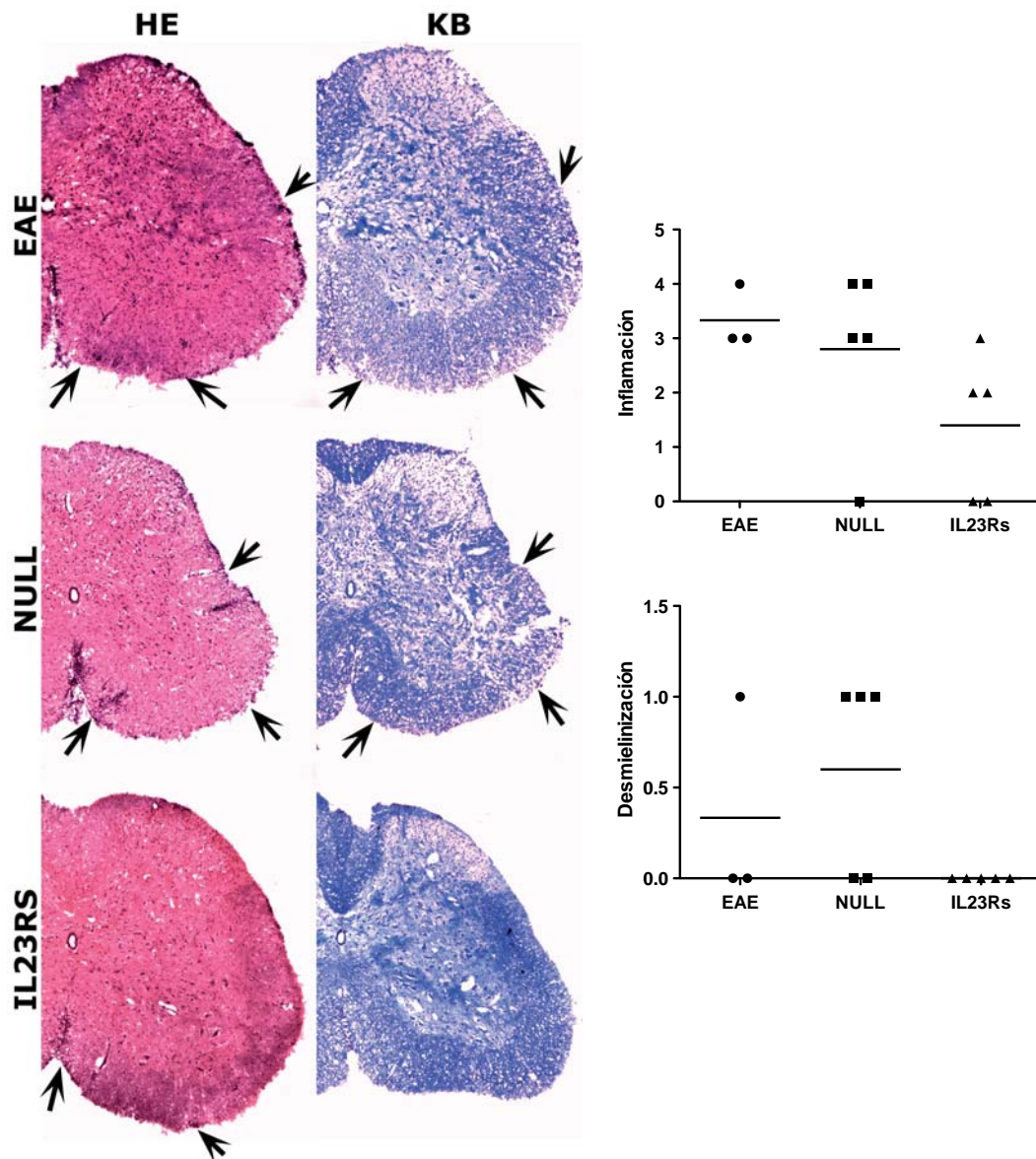


FIGURA 45. Inflamación (HE) y desmielinización (KB) en médula espinal a día 14 post inmunización. En las tinciones de HE (Hematoxilina-Eosina) las flechas indican infiltrados inflamatorios. En las tinciones de KB (Klüver-Barrera) las flechas indican áreas de desmielinización. Los gráficos muestran el score inflamatorio y de desmielinización para los grupos EAE, null y IL23Rs.

EAE: médula espinal de ratón inmunizado con MOG₄₅₋₅₅ y no tratado.

NULL: médula espinal de ratón inmunizado con MOG₄₅₋₅₅ y tratado con de AAV8-CAG-null.

IL23Rs: médula espinal de ratón inmunizado con MOG₄₅₋₅₅ y tratado con AAV8-CAG-IL23Rs.

Como se observa en la **Figura 46.a** la activación de la microglía es significativamente menor en los ratones tratados con IL23Rs, con niveles similares a los de los ratones sanos, mientras que el grupo *null* desarrolla una activación similar al grupo EAE. La diferencia de activación de la microglía entre IL23Rs y *null* es estadísticamente significativa (intensidad fluorescente integrada media, *null*: $1,58E+12 \pm 9,34E+11$ D.E.

IL23Rs: $2,93\text{E}+11 \pm 2,54\text{E}+11$ D.E. $p<0,05$). Un ejemplo representativo puede observarse en la **Figura 47**.

Por lo que concierne a la astrogli a (**Figura 46.b**), hay un mayor nivel de activación astrogli al en ratones control (*null* y EAE) que en los tratados con IL23Rs, siendo la diferencia entre IL23Rs y *null* estadísticamente significativa, (intensidad fluorescente integrada media: $2,11\text{E}+11 \pm 7,75\text{E}+10$ D.E. y $7,43\text{E}+11 \pm 1,81\text{E}+11$ D.E. respectivamente; $p=0,0002$). En la **Figura 48** puede observarse un ejemplo representativo.

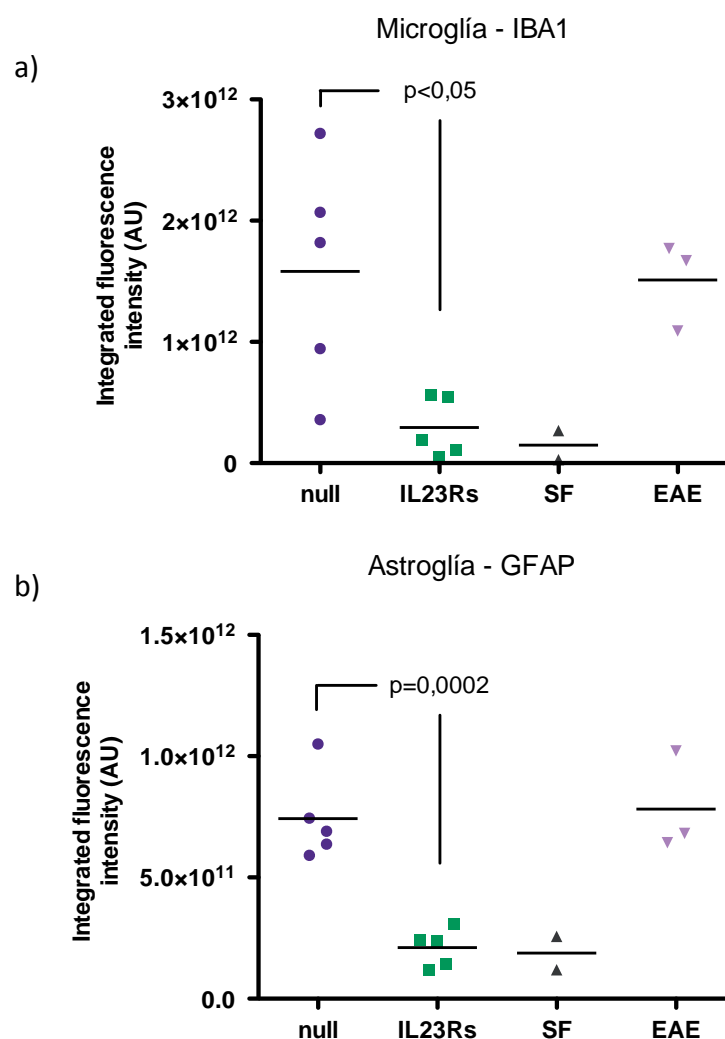


FIGURA 46. Activación de la microglía y la astrogli a en médula espinal a día 14 post inmunización. Valores de intensidad fluorescente tras inmunohistoquímica con los marcadores específicos Iba1 (microglía) y GFAP (astrogl a).

null: ratones inmunizados con MOG₄₅₋₅₅ y tratados con AAV8-CAG-null. IL23Rs: ratones inmunizados con MOG₄₅₋₅₅ y tratados con AAV8-CAG-IL23Rs. SF: ratones inmunizados con suero fisiológico, no desarrollan EAE. EAE: ratones inmunizados con MOG₄₅₋₅₅ y no tratados. Test estadístico: One way ANOVA/Tukey Post Test. N=5 ratones. 12 cortes/ratón. 3 campos/corte analizados.

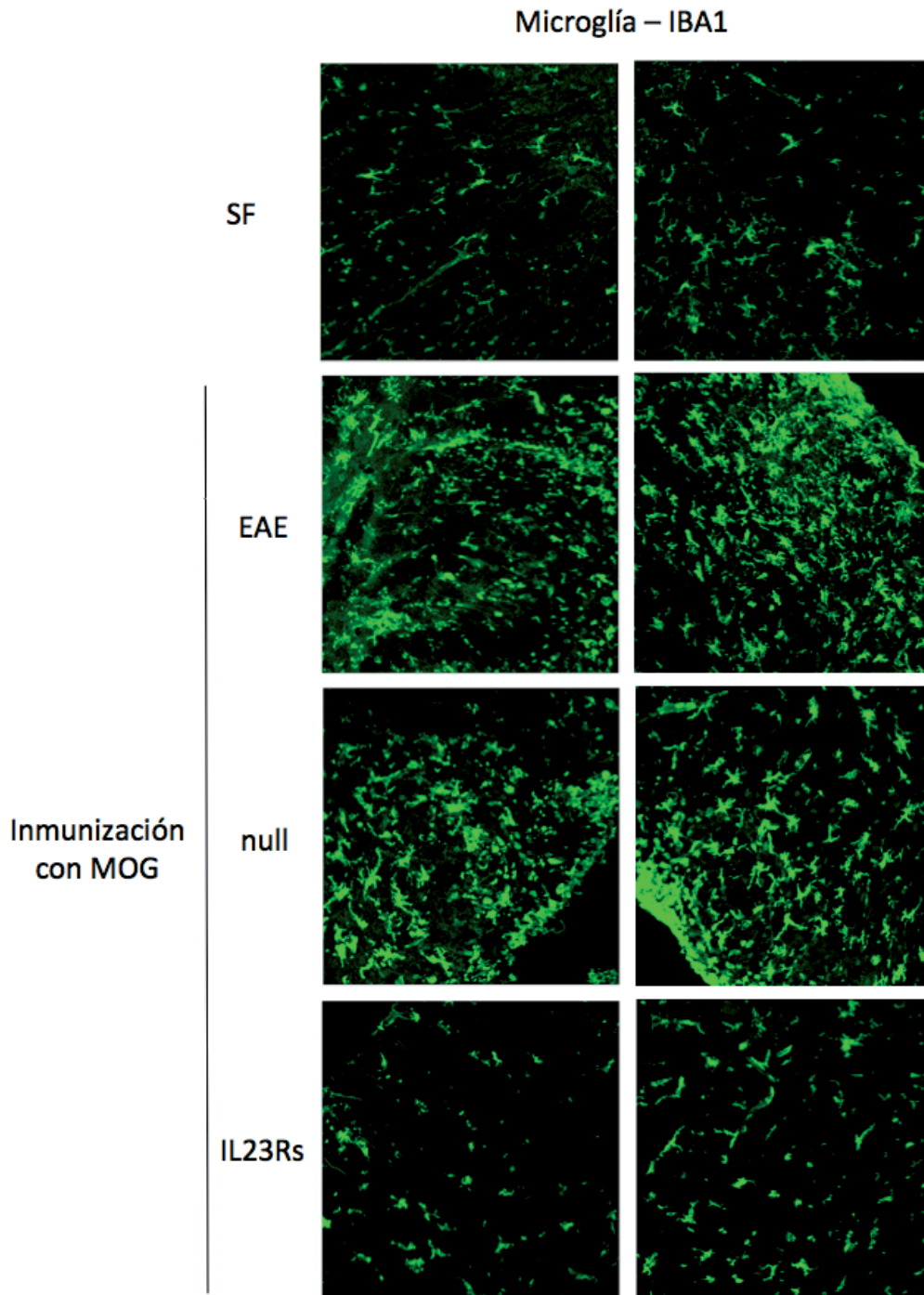


FIGURA 47. Ejemplo representativo del estudio de activación de la microglía en médula espinal a día 14 post inmunización. Inmunohistoquímica con marcador IBA1. Los animales tratados con AAV8-CAG-IL23Rs presentaron menor activación microglial que los ratones tratados con el vector control. Fotografías a 40x.

SF: médulas de ratones inmunizados con suero fisiológico, no desarrollan EAE. EAE: médula espinal de ratón inmunizado con MOG₄₅₋₅₅ y no tratado. Null: médula espinal de ratón inmunizado con MOG₄₅₋₅₅ y tratados con AAV8-CAG-null. IL23Rs: médula espinal de ratón inmunizado con MOG₄₅₋₅₅ y tratados con AAV8-CAG-IL23Rs. N=5 ratones. 12 cortes/ratón. 3 campos/corte analizados.

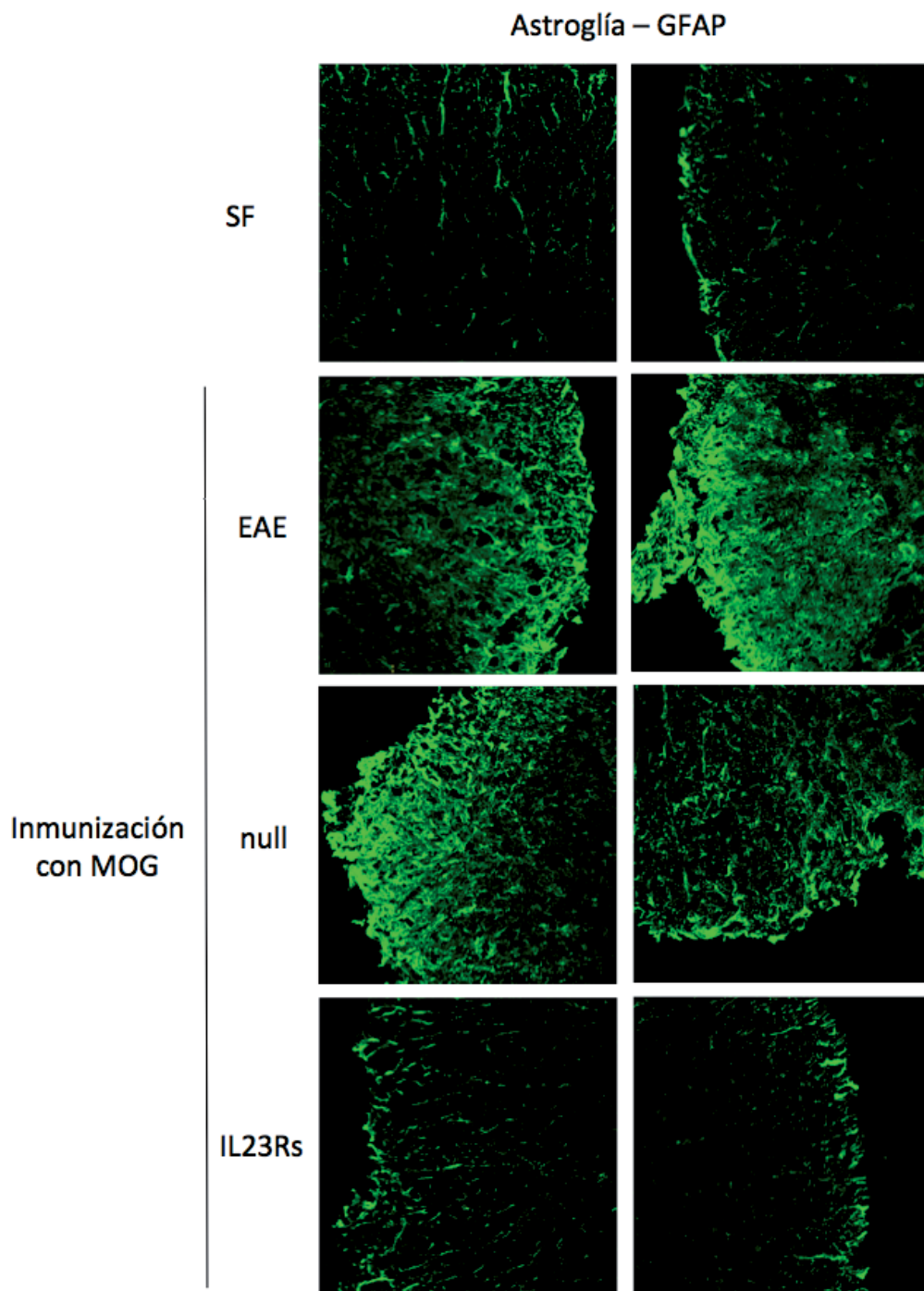


FIGURA 48. Ejemplo representativo del estudio de activación de la astrogliía en médula espinal a día 14 post inmunización. Inmunohistoquímica con marcador GFAP. Los animales tratados tienen menor activación astrogliial que los animales no tratados. Fotografías a 40x. SF: médulas de ratones inmunizados con suero fisiológico, no desarrollan EAE. EAE: médula espinal de ratón inmunizado con MOG₄₅₋₅₅ y no tratado. Null: médula espinal de ratón inmunizado con MOG₄₅₋₅₅ y tratados con AAV8-CAG-null. IL23Rs: médula espinal de ratón inmunizado con MOG₄₅₋₅₅ y tratados con AAV8-CAG-IL23Rs. N=5 ratones. 12 cortes/ratón. 3 campos/corte analizados.

